

Aus dem Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Axel Gödecke

**Analyse kardialer mitochondrialer
Proteinphosphorylierungen
in Akt1 und Akt2 KO Mäusen**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Eva Stella Lachmann
(2018)

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Axel Gödecke

Zweitgutachterin: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Judith Haendeler

Für meinen Vater

Zusammenfassung

Die Proteinkinase B (Akt) beeinflusst diverse Signaltransduktionen am Herzen. Es werden am Herzen zwei unterschiedliche Isoformen- Akt1 und Akt2- exprimiert. Nach Aktivierung über den PI3K-Signalweg, transloziert die aktivierte Akt u.a. in die Mitochondrien, in denen zahlreiche Substrate phosphoryliert werden. In dieser Arbeit wurden erstmalig die Akt-isoformspezifischen und -unspezifischen Effekte auf das kardiale mitochondriale Phosphoproteom analysiert. Die Untersuchungen wurden an induzierbaren Akt1 bzw. Akt2 Knock Out Mäusen durchgeführt, die den Gendefekt spezifisch in Kardiomyozyten aufweisen. Veränderungen im Phosphoproteinmuster wurden mittels Massenspektrometrie analysiert.

Die Akt1 und Akt2 KO Mäuse wurden unter basalen Bedingungen und nach Insulinstimulation untersucht. Die Mitochondrien wurden mittels eines Antikörper-basierten magnetischen Auftrennverfahrens isoliert. Die Anreicherung und Reinheit der mitochondrialen Fraktionen wurden mittels Western Blot Analysen kontrolliert. Die angereicherten Mitochondrien wurden im Anschluss einer dreifachen Formaldehydmarkierung unterzogen, die die Identifizierung und relative Quantifizierung der phosphorylierten Peptide in der Nano-LC-ESI-MS/MS-Analyse ermöglichte.

Die Analyse des mitochondrialen Phosphoproteoms führte zur Identifizierung von 132 nichtredundanten Phosphopeptiden, 94 korrespondierenden distinkten Proteinen sowie 25 neuen Phosphorylierungsstellen. Nach Insulinstimulation konnten 190 Phosphopeptide mit 121 Proteinen und 46 neue Phosphorylierungsstellen detektiert werden. Es wurden Phosphoproteine in sämtlichen mitochondrialen Funktionsklassen und Kompartimenten detektiert, wobei Insulin die Anzahl und Diversität an Phosphopeptiden, Phosphoproteinen und Phosphorylierungsstellen wesentlich steigert. Es wurden insgesamt 17 Kandidaten identifiziert, die hochwahrscheinlich einer Akt-isoformspezifischen und –unspezifischen Regulation unterliegen: 4 Kandidaten unter basalen Bedingungen und 13 Substrate nach Insulinstimulation. Die meisten Proteine, die einer insulinvermittelten, Akt-abhängigen Regulation unterliegen, können dem Metabolismus und der oxidativen Phosphorylierung zugeordnet werden. Diese Ergebnisse suggerieren, dass mitochondriales Akt über Phosphorylierungsmechanismen eine essentielle Rolle in der Orchestrierung von Substrat- und Sauerstoffbedarf und Energieproduktion am Herzen spielt. In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass auch die α -Untereinheit der ATP-Synthase nach Insulinstimulation einer Akt-abhängigen Phosphorylierung unterliegt.

Schlussfolgerung: Die zahlreichen neuen Informationen zur Phosphorylierung mitochondrialer Proteine tragen zu einem besseren Gesamtverständnis des kardialen mitochondrialen Phosphoproteoms und Akt-isoformabhängiger Effekte auf mitochondriale Signalnetzwerke am Herzen bei.

Summary

The protein kinase Akt is a pivotal kinase in the heart and is a central mediator of cardiac metabolism, growth, hypertrophy, survival and apoptosis. In the heart, two isoforms are expressed, Akt1 and Akt2, which may exert specific functions in signal transduction.

Akt is activated by the PI3K-pathway, which is initiated by various types of stimuli, like insulin. The full activation of Akt mediates its translocation to the mitochondrion and subsequent phosphorylation of numerous substrates. To analyze the Akt1 and Akt2 isoform-specific signaling in the heart we have generated conditional KO mice allowing inducible deletion of Akt1 and Akt2 isoforms in cardiomyocytes of the adult heart (iCMAkt KO). In order to uncover mitochondrial functions of Akt, we investigated the cardiac mitochondrial phosphoproteome of wild type (WT), iCMAkt1 KO and iCMAkt2 KO mice and searched for Akt targets.

Mice were analysed under basal conditions or stimulation of Akt signaling by insulin. Mitochondria were isolated from mouse hearts by an antibody-based separation via magnetic beads. We validated the enrichment and purity of the mitochondrial fractions by Western Blot, using antibodies specific for different cellular compartments. The enriched mitochondria were subjected to stable isotope dimethyl labeling, enrichment of phosphopeptides and subsequent identification and quantification of phosphorylated peptides by mass spectrometry.

Analysis of the mitochondrial phosphoproteome led to the identification of 132 nonredundant phosphopeptides corresponding to 94 distinct mitochondrial proteins. Among these, 25 phosphosites were newly discovered. After insulin stimulation, 190 mitochondrial phosphopeptides corresponding to 121 phosphoproteins and 46 new phosphosites were found. Phosphoproteins were located in all submitochondrial compartments and were associated with all mitochondrial functions. Insulin increases the phosphorylation of mitochondrial proteins.

In total, 17 mitochondrial proteins appeared to be differentially phosphorylated in Akt KO mice: 4 proteins under basal conditions and 13 proteins after insulin stimulation. Among these proteins, the majority is involved in mitochondrial metabolism and oxidative phosphorylation. The α -subunit of ATP-synthase was a prominent target for phosphorylation in an Akt dependent manner. These results suggest a regulatory role of Akt in ATP synthesis.

Conclusion: Mitochondrial proteins are modified substantially by phosphorylation. The new results contribute to a deeper understanding of the cardiac mitochondrial phosphoproteome and Akt dependent effects on mitochondrial signaling in the heart.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
aE	arbiträre Einheiten
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Serumalbumin vom Rind
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca²⁺	Kalzium
¹³CD₂O	¹³ C markiertes deuteriertes Formaldehyd
CD₂O	deuteriertes Formaldehyd
CH₂O	Formaldehyd
Cre	<i>causes recombination</i>
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
g	Gramm
GSK	Glykogensynthase-Kinase
h	<i>hour</i> ; Stunde
HM	hydrophobes Motiv
iCM KO	induzierbarer kardiomyozytenspezifischer <i>Knock Out</i>
IGF-1	<i>insulin-like growth factor</i>
IRS	Insulin-Rezeptor-Substrat
K	Kilo
KO	<i>Knock Out</i>
LC	<i>liquid chromatography</i> ; Flüssigkeitschromatographie
m	Milli-, Meter
M	Molar
mer	mutagenisierter Östrogenrezeptor
mRNA	<i>messenger RNA</i> , Boten-RNA
mTOR	<i>mammalian target of Rapamycin</i>
MS	Massenspektrometer, Massenspektrometrie
m/z	Masse/Ladung
n	Nano
NaBH₃CN	Cyanoborhydrid

NaBD₃CN	deuteriertes Cyanoborhydrid
NaCH₃COOH	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NaHPO₄	Natriumhydrogenphosphat
NaHO	Natriumhydroxid
OHTX	4-OH-Tamoxifen
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS (PBST)	<i>phosphate-buffered saline</i> (mit 0,1 % Tween); phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerasekettenreaktion
PKD1	<i>3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1</i>
PH-Domäne	Pleckstrin-Homologie-Domäne
PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol(3,4)bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)trisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>rotation per minute</i> ; Umdrehungen pro Minute
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulphate</i> ; Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
Tab.	Tabelle
TBS (TBST)	<i>tris-buffered saline</i> (mit 0,1 % Tween); trisgepufferte Salzlösung
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Thr	Threonin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tyr	Tyrosin
U	Unit
WT	Wildtyp

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Proteinkinase Akt	1
1.1.1	Struktur	1
1.1.2	Regulation.....	3
1.1.3	Isoformen.....	6
1.2	Bedeutung der Akt in kardialen Mitochondrien.....	8
1.2.1	Mitochondrien im Herzen.....	8
1.2.1.1	Mitochondrien und Energiemetabolismus	8
1.2.1.2	Mitochondrien und Calcium	10
1.2.1.3	Mitochondrien und ROS-Produktion	10
1.2.1.4	Mitochondrien und Zellkontrolle.....	11
1.2.2	Bedeutung der Akt in kardialen Mitochondrien.....	12
1.3	Fragestellung	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Verwendete Laborgeräte	15
2.2	Verwendete Antikörper	16
2.2.1	Primäre Antikörper	16
2.2.2	Sekundäre Antikörper	16
2.3	Verwendete Computerprogramme	16
2.4	Transgenes Mausmodell.....	16
2.5	Insulinstimulation.....	17
2.6	Mitochondrienisolation	18
2.6.1	Antikörper-basiertes magnetisches Auftrennverfahren	18
2.6.2	Differentialzentrifugation	20
2.6.3	Dichtegradientenzentrifugation	21
2.7	Proteinanalyse	22
2.7.1	Proteinkonzentrationsbestimmung über BCA-Protein-Assay	22
2.7.2	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen über SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	23
2.7.3	Proteintransfer über Western Blot	24
2.7.4	Immunodetektion.....	24
2.8	Massenspektrometrie.....	25
2.8.1	Peptidfragmentierung und Identifizierung der Proteine mittels Tandem- Massenspektrometrie.....	25
2.8.2	Elektrosprayionisation (ESI)	26
2.8.3	Massenanalysator: LTQ-Orbitrap XL Massenspektrometer	27
2.9	Qualitative und Quantitative Phosphoproteomanalyse	29

2. 9. 1	Experimentelle Arbeitsmethode	30
2. 9. 1. 1	Proteinverdau	30
2. 9. 1. 2	Dreifache Stabile Isotopen Dimethyl-Markierung.....	30
2. 9. 1. 3	Vorabmessungen.....	32
2. 9. 1. 4	Phosphopeptidanreicherung	32
2. 9. 1. 5	Peptidfraktionierung und Nano-LC-ESI-MS/MS-Analyse.....	33
2. 9. 1. 6	Proteinidentifizierung, Datenbankrecherche und relative Quantifizierung	35
2. 10	Qualitative Proteomics/ Phosphoproteomics	36
2. 10. 1	Mitochondriale Proteinidentifizierung.....	36
2. 10. 2	Chromosomale und biochemische Charakterisierung identifizierter Phosphoproteine	37
2. 10. 3	Strukturelle und funktionale Charakterisierung identifizierter Phosphoproteine.....	37
2. 10. 4	Assoziation mit Pathologien.....	38
2. 10. 5	Suche von Akt-Substraten	38
2. 10. 6	Kinasenprädiktion identifizierter Phosphorylierungsstellen und identifizierte Kinasen im Phosphoproteom.....	38
2. 10. 7	Charakterisierung der Phosphorylierungsstellen	38
2.11	Quantitative Proteomics/ Phosphoproteomics.....	39
2.11.1	Statistische Analyse.....	39
3	Ergebnisse	41
3.1	Mitochondrienisolation	41
3. 1. 1	Ausbeute der isolierten mitochondrialen Fraktion	41
3. 1. 2	Anreicherung der isolierten Mitochondrien.....	42
3. 1. 3	Reinheit der mitochondrialen Fraktion.....	42
3. 1. 4	Reproduzierbarkeit des Antikörper-basierten Trennverfahrens	46
3. 1. 5	Mitochondrialer Akt-Proteinimport.....	48
3. 2	Charakterisierung des murinen kardialen mitochondrialen Phosphoproteoms	49
3. 2. 1	Arbeitsschema.....	49
3. 2. 2	Qualitative Analyse	50
3. 2. 2. 1	Effekt von Insulin auf das mitochondriale Phosphoproteom.....	50
3. 2. 2. 2	Charakterisierung nichtmitochondrialer Phosphoproteine.....	52
3. 2. 2. 3	Chromosomale und Biochemische Zuordnung identifizierter Phosphoproteine.....	53
3. 2. 2. 4	Assoziation mit Herzpathologien.....	63
3. 2. 2. 5	Charakterisierung der Phosphorylierungsstellen	63
3. 2. 2. 5. 1	Phosphorylierungsmuster des ATP-Synthase-Komplexes	66
3. 2. 2. 6	Akt-isoformspezifische Substrate	73
3. 2. 2. 7	Kinasenprädiktion identifizierter Phosphorylierungsstellen.....	75
3. 2. 3	Quantitative Proteomics/ Phosphoproteomics.....	77
3. 2. 3. 1	Akt-isoformspezifische Regulationen.....	77
3. 2. 3. 2	Phosphoproteinebene: Akt-isoformspezifische Regulationen	80

3. 2. 3. 3	Proteinebene: Akt-isoformspezifische Regulationen.....	84
3. 2. 3. 4	Funktionale Charakterisierung identifizierter regulierter Proteine.....	85
4	Diskussion	88
4. 1	Mitochondrienisolationsprotokoll.....	89
4. 2	Mitochondrialer Akt-Proteinimport.....	92
4. 3	Murines kardiales Phosphoproteom.....	93
4. 3. 1	Effekt von Insulin auf das murine kardiale Phosphoproteom.....	94
4. 3. 2	Akt-isoformspezifische Regulationen.....	97
4. 4	Schlussfolgerung.....	102
5	Literaturverzeichnis	103
6	Danksagung	124

1 Einleitung

1.1 Die Proteinkinase Akt

1.1.1 Struktur

Das Gen der Proteinkinase B (PKB)/Akt wurde erstmalig 1977 als Protoonkogen v-Akt des akut transformierenden Akt-8 Retrovirus in einem T-Zell-Lymphom der AKR/J-Maus identifiziert (Staal *et al.*, 1977). 1991 gelang drei unabhängigen Forschergruppen die Klonierung und Charakterisierung der Akt-Kinase (Brazil and Hemmings, 2001).

Die erste Forschergruppe klonierte ein zelluläres Homolog zu dem viralen Protoonkogen v-Akt des Retrovirus Akt-8 und identifizierte hierdurch das zelluläre Akt, c-Akt, als zytoplasmatische Serin-Threonin-Kinase (Bellacosa *et al.*, 1993, 1991). Auf der Suche nach homologen Kinasen zu Proteinkinase A (PKA) (Coffer and Woodgett, 1991) und Proteinkinase C (PKC) (Jones *et al.*, 1991) wurde Akt von 2 weiteren Forschergruppen identifiziert. Hierdurch entstanden die für Akt synonymen Bezeichnungen Proteinkinase B (PKB) und Rac (related to Protein A und C kinases). Akt wird der Superfamilie der Proteinkinasen und der Subfamilie der AGC-Gruppe zugeordnet (Manning *et al.*, 2002). Akt umfasst 480 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 57 kDa.

Die Subfamilie Akt umfasst bei Säugern 3 evolutionär konservierte Isoformen, Akt1, Akt2 und Akt3. Akt1 wird ubiquitär exprimiert, während Akt2 primär in insulinsensitiven Geweben und Akt3 insbesondere in Gehirn und Testis exprimiert werden. Diese Isoformen zeigen eine über 85 %-ige Sequenzhomologie und eine vergleichbare strukturelle Organisation, werden jedoch von unterschiedlichen Genen codiert (Alessi and Cohen, 1998).

Die Struktur der drei Isoformen ist durch drei hochkonservierte funktionelle Domänen charakterisiert (Abbildung 1): eine aminoterminal Pleckstrin Homologie (PH) Domäne, eine zentrale Kinase Domäne sowie eine carboxyterminale regulatorische Domäne mit einem hydrophoben Motiv (HM)- ein hochkonserviertes Kennzeichen von AGC Kinasen (Keranen *et al.*, 1995; Pearson *et al.*, 1995).

Die PH Domäne umfasst ca. 100 Aminosäuren (AS) und weist eine hohe Homologie zu dem Protein Pleckstrin auf, welches in Thrombozyten als vorrangiges Phosphorylierungssubstrat der PKC identifiziert wurde (Tyers *et al.*, 1988). Die PH Domäne von Akt interagiert mit Membranlipiden wie Phosphatidylinositol(3,4,5)trisphosphat (Frech *et al.*, 1997; James *et al.*, 1996).

Aufgrund ihrer biochemischen Eigenschaften stellt die PH-Domäne für bestimmte Kinasen eine wichtige Erkennungssequenz dar und ermöglicht Akt eine Membrantranslokation (Hanada *et al.*, 2004). Die Kinase-Domäne umfasst ca. 250 AS und zeigt eine große Ähnlichkeit mit anderen AGC Kinasen, z.B. PKA, PKC, p70S6K und p90RSK (Peterson and Schreiber, 1999). Sie enthält einen hochkonservierten Threoninrest (Akt1: 308; Akt2:309; Akt3: 305), dessen Phosphorylierung zur enzymatischen Aktivierung eine *Conditio sine qua non* ist (Alessi *et al.*, 1996).

Die regulatorische Domäne umfasst ca. 40 AS und das hydrophobe Motiv F-X-X-F/Y-S/T-Y/F (X steht für eine beliebige AS). Sie enthält einen Serinrest (Akt1: 473, Akt2: 474, Akt3: 472), dessen Phosphorylierung zur maximalen Aktivierung der Kinase essentiell ist. Eine Mutation des Motivs

verhindert die vollständige enzymatische Aktivierung (Andjelković *et al.*, 1997). In einer Spleißvariante von Akt3, in der keine regulatorische Domäne exprimiert wird, entspricht die gemessene spezifische Aktivität einem Zehntel im Vergleich zur Aktivität der vollständigen Isoform (Brodbeck *et al.*, 2001). Bemerkenswert ist, dass sowohl Akt3 in Ratten als auch eine humane Spleißvariante Akt3-1 kein hydrophobes Motiv besitzen. Dies impliziert, dass diese Kinase möglicherweise über Mechanismen unabhängig einer Serinphosphorylierung aktiviert wird (Brodbeck *et al.*, 2001; Konishi *et al.*, 1995). Akt mit ihrer oben beschriebenen molekularen Architektur wird in dieser Form sowohl in primitiven als auch hochspezialisierten Organismen exprimiert- in Fliegen, Würmern, Mäusen und im Menschen (Kimura *et al.*, 1997; Parrella and Longo, 2010; Toda *et al.*, 1988).

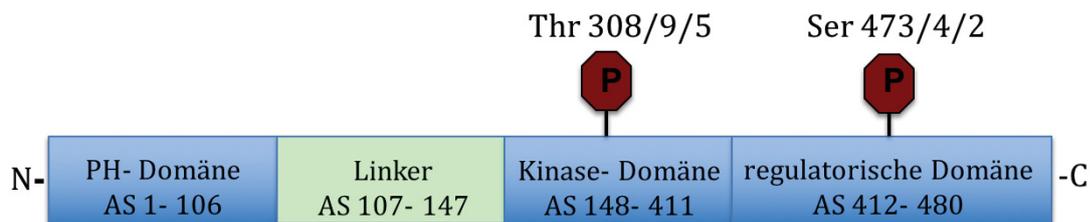


Abb. 1: Schematische Darstellung der Domänen-Struktur von Akt. Skizziert sind die grundlegende Struktur der Akt-Isoformen sowie die isoformspezifischen Phosphorylierungsstellen. Die Nummerierungen der Phosphorylierungsstellen beziehen sich auf die jeweiligen Aminosäurereste in Akt1, Akt2 und Akt3 (modifiziert nach Hanada *et al.*, 2004).

Zum besseren Verständnis der Regulationsmechanismen von Akt ist die Kenntnis ihrer kristallinen Struktur wegweisend. Die Kristallstruktur der Akt wurde 2002 aufgelöst (Abbildung 2).

Demzufolge liegen im monophosphorylierten Zustand von Akt, d.h. wenn lediglich das Threonin 309 innerhalb der Aktivierungsregion phosphoryliert ist, die aminoterminalen α B- und α C-Helices sowie die Aktivierungsschleife innerhalb der Kinase-Domäne ungeordnet vor. Die Struktur der monophosphorylierten Akt entspricht hierbei interessanterweise der Struktur der nichtphosphorylierten bzw. sog. inaktiven Akt (Yang *et al.*, 2002b).

Sobald jedoch Ser474 innerhalb des HM phosphoryliert wird, ändert sich die Struktur von Akt. Diese Konformationsänderung kann auch durch eine S474D-Substitution ausgelöst werden, in der die Sequenz innerhalb des Hydrophoben Motivs am Serin474 zum sauren, phosphomimetischen Aspartat mutiert ist. Eine Strukturänderung kann auch durch eine Resubstitution des HM getriggert werden, in dem das HM durch eine ähnliche Sequenz der PKC-verwandten Kinase 2 (PRK2) ersetzt wird, die anstelle von Serin eine andere Aminosäure trägt (sog. PDK1-interacting fragment (PIF)-sequence) (Balendran *et al.*, 1999). Beide Mechanismen vermitteln einen nachahmenden Phosphorylierungseffekt.

Durch die Biphosphorylierung von Thr309 und Ser474 interagieren das HM mit seiner Akzeptorstruktur aus α B- und α C-Helices, sowie die Aktivierungsschleife mit der α C-Helix. Diese Interaktionen führen zur Stabilisierung von Akt und erhöhen deren Phosphotransferrate um das 10-fache. Sowohl die alleinige Phosphorylierung von Thr309 oder Ser473 haben einen geringen Effekt auf die Akt-Aktivität. (Alessi *et al.*, 1996; Guertin *et al.*, 2006). Interessanterweise ist die aktive Akt-Struktur nahezu identisch mit der von PKA (Knighton *et al.*, 1991; Yang *et al.*, 2002a).

Zusammenfassend beruht der Aktivierungsmechanismus von Akt scheinbar auf einer allosterischen Umwandlung, indem die durch Interaktion einzelner Strukturelemente provozierte Konformationsänderung eine vollständige Aktivierung der Kinase bewirkt.

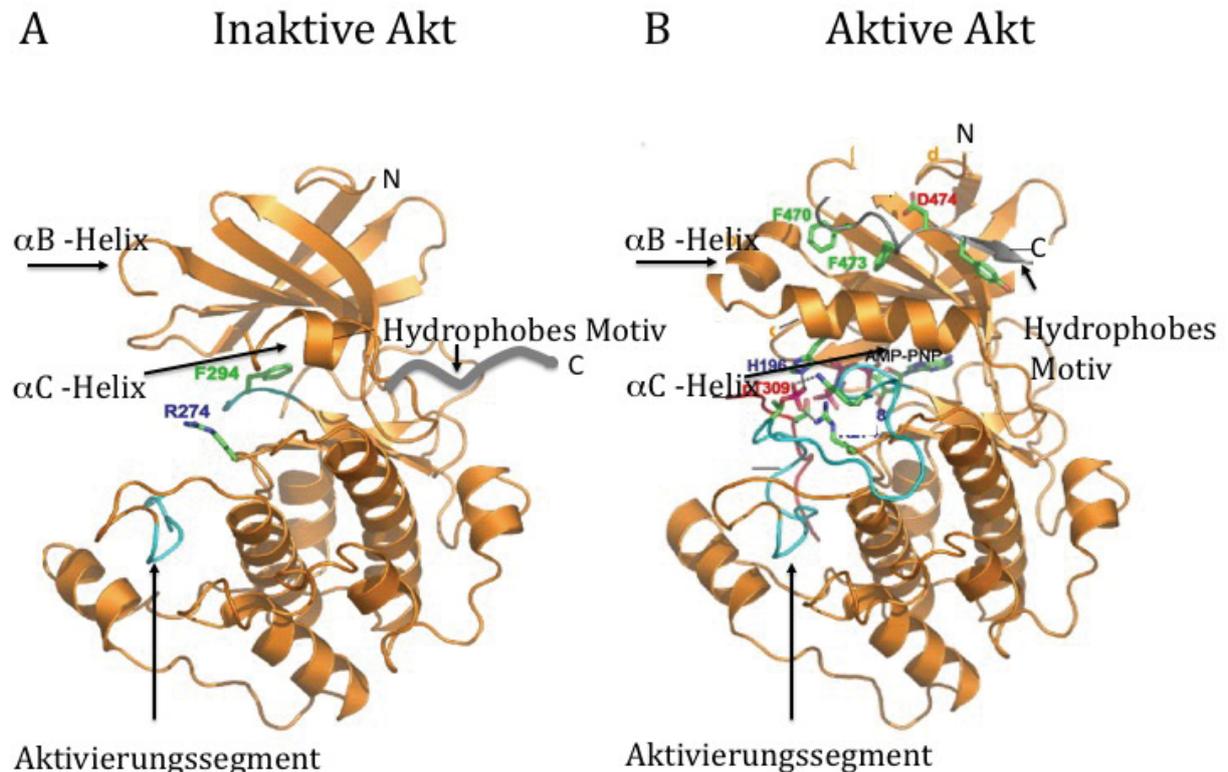


Abb. 2: Darstellung der Struktur von Akt. Struktur der „inaktiven“ bzw. monophosphorylierten Akt: die α B- und α C-Helices, das Aktivierungssegment und das HM liegen in ungeordneter Struktur vor (A). Struktur der aktiven bzw. biphosphorylierten Akt: Interaktionen zwischen α C-Helix- und Aktivierungssegment sowie zwischen α B- und α C-Helices und HM vermitteln die vollständige Aktivierung von Akt (modifiziert nach Yang *et al.*, 2002a).

1. 1. 2 Regulation

Die Aktivierung der Akt wird über die PI₃K-Signalkaskade vermittelt. Diese kann via Autophosphorylierung von Rezeptortyrosinkinasen, Aktivierung von Integrinsignalwegen und Stimulation von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren initiiert werden (Foster *et al.*, 2003; Wymann *et al.*, 2003). Dabei spielen u.a. Hormone, wie z.B. Insulin, Wachstumsfaktoren (z.B. Insulin-like growth-factor) und Zytokine (z.B. IL-2), aber auch Stressfaktoren wie Hypoxie und oxidativer Stress eine wichtige Rolle (Schultze *et al.*, 2011) (Abbildung 3).

Nach adäquatem Stimulus vermitteln die Rezeptoren direkt oder indirekt über Adaptermoleküle die Aktivierung des Schlüsselenzyms PI₃-Kinase, die den second messenger Phosphatidyl-Inositol-Trisphosphat (PIP₃) aus PIP₂ generiert. PIP₃ wiederum ist ein hochaffines Bindungssubstrat für die PH-Domäne von Akt und PDK1 (Phosphoinositide-dependent Kinase-1).

Unter physiologischen Bedingungen in nichtstimulierten Zellen ist PDK1 als konstitutiv aktive Kinase in der Plasmamembran lokalisiert. Sie bindet über ihre C-terminale PH-Domäne an PIP₃ mit einer höheren Affinität als PKB (Franke *et al.*, 1997).

Akt transloziert erst nach ansteigenden PIP₃-Konzentrationen vom Zytoplasma zur Plasmamembran und bindet dort über ihre N-terminale PH-Domäne an PIP₃ (Stephens *et al.*, 1998). Dadurch steht die Akt in unmittelbarer räumlicher Nachbarschaftsbeziehung zur PDK1, die das Thr308 innerhalb der Kinase-Domäne der Akt phosphoryliert (Alessi *et al.*, 1997; Stephens *et al.*, 1998). Zusätzlich zur Rekrutierung induziert die PIP₃-Bindung an Akt einen Konformationswandel innerhalb der PH-Domäne, wodurch die Phosphorylierungsrate via PDK1 gesteigert wird (Calleja *et al.*, 2007, 2003; Milburn *et al.*, 2003).

Die Bedeutung der PDK1 für die Thr308 Phosphorylierung wurde durch gezielte Genmodifikation in embryonalen Stammzellen (ES) von Mäusen untersucht. Die Deletion der PDK1 resultierte in einer ausbleibenden Phosphorylierung des Thr-Restes in der Kinase-Domäne und einer konsekutiv ausbleibenden Aktivierung der Akt. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Kolo-kalisation von PDK1 und Akt sowie die PDK1-vermittelte initiale Thr-Phosphorylierung essentiell für die Aktivierung von Akt sind (Williams *et al.*, 2000).

Die Identität der Ser473-Kinase, die sog. PDK2, wird kontrovers diskutiert (Hanada *et al.*, 2004). Als potentielle Phosphorylierungsmechanismen des HM wurden sowohl eine Akt-Autophosphorylierung (Toker and Newton, 2000) als auch eine Phosphorylierung durch andere Serinkinasen angenommen. Als mögliche Kinasen wurden die PDK1 (Balendran *et al.*, 1999), Integrin-linked Kinase 1 (ILK1) (Persad *et al.*, 2000), mitogen activated protein kinase activated protein kinase 2 (MAPKAP2) (Alessi *et al.*, 1996), Proteinkinase C βII (PKCβII) (Kawakami *et al.*, 2004) sowie die Mitglieder der atypischen PI3-Kinase verwandten Proteinkinasen (PIKK), die DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK) (Feng *et al.*, 2004) und mTORC2 (Sarbasov *et al.*, 2005) diskutiert. Konsens inzwischen ist, dass das Ser473 unter definierten physiologischen Bedingungen in definierten Zellen nach Wachstumsfaktorstimulation an der Plasmamembran durch mTORC2 (mammalian target of rapamycin complex 2) phosphoryliert wird (Frias *et al.*, 2006; Sarbasov *et al.*, 2005). Sie ist als Hauptkinase in verschiedenen humanen Krebszelllinien (Sarbasov *et al.*, 2005), Fettzelllinien in Mäusen (Hresko and Mueckler, 2005) und während der Embryogenese (Shiota *et al.*, 2006) nachgewiesen worden. Allerdings wird Akt z.B. in der Skelettmuskulatur auch durch einen mTORC2-unabhängigen Mechanismus aktiviert (Bentzinger *et al.*, 2008). Zudem konnte gezeigt werden, dass in Zellen ohne mTORC2 eine Akt mit Myristolierungssequenz (myr-Akt) dennoch an Ser473 phosphoryliert werden kann (Facchinetti *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2009). Dies zeigt, dass also auch wenn mTORC2 die PDK2 zu sein scheint, die anderen bisher identifizierten (und bisher noch nicht identifizierten) Serinkinasen unter bestimmten Bedingungen die Akt-Aktivierung vermitteln. So aktiviert die DNA-PK die Akt als Reaktion auf DNA-Doppelstrangbrüche (Bozulic *et al.*, 2008). Die vollständige Phosphorylierung bzw. Aktivierung von Akt ist also zusammenfassend abhängig vom zellulären und physiologischen Zusammenhang.

Die Aktivierung der Akt ermöglicht dieser die Translokation von der Plasmamembran in das Zytoplasma und in andere Kompartimente wie den Zellkern (Borgatti *et al.*, 2000; Brami-Cherrier *et al.*, 2002; Meier *et al.*, 1997) oder das Mitochondrium (Bijur and Jope, 2003), und induziert die nachfolgende Phosphorylierung von über 50 möglichen Substraten (Manning and Cantley, 2007). Ist die Akt nur an Thr308 phosphoryliert, kann es nur einen Teil seiner Substrate phosphorylieren, erst durch die zusätzliche Phosphorylierung von Ser473 kann die Akt alle ihre Substrate regulieren (Guertin *et al.*, 2006; Jacinto *et al.*, 2006). Ein PI₃-Kinase-unabhängiger Aktivierungsmechanismus der Akt ist Gegenstand intensiver Forschung (Vanhaesebroeck and Alessi, 2000).

Zahlreiche Akt-bindenden Proteine üben einen positiven bzw. negativen Einfluss auf die Regulation der Phosphorylierung, Aktivierung und subzellulären Lokalisation der Akt aus. So bewirken z.B. Hsp90 (Rane *et al.*, 2003; Sato *et al.*, 2000), Tcl1 (Laine *et al.*, 2000; Pekarsky *et al.*, 2000) und Grb10 (Jahn *et al.*, 2002) über Interaktion eine Aktivierungssteigerung der Akt, während z.B. CTMP (Maira *et al.*, 2001), Trb3 (Du *et al.*, 2003) und Keratin10 (Paramio *et al.*, 2001) die Akt angeblich inaktivieren.

Darüber hinaus können verschiedene Phosphatasen Akt in ihrer Aktivität negativ regulieren. Die Phosphatasen PTEN (tumor suppressor phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten) (Stambolic *et al.*, 1998) sowie SHIP (SH2-domain-containing inositol polyphosphate 5-phosphatase) (Huber *et al.*, 1999) inhibieren die Akt-Aktivität indirekt über die Konvertierung von PIP₃ zu PIP₂. Die PP2A (protein phosphatase 2A) und PHLPP α (PH domain leucine-rich repeat protein) inhibieren die Akt-Aktivität über eine direkte Dephosphorylierung von Thr308 und/oder Ser473 (Andjelković *et al.*, 1999; Gao *et al.*, 2005).

Auch microRNA scheint die Akt-Aktivität zu modulieren, z.B. miR320 führt über die Hemmung der p85-Untereinheit der PI₃K zu einer herunterregulierten Akt-Aktivität (Ling *et al.*, 2009). Eine *in-vitro*-Behandlung mit den PI₃-Kinase-Inhibitoren Wortmannin und Lys294002 übt ebenso einen negativen Einfluss auf die Aktivität der Akt aus (Alessi *et al.*, 1996).

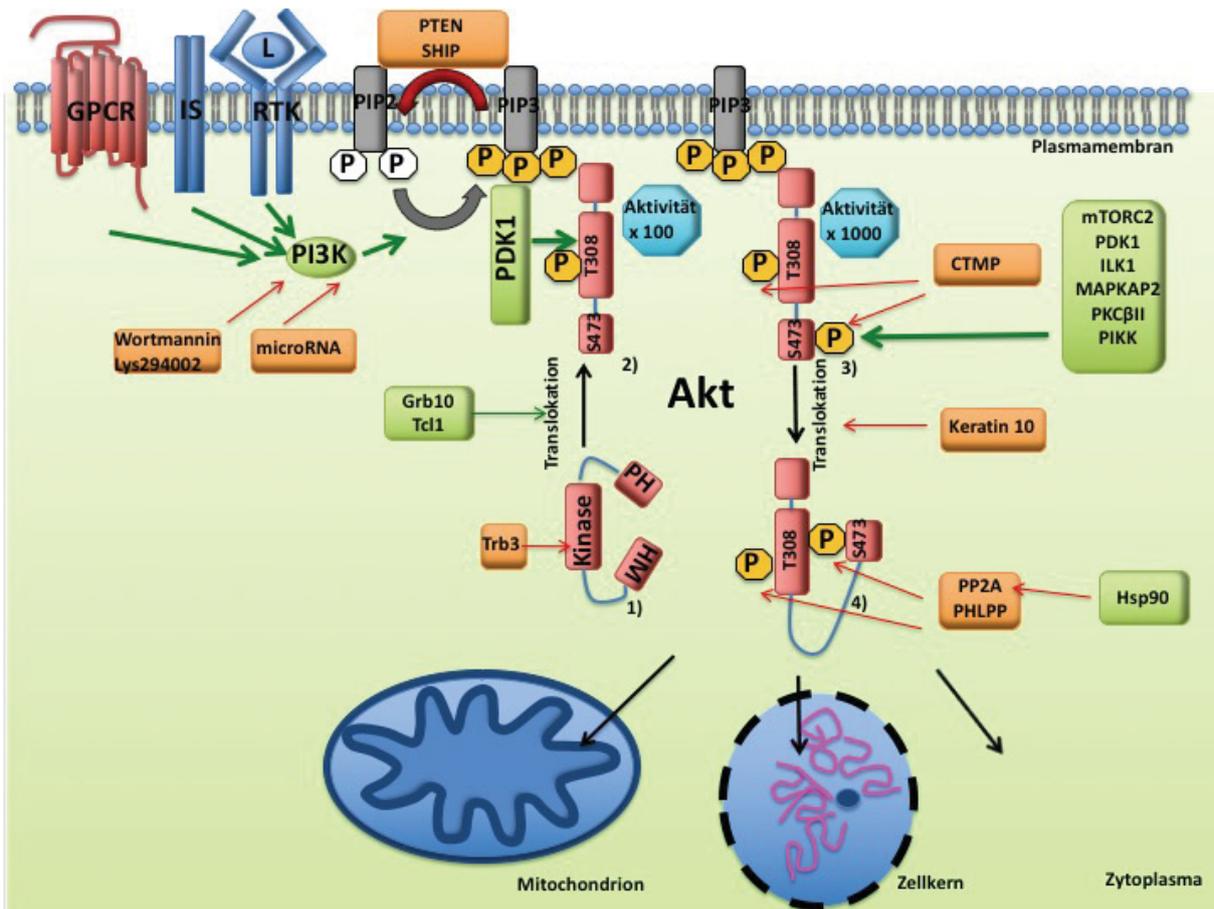


Abb. 3: Schematische Darstellung der Regulation der Akt. Nach Bindung adäquater Liganden an G-Proteingekoppelte Rezeptoren (GPCR) oder Rezeptortyrosinkinasen (RTK) oder Aktivierung des Integrinsignalweges (IS), wird die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) aktiviert. PI3K katalysiert die Konversion von PIP₃ aus PIP₂, wodurch die PDK1 und die Akt über ihre PH-Domänen an die Plasmamembran rekrutiert werden. Die PDK1 phosphoryliert die Akt an Thr308, die PDK2, die abhängig vom zellulären und physiologischen Zusammenhang ist (mTORC2/PDK1/ILK1/MAPKAP2/PKCβ/PIKK), phosphoryliert die Akt an Ser473. Nach maximaler Aktivierung transloziert die Akt von der Plasmamembran entweder ins Zytoplasma, in den Zellkern oder ins Mitochondrium. Positiv regulierend auf die Akt wirken Hsp90, Tcl1 und Grb10 (in grün dargestellt), negativ regulierend auf die PKB wirken PTEN, SHIP, CTMP, Keratin 10, PP2A, PHLPP und Trb3 (in orange dargestellt). Rote Pfeile symbolisieren eine Inaktivierung, grüne Pfeile eine Aktivierung, schwarze Pfeile eine Translokation.

1. 1. 3 Isoformen

Die Akt-Familie setzt sich aus drei Isoformen zusammen: Akt1, 2 und 3.

Die isoformspezifischen Funktionen konnten durch phänotypische Analysen von Akt-isoformspezifischen Knock Out (KO)-Mäusen abgeleitet werden (Gonzalez and McGraw, 2009)

Demzufolge zeigen die Akt-Isoformen spezifische und gemeinsame Funktionen (Abbildung 4). Die isoformspezifischen Funktionen sind Grundlage der vielfältigen Funktionen der Akt bei der Regulation des Zellwachstums, der Proliferation und des Überlebens, des Metabolismus und der Migration (Manning and Cantley, 2007). Darüber hinaus sind die unterschiedlichen isoformspezifischen Funktionen ein möglicher Erklärungsansatz für die beobachteten divergierenden Signalwege (Dummler and Hemmings, 2007).

In den phänotypischen Analysen von isoformspezifischen KO Mäusen wurde in Akt1 KO Mäusen eine Wachstumsretardierung und höhere Apoptoserate im Vergleich zum Wildtypen beobachtet (W. S. Chen

et al., 2001; Cho et al., 2001b; Yang et al., 2004) . Dies weist auf die Bedeutung der Akt1 für zelluläres Wachstum, Proliferation und Überleben hin.

In Akt2 KO Mäusen entwickelte sich hingegen ein Typ-2-Diabetes-ähnlicher Phänotyp mit Glukoseintoleranz und Insulinresistenz (Bae et al., 2003; Cho et al., 2001b; Garofalo et al., 2003; Jiang et al., 2003). Dies deutet auf eine zentrale Stellung der Akt2 in der Aufrechterhaltung der Glukosehomöostase hin.

In Akt3 KO Mäusen wurde eine Entwicklungsstörung des ZNS beobachtet (Easton *et al.*, 2005; Tschopp *et al.*, 2005). Daraus lässt sich ein wichtiger Beitrag der Akt3 für die neuronale Entwicklung ableiten.

Zum tieferen Verständnis der *in-vivo*-Funktionen wurden Mäuse mit simultanem Akt-Isoform-Knock Out generiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass sowohl ein Akt1/Akt2 als auch ein Akt1/Akt3 KO postembryonal (Peng *et al.*, 2003) bzw. embryonal (Yang *et al.*, 2005) letal ist, während jedoch das Fehlen einer einzigen Isoform nicht letal ist (Dummler and Hemmings, 2007; Yang *et al.*, 2005). Die Letalität der kombinierten KO Mäuse ist ein starker Hinweis für die weitreichende Überschneidung der Funktionen und Kompensationsmechanismen der einzelnen Isoformen.

Zusammenfassend zeigen die PKB-Kinasen trotz hoher Sequenzhomologie ein weites Spektrum an isoformspezifischen Funktionen. Erklärungsansätze hierfür können z.B. die unterschiedliche Expression in einzelnen Geweben sein. Ebenso könnte eine verschiedenartige intrazelluläre Lokalisation zur Substratspezifität trotz ähnlicher Struktur beitragen. Auch eine unterschiedliche Aktivierung der Isoformen durch extrazelluläre Stimuli sowie andersartige Regulationsmechanismen müssen in diesem Zusammenhang berücksichtigt werden (Gonzalez and McGraw, 2009; Reinartz *et al.*, 2014).

Schlussfolgernd muss man aber davon ausgehen, dass die geringen Sequenzunterschiede der jeweiligen Isoformen für die isoformspezifischen Funktionen verantwortlich sind.

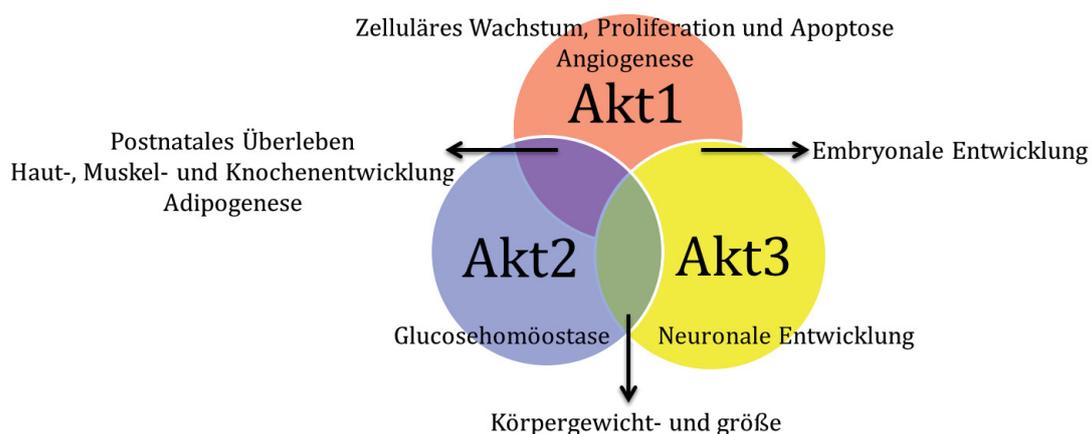


Abb. 4: Darstellung der isoformspezifischen und -überschneidenden Funktionen. Die dargestellten Funktionen wurden aus Phänotypen von separaten und kombinierten Knock Out Mäusen abgeleitet (modifiziert nach Gonzalez and McGraw, 2009).

1.2 Bedeutung der Akt in kardialen Mitochondrien

1.2.1 Mitochondrien im Herzen

Mitochondrien haben sich der Endosymbiontentheorie zufolge vor 1,5 Milliarden Jahren aus der Interaktion zwischen Bakterien und eukaryotischen Zellen entwickelt (Cavalier-Smith, 1987; Gray, 1992). Sie sind dynamische multifunktionelle Organellen in eukaryotischen Zellen und essentiell beteiligt am Energiemetabolismus, der Ionenhomöostase, der Zellzykluskontrolle sowie der ROS-Produktion (McBride *et al.*, 2006).

Eine mitochondriale Dysfunktion ist mit zahlreichen kardialen Pathologien assoziiert, von Arrhythmien über Kardiomyopathien bis hin zum Myokardinfarkt (Andres *et al.*, 2015; Marín-García and Goldenthal, 2002; Neubauer, 2007). Mitochondrien sind in unterschiedlichen Geweben, z.B. Herz und Leber, qualitativ sehr ähnlich, jedoch unterscheiden sie sich im quantitativen Vergleich in gewebespezifischer Proteinabundanz (Forner *et al.*, 2006).

Mitochondrien umfassen 30 - 40 % des zellulären Volumens einer Kardiomyozyte (Page and McCallister, 1973). Die hohe Mitochondriendichte sichert dem Herzen hohe ATP-Konzentrationen für die Kontraktion, Ionenhomöostase und den Metabolismus (Andrienko *et al.*, 2003).

Man differenziert in Kardiomyozyten zwei Subpopulationen von Mitochondrien: die subsarkolemmalen Mitochondrien (SSM) zwischen dem Sarkolemm und die interfibrillären Mitochondrien (IFM) zwischen den Myofibrillen. Diese unterscheiden sich in ihrer Lokalisation, ihrer Morphologie und ihren biochemischen Eigenschaften (Rosca and Hoppel, 2010). Die enge räumliche Nachbarschaftsbeziehung der Mitochondrien mit dem Sarkolemm bzw. den Myofilamenten minimiert die Diffusionsdistanz und erleichtert hiermit die Umwandlung chemischer Energie in mechanische Arbeit (Forner *et al.*, 2006).

1.2.1.1 Mitochondrien und Energiemetabolismus

Eine wesentliche Aufgabe der Mitochondrien im Herzen ist die Energiebereitstellung in Form von Adenosintriphosphat (ATP).

Das Herz verbraucht 6 kg ATP/d (Schwarz *et al.*, 2014). Davon werden ca. 70 % für den kontraktilem Apparat und 30 % für die sarkoplasmatische Retikulum ATPase (SERCA) sowie Ionenhomöostase benötigt (Gibbs, 1978; Suga, 1990).

Unter nichtischämischen Bedingungen werden 95 % des benötigten ATPs im Herzen durch oxidative Phosphorylierung durch die Oxidation von Fettsäuren, Glukose und Tricarboxylaten in Mitochondrien generiert. Weitere, jedoch quantitativ geringere, energiereiche Phosphate (ATP, GTP) entstehen in der Glykolyse und im Citratzyklus (Neely *et al.*, 1972).

Aus den Substraten Fettsäure, Laktat und Glukose werden zunächst die Reduktionsäquivalente NADH^+/H^+ und FADH_2 gebildet. Unter aeroben Bedingungen geben diese ihre Elektronen an die Atmungskette weiter. Durch den aufgebauten elektrochemischen Gradienten kann unter Verbrauch von Sauerstoff und Bildung von Oxidationswasser ADP zu ATP phosphoryliert werden. Der Umsatz von

ATP zu ADP wiederum ermöglicht die reversible Phosphorylierung von Kreatin, das dann zur Pufferung akuter Schwankungen des ATP-Spiegels bereitsteht.

Der relativ niedrige ATP-Gehalt im Herzen ($5 \mu\text{mol/g}$) und die hohe ATP-Hydrolyse-Rate von $30 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ bei einem Sauerstoffverbrauch von $5 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ zeigen, dass der Gesamtumsatz des myokardialen ATPs bei ca. 10 Sekunden liegt. Das bedeutet gleichzeitig, dass die Reservezeit des Myokards bei unterbrochener Durchblutung nur wenige Sekunden beträgt, bevor gravierende funktionelle Konsequenzen auftreten (Stanley et al., 2005a). Unter physiologischen Bedingungen korreliert die ATP-Produktion mit der ATP-Hydrolyse, sodass der ATP-Gehalt im Herzen auch bei erhöhter mechanischer Arbeit konstant bleibt (Balaban, 1990; Balaban *et al.*, 1986; Heineman and Balaban, 1990).

Die Regulation des kardialen Energiemetabolismus ist hierbei abhängig von der arteriellen Substrat- und Hormonkonzentration, dem Koronarfluss sowie dem inotropen und nutritiven Status des Herzens (Stanley *et al.*, 1997; Taegtmeier *et al.*, 2005).

Zahlreiche Regulationsmechanismen ermöglichen dem Herzen eine rasche Anpassung an akute Stresssituationen, ausgelöst durch körperliche Belastung, Nahrungskarenz oder Ischämie. Ein Beispiel ist die Adaptation des Herzmuskels an unterschiedliche Substratspiegel. Unter körperlichen Ruhebedingungen stellen Fettsäuren, Glukose und Laktat mehr als 90 % der Substratversorgung dar, Pyruvat, Ketonkörper und Aminosäuren weniger als 10 %. Bei schwerer Kraftanstrengung und vermehrter Laktatfreisetzung aus dem Skelettmuskel metabolisiert das gesunde Myokard vermehrt Laktat (60 % der Substratversorgung) (Deussen, 2007) und kann hierdurch die Energie- und Ionenhomöostase aufrechterhalten. Das Herz kann daher als metabolischer Omnivore bezeichnet werden.

Die kontraktile Funktion des Herzens wird limitiert durch niedrige ATP-Konzentrationen, hohe ADP-Konzentrationen und reduzierte ATP-Transferkapazität via Kreatinkinase. Wenn der ATP-Bedarf die ATP-Synthese übersteigt, fällt zuerst die Phosphokreatinkonzentration. Erst wenn nur noch wenig Phosphokreatin zur Verfügung steht, sinkt der ATP-Spiegel. Der Phosphokreatin/ATP-Quotient ist somit ein ausdrucksstarker Parameter für den myokardialen Energiestatus (Beer *et al.*, 2002; Nascimben *et al.*, 1996; Saks *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 1999) und ein wichtiger Indikator für systolisches (Neubauer *et al.*, 1995) bzw. diastolisches (Lamb *et al.*, 1999) Herzversagen.

Die effektive Kommunikation zwischen mitochondrialer ATP-Produktion einerseits und zytosolischer ATP-Hydrolyse andererseits ist eine *Conditio sine qua non* für eine suffiziente Synchronisierung von Energiebedarf und Energiebereitstellung.

Abweichungen im mitochondrialen Energiemetabolismus, d.h. pathologische Veränderungen der Stoffwechselsubstrate oder der oxidativen Phosphorylierung, führen zu einem chronischen Energiedefizit und einer konsekutiven myokardialen Dysfunktion (Rosca and Hoppel, 2010).

1. 2. 1. 2 Mitochondrien und Calcium

Unter physiologischen Bedingungen resultiert der sog. mitochondriale Calciumzyklus in Kardiomyozyten in einer Heraufregulation der ATP-Produktion (Jouaville *et al.*, 1999).

Der Zyklus beginnt mit der Calciumfreisetzung aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) über Rynaodinrezeptoren und dem Öffnen der Inositol 1,4,5,-triphosphat (IP₃)-Kanäle (Rizzuto *et al.*, 1998a), sodass die Calciumionen in den Mitochondrien akkumulieren können.

Die Calciumionen aktivieren in der Matrix die Dehydrogenasen des Citratzyklus und die F₀F₁-ATPase (Balaban, 2002), wodurch die oxidative Phosphorylierung bzw. ATP-Erzeugung gesteigert wird (Denton *et al.*, 1978; McCormack *et al.*, 1990). Durch den simultanen Import von Calciumionen via eines Ca²⁺-Uniporters und den Export eines Na⁺/Ca²⁺ (NCX) Austauschers können außerdem zytoplasmatische Calciumfluktuationen gepuffert werden (Berridge *et al.*, 2003; Mackenzie *et al.*, 2004). Unter diesem Gesichtspunkt dienen die Mitochondrien der zellulären Calciumhomöostase und sind somit protektiv gegenüber Calciumüberladung und einer konsekutiven mitochondrialen Dysfunktion bzw. Apoptose (Jacobson and Duchon, 2004).

Während der NCX bei steigender Ca²⁺-Konzentration in der mitochondrialen Matrix eine Sättigung erfährt, zeigt der Uniporter keine Sättigungsgrenze, sodass ab einem gewissen Schwellenwert die mitochondriale Ca²⁺-Konzentration disproportional ansteigt. Wenn dieser Grenzwert überschritten wird, wird die ATP-Synthese inhibiert (Holmuhamedov *et al.*, 2001), die PTP (mitochondriale permeability transition pore) geöffnet und die ROS (reactive oxygen species)-Produktion (Brookes *et al.*, 2004) gesteigert. Dies führt zum Zelltod (Bernardi, 1999; Rizzuto *et al.*, 2000). Der Calcium-vermittelte Zelltod wird u.a. als Konsequenz einer myokardialen Ischämie/Reperfusions-Verletzung diskutiert (Gustafsson and Gottlieb, 2008). Dies hat eine wichtige Bedeutung in der Entwicklung therapeutischer Strategien bei I/R. Wenn beispielsweise der Ca²⁺-Uniporter durch Rutheniumrot oder Ru360 inhibiert wird, kann die myokardiale Infarktgröße signifikant reduziert werden (García-Rivas *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006).

1. 2. 1. 3 Mitochondrien und ROS-Produktion

Als Nebenprodukt der mitochondrialen Elektronentransferaktivität entstehen natürlicherweise reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (Ikeda *et al.*, 2015).

Eine mitochondriale Dysfunktion führt zu einer pathologisch gesteigerten ROS-Produktion. Dadurch entsteht ein Kausalkreis mit positiver Rückkopplung, d.h. die ROS-Konzentration provoziert oxidativen Stress innerhalb der betroffenen und benachbarten Mitochondrien einer Zelle, der wiederum die ROS-Produktion stimuliert- eine ROS-induzierte ROS-Freisetzung (Zorov *et al.*, 2014). Um diesen Teufelskreis zu verhindern, verfügen Kardiomyozyten über einen besonderen Schutzmechanismus: mitochondriale Autophagie (Thomas and Gustafsson, 2013; Youle and van der Bliek, 2012). Die Mitophagie ist eine interne Qualitätskontrolle.

Mitochondrien agieren als O₂-Sensoren (Chandel and Schumacker, 2000) und können unter Hypoxie bzw. oxidativem Stress über eine gesteigerte ROS-Produktion Adaptationsprozesse einleiten. Hierbei wirkt ROS als second messenger, der u.a. die p38 Kinase in hypoxämischen Kardiomyozyten aktiviert (Kulisz *et al.*, 2002; Marín-García and Goldenthal, 2004).

Zum anderen spielen ROS eine zentrale Rolle in der Organentwicklung. Der Knock Out der Thioredoxin Reduktase führte bei den KO-Mäusen zu einer Malformation der Organe, einschließlich des Herzens. Die Inaktivierung des Gens im Herzen resultierte in einer dilatativen Kardiomyopathie (Conrad *et al.*, 2004; Fantel and Person, 2002).

Zusammenfassend sind ROS unter physiologischen Bedingungen wichtig als intrazelluläre Signalmetabolite, jedoch kann eine erhöhte ROS-Produktion unter pathologischen Bedingungen schädlich sein (Schwarz *et al.*, 2014).

1. 2. 1. 4 Mitochondrien und Zellkontrolle

Die Apoptose einer Zelle kann durch den extrinsischen oder den intrinsischen, den sog. mitochondrialen, Weg initiiert werden (Löffler, 2008). Durch die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien wird der intrinsische Weg initiiert. Cytochrom c bindet dann an Apaf-1, das wiederum die Initiatorcaspase 9 aktiviert. Die Apoptose wird u.a. durch pro- und antiapoptotische Proteine der Bcl-2-Familie kontrolliert (Bruckheimer *et al.*, 1998). Die Proteine können klassifiziert werden in Bcl-2-ähnliche antiapoptotische Faktoren (u.a. Bcl-2, Bcl-XL), Bax-ähnliche proapoptotische Faktoren (u.a. Bax, Bak) und BH3 proapoptotische Faktoren (u.a. Bad, Bim, Bid, PUMA, NOXA ect.) (Skommer *et al.*, 2007).

Das Protein Bcl-2 ist im Herzen essentiell für die Regulation der Apoptose (Gustafsson and Gottlieb, 2008). In einem Transgenen Mausmodell mit überexprimiertem Bcl-2 im Herzen wurden eine reduzierte Infarktgröße, verbesserte Wiederherstellung der kardialen Funktion nach I/R-Insult und eine geringere Apoptosezellzahl gemessen (Brocheriou *et al.*, 2000; Z. Chen *et al.*, 2001; Imahashi *et al.*, 2004). Kardiale Erkrankungen korrelieren mit sinkenden Bcl-2-Konzentrationen (Condorelli *et al.*, 1999). Erklärungsansätze hierfür können eine Bcl-2-vermittelte Blockade der mPTP-Öffnung (Zhu *et al.*, 2001), die Inhibition der proapoptotischen Proteine Bax/Bak (Gustafsson and Gottlieb, 2007) und der Bcl-2-vermittelte reduzierte ATP-Verbrauch sein (Imahashi *et al.*, 2004).

In der Regulation der Apoptose im Herzen scheint das Protein Bax ein Antagonist zu Bcl-2 zu sein. In einem Transgenen Mausmodell mit einem Bax-Knock Out wurden ebenso eine reduzierte Infarktgröße, eine verbesserte Wiederherstellung der kardialen Funktion nach I/R-Insult und eine geringere Apoptoserate gemessen (Gustafsson *et al.*, 2004; Hochhauser *et al.*, 2003). Die BH3-only Proteine (Bid, Puma, Bnip3 und Nix/Bnip3L) scheinen wie Bax einen proapoptotischen Effekt in Kardiomyozyten auszuüben (Hamacher-Brady *et al.*, 2007; Toth *et al.*, 2006; Yussman *et al.*, 2002).

1. 2. 2 Bedeutung der Akt in kardialen Mitochondrien

Die Akt übt einen essentiellen Einfluss auf viele mitochondriale Funktionen im Herzen aus. Sie wirkt regulierend auf den Energiemetabolismus, die ROS-Produktion sowie die Ionenhomöostase (Abbildung 5).

Die aktivierte Akt transloziert sequentiell in alle mitochondrialen Membranfraktionen bis in die mitochondriale Matrix. Experimentell konnte gezeigt werden, dass nach Insulinstimulation hauptsächlich die Akt1 in die Mitochondrien transloziert, jedoch bei Fehlen von Akt1 die Akt2-Isoform kompensatorisch vermehrt transloziert (Yang et al., 2013).

Studien zufolge steigert die Akt1 die Effektivität der ATP Synthese. So konnte bisher gezeigt werden, dass die mitochondriale Akt1 die ATP-Synthase-Aktivität um 24 % steigert (Yang et al., 2013).

Da eine beeinträchtigte mitochondriale oxidative Phosphorylierung und niedrige ATP-Syntheserate sowohl bei Diabetischer Kardiomyopathie (Rubler *et al.*, 1972; Scheuermann-Freestone *et al.*, 2003) als auch beim Diabetes (Pierce and Dhalla, 1985) beobachtet worden sind, scheint die Akt durch den positiven Effekt auf den Energiemetabolismus zytoprotektiv zu wirken.

Adulte Kardiomyozyten sind nicht proliferationsfähig, d.h. der Zelluntergang von Kardiomyozyten führt zu einem irreversiblen Verlust von funktionsfähigem Herzgewebe. Der Zelltod von Kardiomyozyten ist wiederum ein elementarer Mechanismus in der Pathogenese von Kardiomyopathien ischämischen oder nichtischämischen Ursprungs (Adams *et al.*, 2000; Olivetti *et al.*, 1997; Valen, 2003). Dadurch, dass die Akt die mitochondriale Integrität schützt, wirkt sie antiapoptotisch und damit kardioprotektiv (Lai *et al.*, 2003; Plas *et al.*, 2001). Zahlreiche Proteine der Bcl-2-Familie werden durch Akt auf transkriptionaler, translationaler und posttranslationaler Ebene reguliert. Der antiapoptotische Effekt der mitochondrialen Akt wird dabei nicht nur durch direkte Effekte innerhalb der Mitochondrien, sondern auch- wie aus der Abbildung 5 zu entnehmen ist- durch die indirekte Regulation zytoplasmatischer (z.B. via Hsp27->BAD und Hsp20->BAX) und nukleärer (z.B. via p53 und FOXO) Moleküle ausgeübt (Miyamoto *et al.*, 2009b).

Auch die Akt-vermittelte Inhibition von Gsk-3 β wirkt kardioprotektiv gegenüber einer I/R (Tong *et al.*, 2000). Die GSK-3 ist ein Schlüsselenzym in der Glykogensynthese. Es gibt 2 Isoformen, GSK-3 α und Gsk-3 β . (Embi *et al.*, 1980). Die Gsk-3 β ist zytoplasmatisch und mitochondrial lokalisiert. Erkenntnisse aus Studien mit einem Transgenen Mausmodell (Gomez *et al.*, 2008) und Insulinstimulation (Juhaszova *et al.*, 2004) geben einen deutlichen Hinweis darauf, dass die Akt-vermittelte Phosphorylierung und konsekutive Inhibition der Gsk-3 β auf mitochondrialer Ebene stattfinden.

Durch die Inhibition von Gsk-3 β in Kardiomyozyten wird zudem das Gsk-3 β vermittelte Öffnen der MPTP (mitochondrial permibility transition pore) verhindert (Gomez *et al.*, 2008) (Abbildung 5). Es wird angenommen, dass die Gsk-Inhibitoren den mitochondrialen ATP-Verbrauch (durch eine umgekehrt arbeitende F₀F₁-ATPase) während der Ischämiephase durch reduzierte V_{dac}2-Phosphorylierung senken. Der geringere ATP-Transport in die Mitochondrien resultiert in einem niedrigeren mitochondrialen Membranpotential, sodass in der Reperfusionsphase die Mitochondrien vor

Ca²⁺-Überladung und reaktiver ROS-Produktion geschützt sind (Das *et al.*, 2008). Darüber hinaus führt die Akt-induzierte Inhibition von Gsk-3 β zur Disinhibition von Mcl-1 (Hirota *et al.*, 2007) und zur gesteigerten Assoziation von Bcl-2 mit Mitochondrien (Das *et al.*, 2008).

Der Akt-vermittelte Einfluss auf die mitochondriale Hexokinase II (HKII) hat ebenso kardioprotektive Konsequenzen. HKII ist dabei die Hauptisoform in insulin sensitiven Geweben sowie im Herzen (Wilson, 2003). Es konnte bisher nachgewiesen werden, dass die HKII in einem Akt-vermittelten Signalweg Kardiomyozyten vor ROS und Ca²⁺-Überladung induzierter MPTP schützt (Chiara *et al.*, 2008; Miyamoto *et al.*, 2008). Die Akt kann HKII direkt an Thr 473 phosphorylieren, wodurch die Bindung von HKII an den Vdac und ihr mitochondrialer ATP-Verbrauch zur Glukosephosphorylierung gesteigert werden können. Dies scheint ein protektiver Mechanismus unter hypoxämischen Bedingungen, z.B. im Rahmen einer Ischämie, zu sein. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass bei Überexpression von Akt auch die HK-II-Proteinexpression gesteigert ist. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Akt die HKII unter akutem Stress durch direkte Phosphorylierung, und unter chronischem Stress auf Transkriptionsebene steigert (Miyamoto *et al.*, 2009a). Die Gsk-3 β phosphoryliert den Vdac und hemmt dadurch die Bindung von HKII an den Vdac. Dadurch, dass die Akt Gsk-3 β inhibiert, steigt indirekt die HKII-Bindungsrate an den Vdac (Miyamoto *et al.*, 2009b).

Die Akt inhibiert außerdem durch Phosphorylierung den kardialen NHE (Na⁺/H⁺ exchanger) (Snabaitis *et al.*, 2008) und steigert die Expression des NCX (Na⁺/Ca²⁺- exchanger) (Miyamoto *et al.*, 2005), wodurch unter pathophysiologischen Bedingungen eine zytoplasmatische bzw. mitochondriale Ca²⁺-Überladung verhindert werden können.

Zusammenfassend scheint die Akt im Herzen über zahlreiche Signalwege die mitochondriale Integrität und dadurch den Metabolismus und das Überleben der Kardiomyozyten zu sichern.

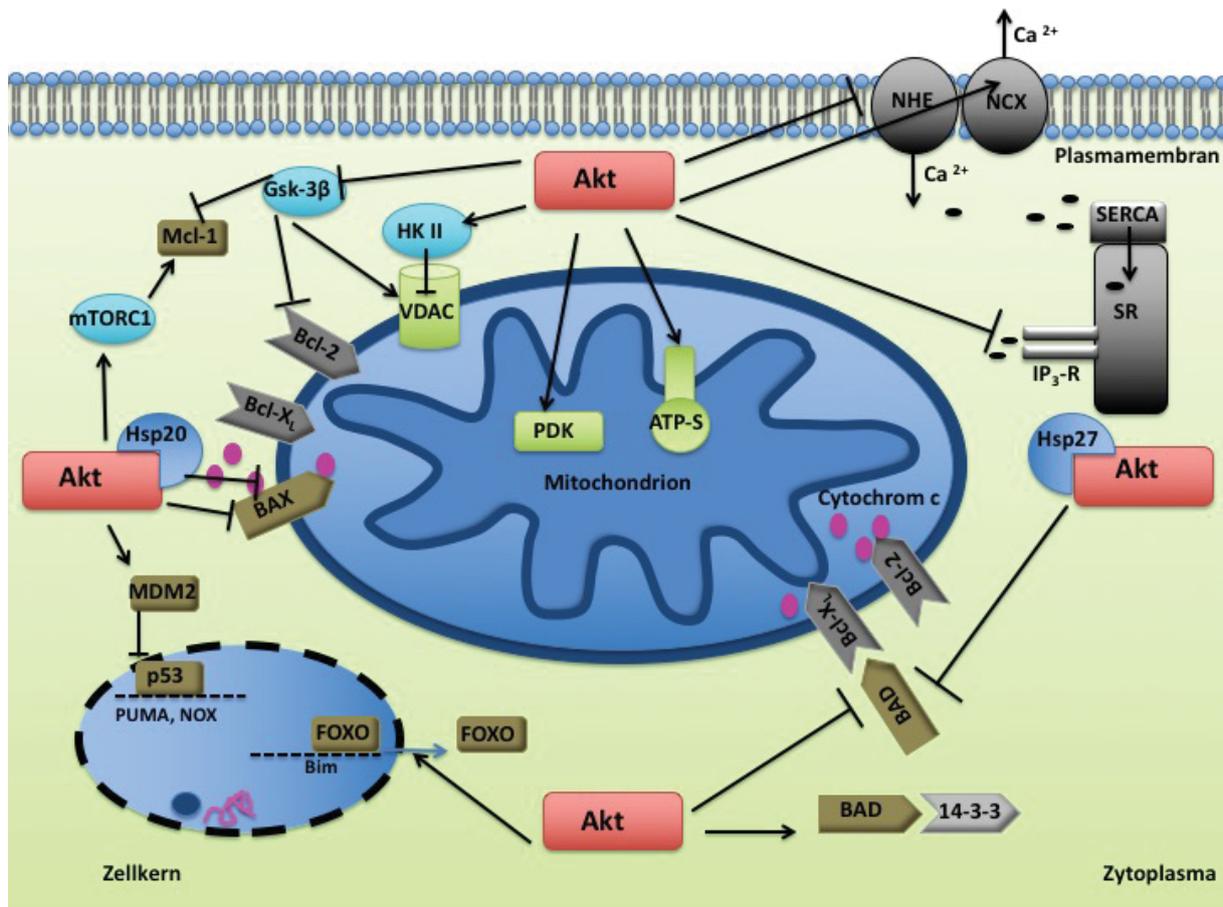


Abb. 5: Darstellung der wesentlichen Signalwege der Akt in kardialen Mitochondrien. Die Akt übt in Mitochondrien u.a. einen Einfluss auf den Metabolismus, die Ionenhomöostase sowie die Apoptose aus und wirkt hierdurch kardioprotektiv (modifiziert nach Sussman, 2009).

1.3 Fragestellung

Die Funktion kardialer Mitochondrien wird durch vielfältige Signaltransduktions- und Regulationsmechanismen beeinflusst. Insbesondere die Proteinphosphorylierung ist ein essentielles Element in der Signaltransduktion, durch die die mitochondriale Aktivität reguliert wird.

Zum Verständnis dieser Prozesse ist es Ziel dieser Arbeit, mitochondriale Proteine des Herzens zu identifizieren, die durch Akt entweder direkt oder indirekt in ihrem Phosphorylierungsgrad moduliert werden. Durch die Kombination induzierbarer Kardiomyozyten-spezifischer Akt1 und Akt2 KO (iCMAkt1 KO bzw. iCMAkt2 KO) Mäuse mit einer effektiven Mitochondrienisolation und einem quantitativen Phosphoproteomic-Ansatz wurde untersucht, ob sich Akt-isoformabhängig phosphorylierte Proteine in kardialen Mitochondrien nachweisen lassen.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Laborgeräte

Gerät und Bezeichnung	Firma
Analysenwaage EMB 200-2	Kerner&Sohn
Autoklav	Webeco
Eismaschine	Ziegra
Electrophoresis Power Supply	Fisher Scientific
Feinwaage BP121S	Sartorius
Gefrierschrank, -20°C	Privileg
Gefrierschrank, -80°C	Revco
Gelkammer, SE 400 Sturdier Vertical Electrophoresis	Hoefler Scientific Instruments
Gelkammern, Hoefer SE 600 Ruby	Amershyon Bioscience/GE Healthcare
GentleMACS Dissociator	Miltenyi Biotec
Infrarot-Bildgebungssystem, Odyssey	LI-COR Biosciences
Kühlschrank	Privileg
LC, Ultimate 3000	Dionex Corporation
Magnet	Miltenyi Biotec
Magnetrührer MR 3001	Heidolph
Magnetwand	Miltenyi Biotec
Massenspektrometer, LTQ Orbitrap XL	Thermo Scientific
Mikrowelle	AEG
ph-Elektrode, InLab Micro	Mettler-Toledo
ph-Meter, MP 220	Mettler
Pierce G2 Fast Blotter	Thermo Scientific
Pipetten, Pipetman 10-1000 µl	Gilson
Plattenphotometer, SpectraCount	Packard
Rotor-Shake Genie	Scientific Industries
SDS-PAGE Laufkammer, SE600-SE400	Hoefler Instruments
Spectrafuge Mini Centrifuge	Labnet
Stickstofftank, Arpege 110	Air Liquide
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Ultimate 3000-RT-LC-Säule	Thermo Fisher Scientific
Ultrazentrifuge	wird ergänzt
Vakuumzentrifuge, Savant SPD 131DPA	Thermo
Vortex, Vortex-Genie 2	Heidolph
Zentrifuge 5417R, 5810R	Eppendorf

2.2 Verwendete Antikörper

2.2.1 Primäre Antikörper

Name	Herkunft	Verdünnung	Referenz	Produktnummer
Akt (pan) (40D4)	mouse	1:2000	Cell Signaling	#2920
Akt (pan) (C67E7)	rabbit	1:1000	Cell Signaling	#4691
Akt1 (C73H10) monocl.	rabbit	1:1000	Cell Signaling	#2938
Akt1 monocl.	mouse	1:1000	Cell Signaling	#2967
Akt2 (D6G4)XP	rabbit	1:1000	Cell Signaling	#3063
Akt2 monocl.	mouse	1:1000	Cell Signaling	#5239
ATP5A1	rabbit	1:500	Proteintech	14676-1-AP
Catalase	mouse	1:1000	Cell Signaling	#12980
Caveolin 3	mouse	1:1000	BD Transduction Laboratories	610420
EEA1	rabbit	1:1000	Abcam	ab2900
ENO1	rabbit	1:1000	Abcam	ab85086
Histone H3	rabbit	1:1000	Cell Signaling	#9715
LAMP1	rabbit	1:1000	Cell Signaling	#3243
Na, K-ATPase	rabbit	1:1000	Cell Signaling	#3010
Phospho-Akt (Ser473)	rabbit	1:1000	Cell Signaling	#9271
Phospho-Akt (Thr308)	rabbit	1:1000	Cell Signaling	#4056
Phospho-Akt1 (Ser473)	rabbit	1:1000	Cell Signaling	#9018
Phospho-Akt2 (Ser473)	rabbit	1:1000	Cell Signaling	#8599

2.2.2 Sekundäre Antikörper

Name	Herkunft	Verdünnung	Referenz	Produktnummer
Anti-MouseIR Dye®680	goat	1:10.000	LI-COR	926-32220
Anti-MouseIR Dye®800	goat	1:10.000	LI-COR	926-32210
Anti-RabbitIR Dye®680	goat	1:10.000	LI-COR	926-32221
Anti-RabbitIR Dye®800	goat	1:10.000	LI-COR	926-32211

2.3 Verwendete Computerprogramme

Microsoft Excel, Microsoft Word, Microsoft Powerpoint, Odyssey 3.0 (Licor Biosciences, Lincoln, USA), Plate Reader Vision 3.0 (Packard Bioscience/Perkin Elmer, Waltham, USA). Alle weiteren Programme sind im direkten Zusammenhang des Experiments erläutert.

2.4 Transgenes Mausmodell

In dieser Doktorarbeit wurden konditionale Akt Knock Out Mäuse mit einem kardiomyozytenspezifischem Hintergrund (induzierbare kardiomyozytenspezifische Akt1 KO und Akt2 KO: iCMAkt1 KO und iCMAkt2 KO) eingesetzt. Die Mäuse wurden in den Tierställen der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine Universität in Düsseldorf gehalten (Aktenzeichen 84-02.04.2014.A209 und 84-02.04.2014.A308; Organentnahmen erfolgten unter O16/04). Den Mäusen standen Wasser und Futter ad libitum zur Verfügung.

Zur Erzeugung von induzierbaren kardiomyozytenspezifischen Akt KO Mäusen wurde die Cre/loxP Rekombinase-Technik eingesetzt. Bei dieser Methode katalysiert das Enzym Cre (causes recombination) die Rekombination zwischen zwei loxP-Elementen (locus of crossing over). Durch das Cre/loxP-Rekombinationssystem können DNA-Sequenzen zwischen den loxP-Elementen aus dem Genom herausgeschnitten werden (Hoess *et al.*, 1982).

Das Enzym Cre wird durch induzierbare und gewebespezifische Promotoren kontrolliert. Als Promotor wurde die kardiomyozytenspezifische α -MHC (myosin heavy chain) gewählt (Sohal *et al.*, 2001).

Um einen regulierbaren KO zu induzieren, wurde das Enzym Cre sowohl N- als auch C-terminal mit der mutierten Liganden-Bindungs-Domäne des Östrogen-Rezeptors (mer) fusioniert, wodurch die Cre zunächst inaktiv im Zytoplasma liegt (Littlewood *et al.*, 1995). Durch Applikation eines Liganden der mer, dem Östrogen-Antagonisten 4-OH-Tamoxifen (OHTX), kann sich die Cre aus dem inaktivierenden Komplex mit Hitze-Schock-Proteinen lösen, in den Nukleus translozieren und dort eine Sequenz deletieren (Sohal *et al.*, 2001). Die Zugabe von OHTX ermöglicht somit eine zeitlich kontrollierbare Induktion des KO.

Die Erzeugung der konditionalen Akt1 KO und Akt2 KO Maus durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen erfolgte im Institut für Herz-und Kreislaufphysiologie durch Dr. Stefanie Gödecke (Raupach, 2010). Homozygote transgene Mäuse wurden dann mit einer α -MHC mer-Cre-mer Mauslinie gepaart (Molkentin and Robbins, 2009). Zur Induktion des CM-spezifischen KO wurde den Nachkommen im Alter von 12 Wochen an 5 aufeinander folgenden Tagen jeweils 50 μ g OHTX in 100 μ l Erdnussöl i.p. (intraperitoneal) injiziert. Dies aktivierte die Cre spezifisch in Kardiomyozyten, wodurch die geflochtenen Exons deletiert wurden. Es entstand somit ein kardiomyozytenspezifischer, konditionaler KO für das jeweilige Gen mit kardiomyozytenspezifischem Hintergrund. Die untersuchten Mäuse waren adult, vergleichbaren Alters und weiblich.

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

2.5 Insulinstimulation

Für die Phosphoproteomstudie wurden die Mäuse mit Insulin stimuliert. Zur optimalen Insulinstimulation wurde den Mäusen über Nacht Futter entzogen. Den Mäusen (+ Insulin) wurde eine körperrgewichtsadaptierte Insulindosis (30 IU/kg) i.p. injiziert. Der Kontrolle (- Insulin) wurde PBS appliziert. Nach fünfzehn Minuten Wirkungszeit wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet. Die Mäuse wurden danach ordnungsgemäß präpariert und die Herzen entnommen.

2.6 Mitochondrienisolation

Insgesamt wurden 3 Methoden zur Mitochondrienpräparation eingesetzt.

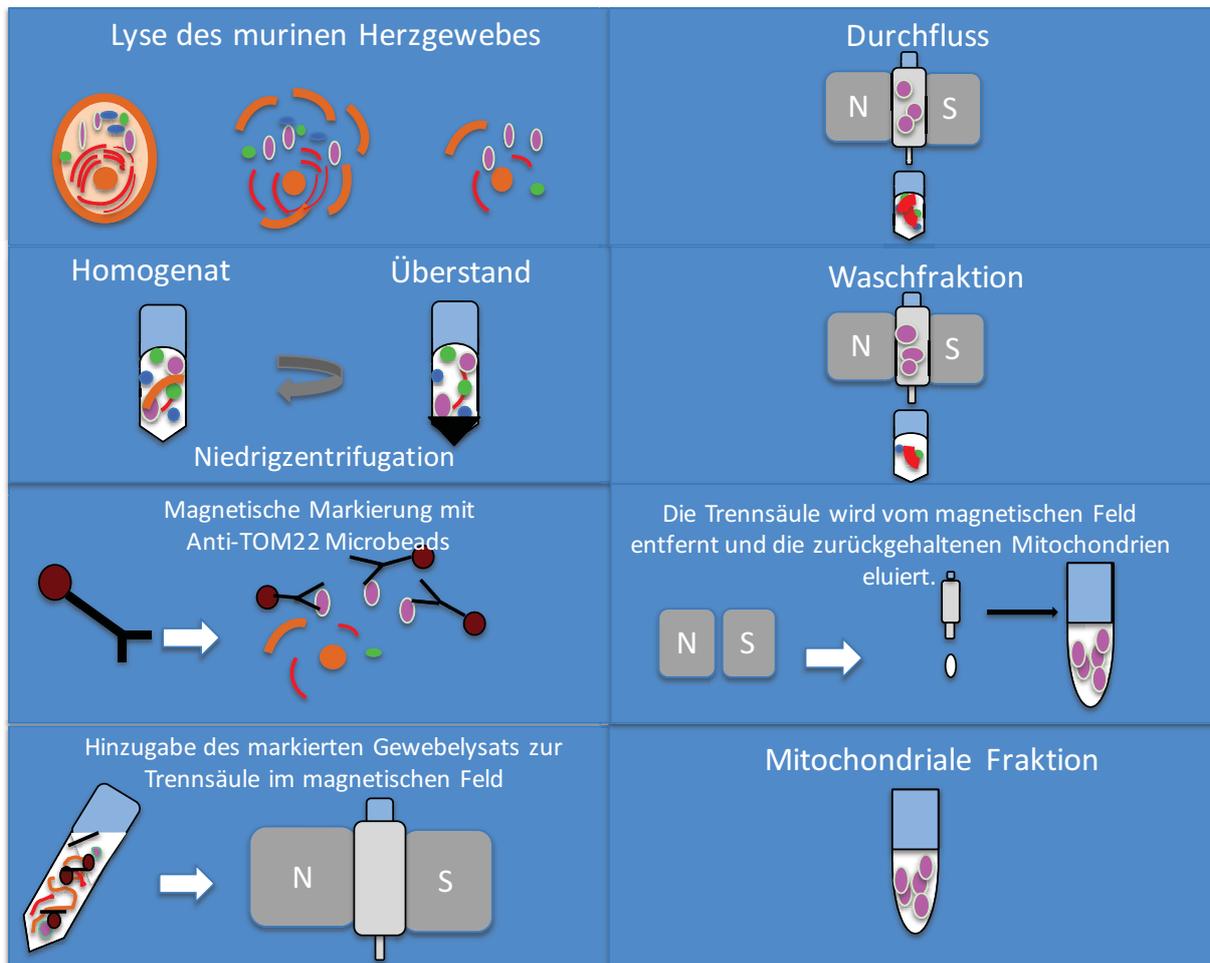


Abb. 6: Schematischer Aufbau des Antikörper-basierten Trennverfahrens (modifiziert nach Protokoll „Mitochondria Isolation Kit, mouse tissue“ von Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland).

2.6.1 Antikörper-basiertes magnetisches Auftrennverfahren

Das Antikörper-basierte Trennverfahren via magnetischer Beads wurde nach einem modifizierten Protokoll des Herstellers mit dem Mitochondria Isolation Kit und dem Mitochondria Extraction Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) durchgeführt (Abbildung 6). Das Extraction Kit enthält die Lösungen 1-3, deren Inhaltsstoffe und Zusammensetzung dem Herstellergeheimnis unterliegen (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland). Aus der Lösung 2 werden der „Protease- und Phosphataseinhibitionsbuffer“ und aus den Lösungen 1 und 2 der „Extraktionspuffer“ zubereitet. Zusätzlich stammt aus dem Isolation Kit der sog. „Separationspuffer“ sowie der „Speicherpuffer“.

Das Herzgewebe wurde zunächst zweimal in 4 ml Lösung 2 gewaschen. Anschließend wurden das Fettgewebe und die Atrien entfernt. Danach wurde das Herzgewebe gewogen und auf ein standardisiertes Gewicht von 100 mg angeglichen. Dieses wurde mit einer Schere in ca. 5 mm kleine Stücke zerkleinert und in 0,5 ml Extraktionspuffer für dreißig Minuten bei 4°C inkubiert. Nach

Zentrifugation des Aufschlusses bei 300 g für fünf Minuten und 4°C, wurde der resultierende Überstand verworfen.

Das Pellet wurde in 2 ml Protease- und Phosphataseinhibitionsbuffer resuspendiert und in ein C-Tube (Miltenyi Biotec) überführt. Das C-Tube wurde in den GentleMacs Homogenisator installiert und mit dem Programm m_mito_tissue_01 für 59 sec. homogenisiert. Nach dem enzymatischen und mechanischen Aufschluss wurde das Lysat bei 200 g für 30 sec. bei 4°C kurz zentrifugiert, um Gewebetrümmer am Tubeboden zu sammeln. Dieses Homogenat wurde danach auf 70 µm Filter pipettiert und das Filtrat in einem 15 ml Falcon Röhrchen aufgefangen. Der Filter wurde zweimal mit 1 ml Lösung 3 gewaschen. Das filtrierte Homogenat wurde anschließend bei 500 g für fünf Minuten und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 15 ml Falcon überführt und mit Separationspuffer auf 10 ml aufgefüllt. Nach ordentlichem Durchmischen wurden 50 µl MicroBeads appliziert. Hierbei handelt es sich um eine Kolloidsuspension aus extrem kleinen magnetischen Partikeln mit einem Durchmesser von 50 nm. Diese Beads sind mit einem monoklonalen anti-TOM22-Antikörper konjugiert, wodurch sie spezifisch an die 22 kDa Translokase der äußeren Mitochondrienmembran (TOM22) binden können. Dadurch werden die Mitochondrien magnetisch markiert und können innerhalb eines magnetischen Feldes eines MACS Separators (Miltenyi Biotec) isoliert werden.

Die Inkubation der Mitochondrien mit den magnetischen MicroBeads erfolgte für 1 h unter ständiger Rotation bei 8°C.

Nach der Inkubation wurde die Suspension auf Trennsäulen mit einem 30 µm Filter pipettiert. Diese Trennsäulen wiederum sind in einem magnetischen Feld über einen MACS Separator platziert, sodass die magnetisch markierten Mitochondrien innerhalb der Säulen durch Magnetkräfte zurückgehalten werden, während nicht magnetisch markierte Zellbestandteile durchfließen.

Nach Probenauftragung wurde die Trennsäule fünfmal mit Separationspuffer gewaschen. Danach wurde die Säule dem magnetischen Feld entzogen und die Mitochondrien durch einen Stempel mit 1,5 ml Separationspuffer eluiert. Das gesamte magnetische Auftrennverfahren wurde in der Kühlkammer bei 8°C durchgeführt, um die funktionelle Integrität der Mitochondrien aufrechtzuerhalten.

Das Eluat wurde bei 13.000 g für acht Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml Lösung F resuspendiert. Es folgte ein zweiter Zentrifugationsschritt bei 13.000 g für acht Minuten bei 4°C. Der resultierende Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml Speicherpuffer resuspendiert und in Flüssigstickstoff transportiert bzw. bei -80°C gelagert.

Alle Schritte wurden unter 4°C und regelmäßiger Zugabe von Protease- (Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche, Deutschland) und Phosphataseinhibitoren (Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets, Roche, Deutschland) durchgeführt. Der Einsatz der Inhibitoren erfolgte protokolltreu nach Herstellerangaben.

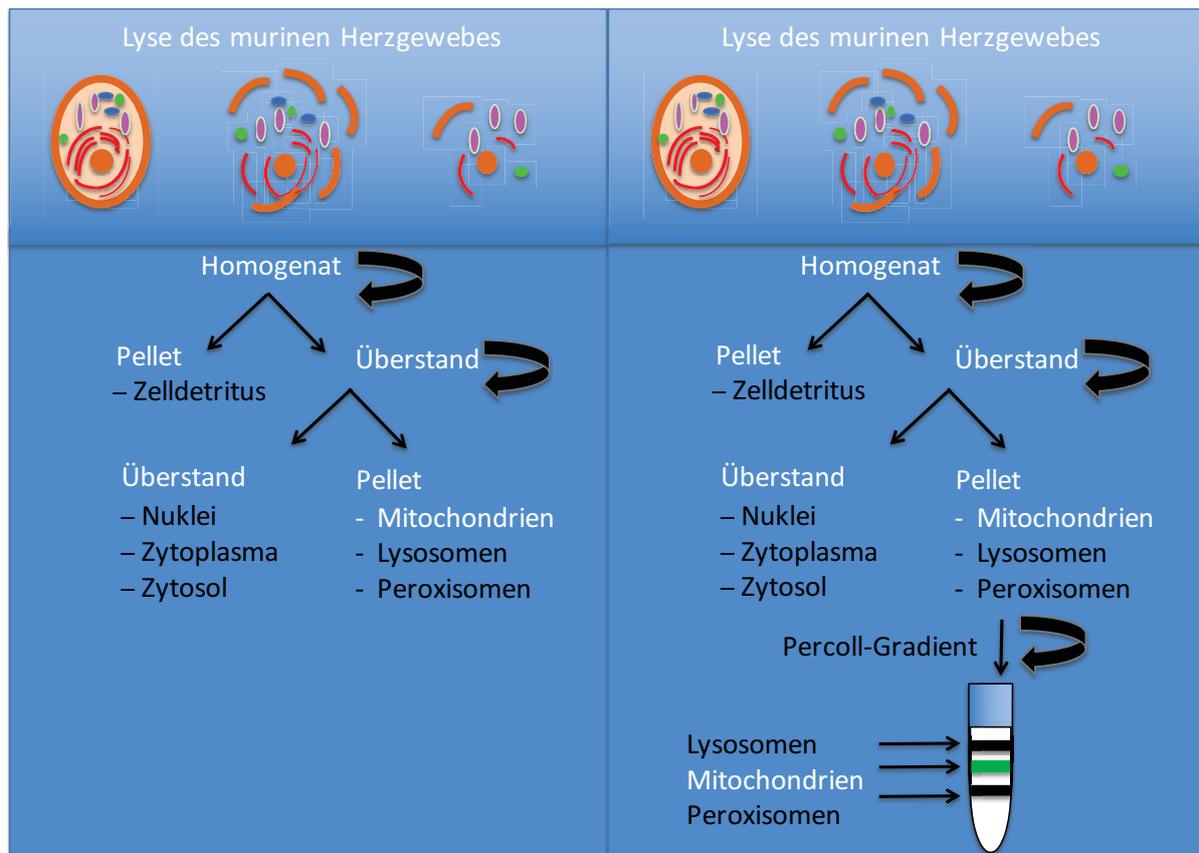


Abb. 7: Schematischer Aufbau der Methode der Differentialzentrifugation (links) und der Dichtegradientenzentrifugation (rechts).

2. 6. 2 Differentialzentrifugation

Das Protokoll zur Mitochondrienisolation mittels Differentialzentrifugation (Abbildung 7) stammt aus der Kooperation mit der AG Haendeler und Altschmied aus dem Leibniz-Institut für Umweltmedizinische Forschung Düsseldorf und wurde leicht modifiziert. Das Herzgewebe wurde zunächst dreimal in eisgekühltem PBS gewaschen. Anschließend wurden Fettgewebe und Vorhöfe entfernt. Danach wurde das Herzgewebe gewogen und auf ein standardisiertes Gewicht von 100 mg angeglichen. Im nächsten Schritt wurde es mit einer Schere grob zerkleinert und in ein C-Tube (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) bestehend aus 10 ml Waschpuffer aufgenommen. Diesem wurden 0,25 ml der Trypsinlösung hinzugegeben und sieben Minuten lang in einem Eisbad inkubiert. Danach folgte der weitere mechanische Aufschluss mithilfe des GentleMACS mit dem Programm m_mito_tissue_01 für 59 sec. Nach weiteren fünfzehn Minuten Inkubation wurden 5 ml der Trypsinlösung hinzugefügt und für eine Minute inkubiert. Das Homogenat wurde dann bei 800 g für neun Minuten bei 4°C zentrifugiert, wodurch Zelldetritus und Nuclei als Pellet eliminiert wurden. Der Überstand wurde erneut bei 10.000 g für fünfzehn Minuten bei 4°C zentrifugiert, wodurch mit dem Überstand Zytoplasma und zytosolische Kontaminanten entfernt wurden. Das resultierende Pellet wurde dann in 50 µl sog. Mitopuffer aufgenommen.

PBS:

137 mmol/l	NaCl
2,7 mmol/l	KCl
8,1 mmol/l	Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O
1,76 mmol/l	KH ₂ PO ₄
pH 7,4	

Mitochondrienpuffer:

20 mmol/l	HEPES pH 7,4
10 mmol/l	KCl
1,5 mmol/l	MgCl ₂
1 mmol/l	EDTA
1 mmol/l	EGTA
250 mmol/l	Saccharose
zu 10 ml Puffer 1 Tablette	
Protease- und Phosphataseinhibitoren	

Waschpuffer:

10 mmol/l	HEPES pH 7,4
0,2 mmol/l	EDTA
0,3 mol/l	Saccharose
2,5 mg/1 mmol/l Hcl	Trypsin
zu 10 ml Mitochondrienpuffer 6, 5 mg Trypsininhibitor	

2. 6. 3 Dichtegradientenzentrifugation

Die Mitochondrienisolation auf der Grundlage eines Dichtegradienten wurde nach einem modifizierten Protokoll von Boengler durchgeführt (Boengler *et al.*, 2005) (Abbildung 7).

Sowohl die Größe als auch die Dichte und die daraus resultierenden Sedimentationsraten von Lysosomen und Peroxisomen verhalten sich ähnlich wie Mitochondrien in der Differentialzentrifugation. Eine vollständige Separation dieser kontaminierenden Organellen ist durch die Differentialzentrifugation allein daher nicht möglich. Durch die Addition der Dichtegradientenzentrifugation ist jedoch eine weitgehende Elimination der genannten kontaminierenden Fraktionen möglich.

Wie im Bildvergleich in Abbildung 7 zwischen Dichtegradienten- und Differentialzentrifugation ersichtlich, wurden die Mitochondrien zunächst mittels Differentialzentrifugation isoliert und über einen Percollgradienten weiter angereichert. Durch diesen weiteren Schritt kann die Reinheit der mitochondrialen Präparation gesteigert werden.

Zunächst wurde das Herzgewebe dreimal in PBS gewaschen. Anschließend wurden das Fettgewebe und die Vorhöfe entfernt. Danach wurde das Herzgewebe gewogen und auf ein standardisiertes Gewicht von 100 mg angeglichen. Anschließend wurde es durch die Schere grob zerkleinert und in ein C-Tube bestehend aus 800 µl Mitochondrienpuffer A, 100 µl Proteaseinhibitorpuffer und 100 µl Phosphataseinhibitorpuffer aufgenommen. Daraufhin wurde es mittels GentleMacs homogenisiert. Das Homogenat wurde bei 700 g für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde durch 70 µm Filter in ein 15 ml Falcon pipettiert und anschließend bei 10.780 g für zehn Minuten zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in 1 ml Mitochondrienpuffer A resuspendiert und erneut bei 7.650 g für zehn

Minuten zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde erneut in 1 ml Mitochondrienpuffer B resuspendiert und auf eine 30 %-ige Percolllösung pipettiert (30 % Percoll in Mitochondrienpuffer B). Darauf folgte die Ultrazentrifugation bei 34.000 g für dreißig Minuten.

Es ergab sich ein typisches Bandenmuster, die mittlere Bande stellten die Mitochondrien dar (Abbildung 7). Diese Bande wurde vorsichtig abpipettiert und zweimal mit 1 ml Mitopuffer A gewaschen und bei 7.650 g für zehn Minuten zentrifugiert. Nach dem 2. Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 200 µl Mitochondrienpuffer A aufgenommen.

Mitochondrienpuffer A:

250 mmol/l Saccharose
10 mmol/l HEPES
1 mmol/l EGTA
pH 7,4

Mitochondrienpuffer B:

250 mmol/l Saccharose
10 mmol/l HEPES
1 mmol/l EGTA
0,5 % BSA
pH 7,4

2. 7 Proteinanalyse

2. 7. 1 Proteinkonzentrationsbestimmung über BCA-Protein-Assay

Die Proteinkonzentrationsbestimmung wurde mit einem BCA-Protein-Assay Kit (Pierce, Rockford, USA) durchgeführt.

Diese Methode basiert auf der Biuretreaktion, mit der Proteine kolorimetrisch in Proben nachgewiesen werden können. Zweiwertige Kupferionen (Cu^{2+}) werden innerhalb eines alkalischen Mediums durch Proteine zu einwertigen Kupferionen (Cu^{1+}) reduziert und bilden dann einen Chelatkomplex mit 2 Molekülen von Bicinchinonsäure (bicinchonic acid, BCA), woraus ein Farbumschlag nach dunkelviolett resultiert. Die Absorption des entstehenden Chelatkomplexes kann bei einer Wellenlänge von $\lambda = 562$ nm photometrisch ausgewertet werden. Die Absorption ist nahezu linear mit steigender Proteinkonzentration. Daher eignet sich die BCA-Reaktion zur quantitativen, photometrischen Bestimmung von Proteinen innerhalb eines Bereiches von 20- 2000 µg/ml. Die Methode wurde erstmals durch die Arbeitsgruppe von Smith etabliert (Smith *et al.*, 1985).

Zur Kalibrierung wurde auf einer 96-well-Mikrotiterplatte eine Standardkurve mit BSA (bovine serum albumin) in Lysispuffer mit definierter Konzentration (20- 2000 µg/ml) angefertigt. Die Standardreihe sowie jeweils 25 µl Probenvolumen der zu messenden Proteine wurden mit 200 µl Reagenzlösung versetzt und für dreißig Minuten bei 37°C inkubiert. Unmittelbar danach wurde die Absorption bei 577 nm im Elisa-Reader SpectraCount (Packard) mit dem Computerprogramm PlateReader V3.0 gemessen. Aufgrund der Standardkurve konnte die unbekannte Proteinmenge somit quantitativ ermittelt werden.

2.7.2 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen über SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese ist eine Methode zur Auftrennung von Proteinen nach der Molekülmasse innerhalb eines elektrischen Feldes. Die von Laemmli entwickelte Methode (Laemmli, 1970) ermöglicht eine Trennung von Proteinen mit Molekülmassen zwischen 5 und 250 kDa.

Zur Probenvorbereitung wurden die Proteine zunächst in 4x Lämmli-Puffer bei 95°C für fünf Minuten denaturiert. Durch die Hitze und den reduzierenden Effekt von Dithiothreitol (DTT) können Wasserstoff- und Disulfidbrücken gespalten und somit die Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine aufgebrochen werden. Durch Zugabe des anionischen Detergens SDS (Natriumdodecylsulfat) wurden die Proteine durch Interaktion mit hydrophoben Sequenzen entfaltet und negativ geladen. Sowohl die Denaturierung als auch die gegenseitige Abstoßung der negativ geladenen Proteine führen zu einer sog. Linearisierung der Proteine, wodurch näherungsweise eine Auftrennung nach Kettenlänge proportional zur Molekülmasse ermöglicht wird.

Zur Auftrennung wurden die Proteine auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Dieses besteht aus einem 2,5 %-igem Sammelgel und einem 7,5- 12,5 %-igem Trenngel.

Im Sammelgel bei pH 6.8 wurden die Proteine zunächst konzentriert. Im Trenngel mit basischem pH 8.8 erfolgte die Separation der Proteine nach ihrer Molekülmasse. Die Trennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 120 Volt, die die Migration der Proben durch das Gel initiierte.

Kleine Proteine wandern relativ schnell durch die sog. Maschen des Gels, während große Proteine eher zurückgehalten werden, sodass am Ende des Prozedere sämtliche Proteine nach ihrer Größe sortiert wurden.

Nach dem Austritt der Lauffront aus dem Gel in den Elektrodenpuffer wurde die Auftrennung beendet, während bei sehr kleinen Proteinen die Auftrennung bereits vor dem Austritt der Lauffront abgeschlossen wurde.

Die SDS-PAGE wurde in Hoefer-Elektrophoresekammern mit SDS-PAGE-Laufpuffer durchgeführt. Als Größenmarker wurde der PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas (10- 170 kDa) gewählt.

4 X Lämmli-Puffer:

250 mmol/l	Tris HCl pH 6,8
8 % (w/v)	SDS
20 % (v/v)	Glycerol
50 mmol/l	DDT
0,1 mg/ml	Bromphenolblau

2,5 %-iges Sammelgel:

2,5 ml	1M Tris HCl pH 6,8
2,5 ml	40 % Acrylamid
200 µl	10 % SDS
60 µl	10 % APS
30 µl	TEMED

10 %- iges Trenngel:

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

Elektrophoresepuffer:

25 mmol/l	Tris HCl
250 mmol/l	Glycin pH 8,3
0,1 % (w/v)	SDS

2. 7. 3 Proteintransfer über Western Blot

Der Western Blot ist durch einen Elektrotransfer charakterisiert, bei dem die Proteine des Polyacrylamidgels innerhalb eines elektrischen Feldes in Richtung Anode auf eine Nitrozellulosemembran wandern. Das Muster der gelelektrophoretischen Auftrennung bleibt dabei erhalten.

Der Transfer wurde mittels Pierce G2 Fast Blotter (Thermo Scientific) durchgeführt.

Anodenpuffer:

300 mmol/l	Tris HCl
100 mmol/l	Tricin
pH 6,8	

Kathodenpuffer:

300 mmol/l	Aminocaprinsäure
30 mmol/l	Tris HCl
pH 8,7	

2. 7. 4 Immunodetektion

Um Bindungen von Antikörpern an freie Bindungsstellen auf der Nitrozellulose-Membran zu verhindern, wurde die geblottete Membran für 1 h in PBS/Licor-Blockierlösung (1:1) inkubiert.

Anschließend wurde die Membran mit dem primären Antikörper nach jeweiligen Herstellerangaben inkubiert. Danach wurde die Membran viermal für zehn Minuten mit TBST gewaschen. Unter Berücksichtigung der Spezies, aus der der Primärantikörper stammte, wurden mit Alexa Fluor[®]680 und Alexa Fluor[®]800 Fluoreszenzfarbstoffen markierte anti (α)-Maus- oder (α)-Kaninchen-Antikörper eingesetzt. Diese wurden 1:10.000 verdünnt in einer Licor-Odyssey-Lösung eingesetzt. Danach wurde die Membran fünfmal für zehn Minuten mit TBST gewaschen. Zur Entfernung des Tweens wurde im letzten Waschschrift TBS eingesetzt.

Der fluoreszierende Sekundärantikörper wurde im Licor Odyssey Scanner (Licor Biosciences, Lincoln, USA) und dem Programm Odyssey 2.1 und V3.0 detektiert. Da der Scanner bei zwei unterschiedlichen Wellenlängen (700 und 800 nm) messen kann, können zwei unterschiedlich fluoreszierende Sekundärantikörper (Alexa Fluor[®]680 und Alexa Fluor[®]800) simultan detektiert werden.

Da sich die Fluoreszenz linear zur Proteinmenge verhält, sind quantitative Schätzungen der Proteinmenge möglich.

Puffer TBS:

150 mmol/l NaCl
 25 mmol/l Tris Hcl
 pH 7,4

Puffer TBST:

150 mmol/l NaCl
 25 mmol/l Tris HCl
 0,1 % Tween-20
 pH 7, 4

2. 8 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie (MS) ist eine Methode zur Detektion der Molekülmasse freier Ionen im Hochvakuum. Diese Analysetechnik besteht grundsätzlich aus einer Ionenquelle, einem Massenanalysator, sowie einem Detektor (Abbildung 8) (Baldwin, 2005). Das Prinzip besteht darin, dass aus der Ionenquelle die freien Ionen einer Substanzprobe emittiert werden, anschließend werden diese im Massenanalysator nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) aufgetrennt. Der Detektor transformiert die Ionensignale in elektronische Signale, das sog. Massenspektrum. Intention der Analyse in dieser Arbeit ist es, mit hoher Sensitivität und Spezifität die Masse von Peptiden und Proteinen exakt zu charakterisieren, um Informationen über die Identität (Aminosäuresequenz), weitere enthaltene Bestandteile (Phosphatreste) sowie über die relative Menge des Analyten in einer Probe zu gewinnen.

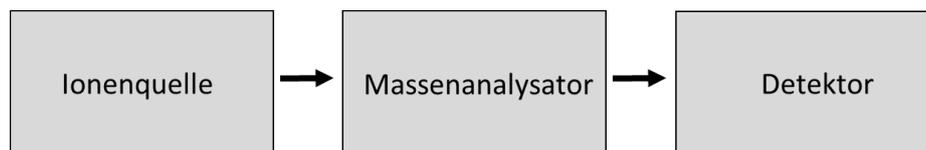


Abb. 8: Prinzipieller Aufbau einer Massenspektrometrie.

2. 8. 1 Peptidfragmentierung und Identifizierung der Proteine mittels Tandem-Massenspektrometrie

Bei der hier angewandten Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) werden nicht nur die m/z -Verhältnisse der Peptidionen gemessen, sondern die Peptidionen fragmentiert und massenspektrometrisch erfasst. Die Fragmentionen basieren auf der Kollision der Peptidionen mit einem Inertgas (in dieser Arbeit Helium) (CID= collision induced dissociation), wodurch v.a. an den Peptidbindungen innerhalb der Aminosäurekette Brüche entstehen. Als Resultat entstehen verschiedene Fragmente. Wenn die Ladung am C-Terminus bleibt, differenziert man zwischen x-, y- und z-Ionenserien, wenn die Ladung jedoch am N-Terminus haften bleibt, unterscheidet man a-, b- und c-Ionenserien (Abbildung 9). Mithilfe der individuellen Fragmentierungsmuster ist es dann möglich, die Sequenz der Peptide zu ermitteln. Auf Grundlage der Peptidsequenz lässt sich das entsprechende Protein identifizieren. Je länger bzw. spezifischer die Peptidsequenzen sind, desto weniger Peptididentifikationen sind erforderlich, um das korrespondierende Protein mit einer hohen Wahrscheinlichkeit vorauszusagen (Biemann, 1988; Roepstorff and Fohlman, 1984). Die Nomenklatur der Fragmentionen geht auf Roepstorff und Fohlmann zurück.

Die Auftrennung der Peptide folgte in der MS/MS über die HPLC mittels RP (reversed phase) Trennung. Die daraufhin in die ESI-Quelle eluierten Peptide wurden dann ins Massenspektrometer überführt.

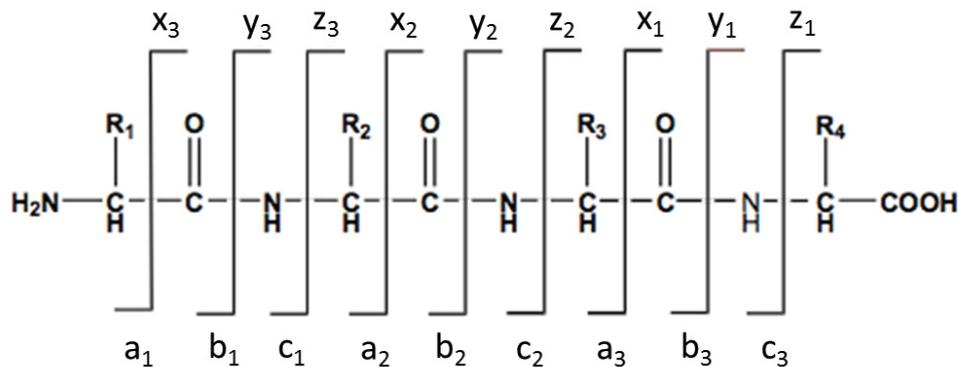


Abb. 9: Nomenklatur der Fragmente aus Aminosäureketten, die durch Kollision mit Stickstoffmolekülen entstehen (modifiziert nach Roepstorff and Fohlman, 1984).

2. 8. 2 Elektrosprayionisation (ESI)

Der Terminus Elektrospray definiert die durch ein elektrostatisches Feld erzeugte Dispersion einer Flüssigkeit in viele kleine geladene Tröpfchen (Hamdan *et al.* 1990). Unter elektrostatischen Bedingungen können die Ionen somit bei Atmosphärendruck in die Gasphase transferiert werden (Arnott *et al.*, 1993; 1989; Wilm *et al.*, 1994; Wilm *et al.*, 1996). ESI eignet sich somit als eine Untersuchungsmethode für polare thermisch nicht verdampfbare Substanzen, wie z.B. Proteine.

Damit die Analytmoleküle einer komplexen Probe ionisiert werden, müssen diese zunächst in einem adäquaten Puffer gelöst werden. Nach dem ionisierenden Solvationsprozess wird die flüssige Probe mittels Stickstoff-Gas innerhalb eines elektrischen Feldes verdampft. Dabei entstehen positiv und negativ geladene Tröpfchen. Im weiteren Prozess der Probenevaporation verkleinert sich der Tröpfchenradius, während die Ladungsdichte kontinuierlich zunimmt. Wenn die Ladungsdichte die sog. Raleigh-Grenze erreicht, d.h. wenn die Coulomb-Abstoßungskräfte so groß werden wie die Oberflächenspannung eines Tröpfchens, werden diese instabil und zerfallen in der sog. „Coulomb-Explosion“ in viele weitere kleine Tröpfchen. Dadurch resultieren kleinere, geladene Tröpfchen, die ebenfalls evaporieren. Diese Sequenz aus Tröpfchenbildung und spontanem Zerfall in weitere Mikrotröpfchen setzt sich solange fort, bis das elektrische Feld Ionen, sog. „Quasi-Molekulare-Ionen“ aus den Tröpfchen in die Gasphase desorbiert (Fenn *et al.*, 1989a). Dieser Hypothese des Ionenevaporationsmodells (IEM) von Iribarne und Thomson steht das Charge-Residue-Modell von Dole (CRM) (Dole *et al.*, 1968) gegenüber. Demzufolge führt der Evaporationsprozess zu einem Ladungsüberschuss an der Oberfläche der Tröpfchen, sodass diese spontan in kleinere Tröpfchen zerfallen, bis sie nur noch ein ionisiertes Peptidion besitzen (daher der Name Restladungsmodell).

Quintessenz jeder Theorien ist es jedoch, dass letztendlich aus Mikrotröpfchen geladene Analytmoleküle gasförmig in der Ionenquelle vorliegen. Diese Analytmoleküle sind in dieser Arbeit die Peptidionen. Während die Ionisation unter Atmosphärendruck abläuft, findet die Massenanalyse im Hochvakuum

(10^{-7} bis 10^{-5} Torr) statt. Die Ionen gelangen über eine Schnittstelle, die sog. Interface-Platte, in den Massenanalysator.

In dieser Arbeit wurde eine Nano-Elektrospray-Quelle verwendet, die aus einer metallbedampften, leitfähigen Glaskapillare besteht, durch die kontinuierlich wenige nl/min Analytlösung ins elektrische Feld injiziert wird. Diese Kapillare ist gleichzeitig auch die Gegenelektrode zur Interfaceplatte, sodass die für den Ionsierungsprozess notwendige Potentialdifferenz aufgebaut werden kann. Die Vorteile dieser Methode liegen darin, dass durch Nanospray-Quellen nur geringe Probenvolumina zur Analyse benötigt werden und somit eine längere Messzeit je Probe zur Verfügung steht, Suppressionseffekte und die Empfindlichkeit gegenüber Salzen weniger ausgeprägt (Juraschek *et al.*, 1999) sind und eine Auflösungskapazität bis in den Attomolbereich erbracht werden kann (Valaskovic *et al.*, 1995). Der Prozess der ESI ist in Abbildung 10 dargestellt.

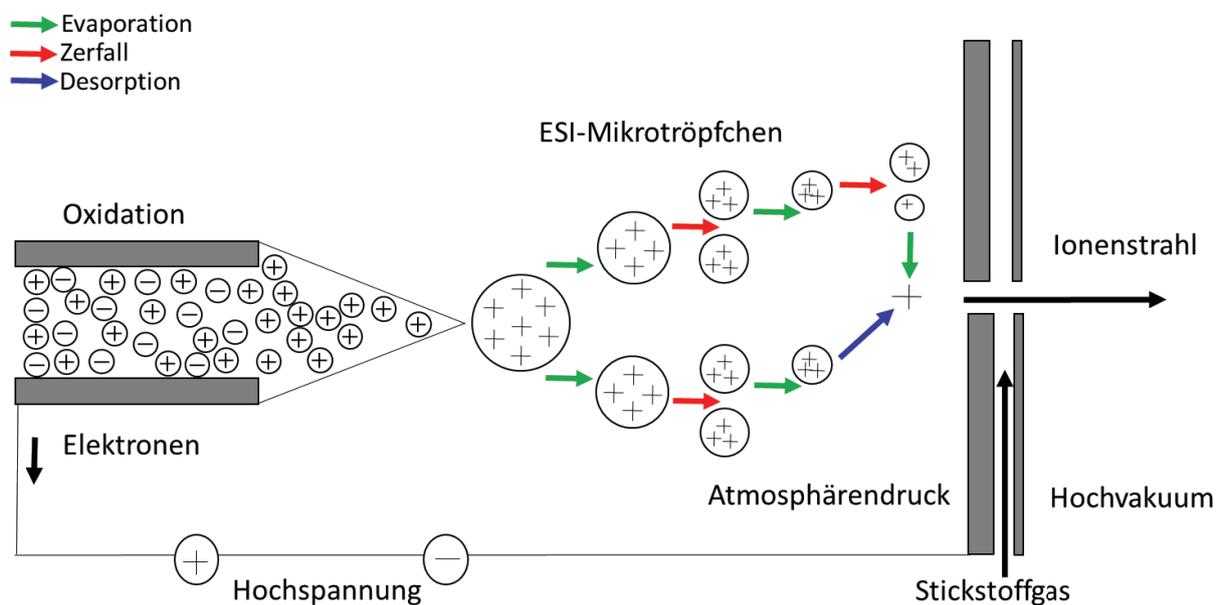


Abb. 10: Skizzierter Prozess der Elektrosprayionisation (ESI) (modifiziert nach Fenn *et al.*, 1989b; Nguyen und Fenn, 2007). Beide Hypothesen, CRM (oben) und IEM (unten), sind dargestellt. Der Unterschied zwischen beiden Modellen besteht darin, dass das finale Ion durch Evaporation (CRM) bzw. Desorption (IEM) entsteht.

2. 8. 3 Massenanalysator: LTQ-Orbitrap XL Massenspektrometer

Im Massenanalysator werden die Precursormolekülonen entsprechend ihres m/z -Verhältnisses separiert. In dieser Arbeit wurde ein LTQ (linear trap quadrupole)-Orbitrap-XL-Massenspektrometer eingesetzt (Makarov, 2000). Das LTQ-Orbitrap-XL-Massenspektrometer setzt sich aus hintereinander kombinierten Massenanalysatoren zusammen: der linearen Ionenfalle sowie der Orbitrap.

In Abbildung 12 ist die Struktur der LTQ-Orbitrap XL schematisch dargestellt. Zunächst werden die Peptidionen in das Massenspektrometer geleitet. Dort durchlaufen sie unter sukzessivem Hochvakuum (10^{-7} bis 10^{-5} Torr) einen Triple-Quadrupol (Q1,Q2,Q3) und werden anschließend in einen Ionenstrahl fokussiert.

Ein Quadrupol ist ein Massenfilter aus 4 Metallelektroden, innerhalb dessen ein hochfrequentes Gleich- und Wechselfeld induziert wird, sodass unter definierten physikalischen Parametern nur Ionen mit einem bestimmten m/z -Verhältnis auf einer stabilen oszillierenden Flugbahn den Detektor erreichen. Alle anderen Ionen mit einem anderen m/z -Verhältnis fliegen auf einer instabilen Bahn und kollidieren mit den Metallelektroden. Abhängig von der Masse der jeweiligen Ionen, der angelegten Spannung sowie der Frequenz können durch diesen Filterungsprozess sämtliche Ionen abgelenkt bzw. detektiert werden.

Nach dem Ionentransfer und der Ionenfokussierung gelangen die Ionen in die sog. lineare Ionenfalle. Es handelt sich hierbei um ein elektromagnetisches Feld, in der die MS- sowie die MS^n - Messungen ablaufen. MS^n beschreibt eine Mehrfach-Massenspektrometrie (n = Anzahl der Fragmentierungsabschnitte), wobei i.d.R. MS1 das erste Peptidspektrum und MS2 das erste Fragmentierungsspektrum beschreiben. Diese Funktion ist ein Vorteil, wenn im ersten Fragmentierungsschritt nicht ausreichend aussagekräftige Fragmente entstehen. Diese Ionenfalle setzt sich aus kreisförmig angeordneten Metallstäben zusammen, die als Elektrode dienen. Durch Variation der angelegten Wechselfeldspannung sowie der Frequenz lassen sich auch hier die Ionen unter hoher Speicherkapazität nach ihrem m/z -Verhältnis selektieren.

Die hier angereicherten Ionen werden daraufhin über einen Oktapol in die C-Trap überführt. Hier werden die Ionen festgehalten, zu einer Wolke akkumuliert, und dann bei hoher Spannung impulsartig in die Orbitrap (Abbildung 12) weitergeleitet.

Die Orbitrap ist ebenfalls eine Ionenfalle, die die Ionen in einem elektrostatischen Feld festhält (Perry *et al.*, 2008; Scigelova and Makarov, 2006). Die Orbitrap besteht aus einer spindelförmigen Außen- und Zentralelektrode. Wenn die Ionen aus der C-Trap in die Orbitrap eingeführt werden, kreisen sie einerseits aufgrund von elektrostatischen Anziehungskräften um die Zentralelektrode, zusätzlich kreisen sie aufgrund der Injektion entlang der z-Achse herum (Abbildung 11).

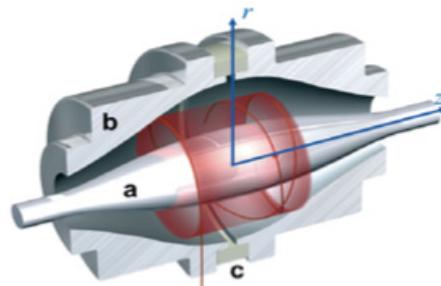


Abb. 11: Querschnitt des Orbitrap- Massenanalysators. Die Orbitrap setzt sich zusammen aus einer zentralen Elektrode (a), einer äußeren Elektrode (b) sowie einem Keramikring (c). Die Ionen oszillieren entlang der z-Achse. Durch die axiale Schwingung r kann indirekt das m/z -Verhältnis des jeweiligen Ions berechnet werden. Bild entnommen aus (Scigelova and Makarov, 2006).

Die Frequenz der axialen Schwingung r wird von zwei äußeren Elektroden detektiert. Durch die Frequenz kann man das m/z -Verhältnis des jeweiligen Ions zurückberechnen. Das durch

Fouriertransformation entstehende Frequenzspektrum wird anschließend durch eine Zweipunktkalibrierung in ein Massenspektrum umgewandelt.

Die Vorteile der Orbitrap sind eine hohe Messgenauigkeit von ≤ 1 ppm sowie ein Auflösungsvermögen von ca. 10^6 (Makarov *et al.*, 2006; Olsen *et al.*, 2005). Durch die Kombination verschiedener Massenanalysatoren wurde ein hochleistungsfähiges Instrument entwickelt, durch die die Vorteile verschiedener Massenanalysatoren effektiv genutzt werden können: in der Ionenfalle können bei Niedrigauflösung MS und MS^n -Scans mit hoher Sensitivität generiert werden, während in der Orbitrap Scans mit einer sehr hohen Auflösung produziert werden. Zusammenfassend handelt es sich bei dem LTQ-Orbitrap-XL Massenspektrometer um eine kombinierte hochauflösende Analysetechnik mit einer hohen Sensitivität und Spezifität (Scherl *et al.*, 2008).

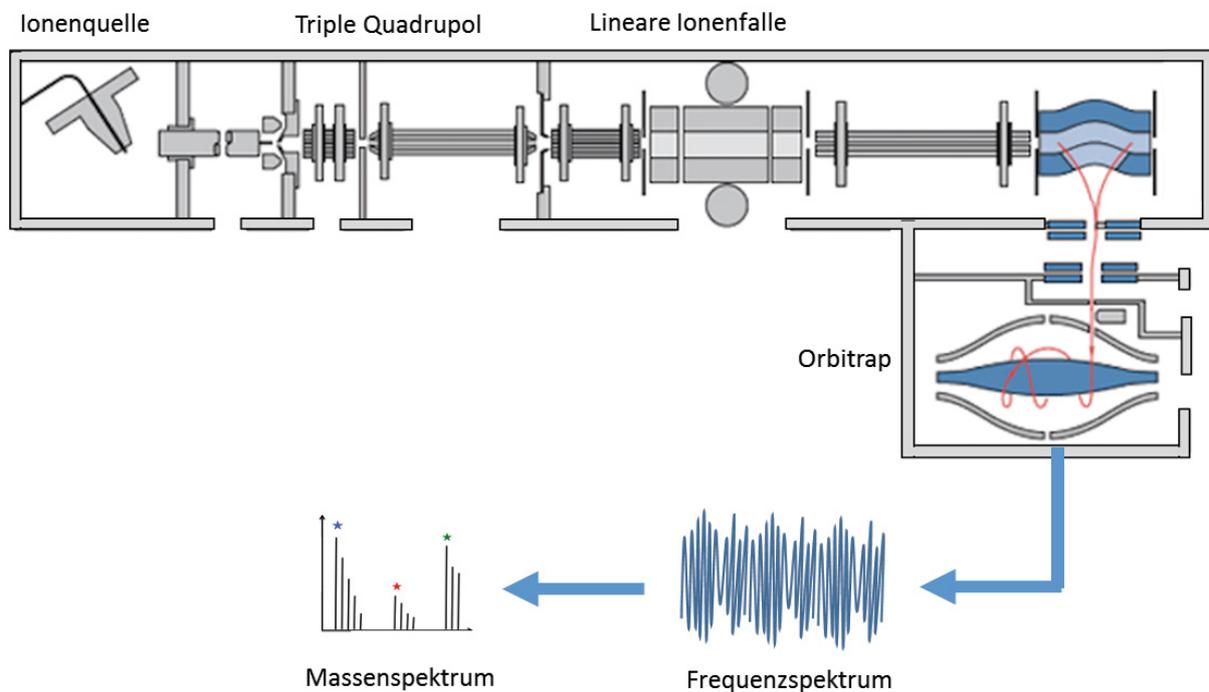


Abb. 12: Schematische Zusammensetzung der LTQ-Orbitrap-XL. Die Peptidionen werden über die Ionenquelle ins Massenspektrometer überführt. Hier durchlaufen sie mehrere Quadrupole und werden zu einem Ionenstrahl fokussiert. Nach Durchlauf der Ionenfalle akkumulieren die Ionen im C-Trap. Von hier werden sie impulsartig in die Orbitrap geleitet. Die in der Orbitrap detektierten Frequenzen werden durch Fouriertransformation in ein Frequenzspektrum und anschließend durch Zweipunktkalibrierung in ein Massenspektrum umgesetzt (modifiziert nach Eliuk and Makarov, 2015).

2.9 Qualitative und Quantitative Phosphoproteomanalyse

Zur Analyse des kardialen mitochondrialen Phosphoproteoms in Akt KO Mäusen wurden die Mitochondrienproben von Knock Out und Kontroll-Mäusen in 2 Kohorten untergliedert: die generierten Peptide ohne und mit Insulinstimulation. Diese wurden anschließend mit einer dreifachen, stabilen Isotopen-Markierung mit Formaldehyd behandelt. Die markierten Phosphopeptide wurden mittels Eisen-Nitrilotriacetat (Fe-NTA) angereichert, via SCX (strong cation exchange)-Chromatographie fraktioniert und mittels nano-LC-ESI-MS/MS (Flüssigkeitschromatographie-Elektrosprayionisation-

Massenspektrometrie) detektiert. Grundlage der Methodik war ein nach Boersema modifiziertes Protokoll (Boersema *et al.*, 2009), das im Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie bereits für die Analyse des Phosphoproteoms von Kardiomyozyten erfolgreich eingesetzt worden war (Reinartz *et al.*, 2014). Die schematische Darstellung des Protokolls zur Probenpräparation und -analyse als Voraussetzung zur qualitativen und quantitativen Phosphoproteomics ist der Abbildung 12 zu entnehmen.

2.9.1 Experimentelle Arbeitsmethode

2.9.1.1 Proteinverdau

Der Proteingehalt der isolierten Mitochondrienproben wurde mithilfe eines BCA-Assays bestimmt, sodass die Proben auf gleiche Proteinmengen abgeglichen werden konnten. Es wurden pro Mitochondrienprobe jeweils 300 µg Protein eingesetzt.

Zur Lösung der Pellets wurden 20 mmol/l TRIS (pH 8,0), 8 M Harnstoff und 0,1 % Rapigest (MS-kompatibles anionisches Detergenz) hinzugefügt. Anschließend wurden die Cysteinreste der Proteine durch 5 mmol/l DTT reduziert und durch 25 mmol/l Iodacetamid alkyliert. Dieser Schritt wurde für 1 h bei 30°C und 400 rpm in einem Schüttelinkubator durchgeführt. Um einen Proteinverdau durch Trypsin zu gewährleisten, musste die Harnstoffkonzentration der Proben zunächst herabgesetzt werden, da Harnstoff sonst das Trypsin hemmt. Daher wurden die Proben 1:5 mit 50 mmol/l Ammoniumbicarbonat verdünnt.

Zum Probenverdau wurden die seitenspezifische enzymatische Protease Trypsin im Enzym: Protein-Verhältnis 1:50 und 3 mmol/l Calciumchlorid eingesetzt. Die trypsininduzierte Proteinverdauung zu Peptiden erfolgte über Nacht bei 37°C und 400 rpm im Schüttelinkubator und wurde anschließend mit 8 µl Trifluoressigsäure gestoppt. Durch die Probenansäuerung auf einen pH < 2 wurde das Rapigest zersetzt, fiel aus und konnte abzentrifugiert werden.

Das Entsalzen der Peptidmixe erfolgte mithilfe von Spec PT C18 Filterspitzen. Die Filterspitzen wurden zunächst mit 100 µl 100 % Acetonitril konditioniert und anschließend 4 x mit je 100 µl 4 % Acetonitril und 0,1 % Ameisensäure äquilibriert. Danach wurden die Proben jeweils auf die Säulen aufgeladen. Die Proben wurden mehrfach auf- und abpipettiert, mit der Intention, möglichst viele Peptide bzw. Phosphopeptide in der Säule zu binden. Danach wurden die Säulen 3x mit jeweils 100 µl 4 % Acetonitril und 0,1 % Ameisensäure gewaschen. Mit zunächst 100 µl 60 % Acetonitril, 0,1 % Ameisensäure und anschließend 100 µl 100 % Acetonitril, 0,1 % Ameisensäure wurden die Peptide bzw. Phosphopeptide von der Säule eluiert. Das Eluat wurde dann in der Vakuumzentrifuge getrocknet.

2.9.1.2 Dreifache Stabile Isotopen Dimethyl-Markierung

Zur relativen Quantifizierung der Phosphopeptide wurde ein nach Boersema *et al.* modifiziertes Protokoll angewendet (Boersema *et al.*, 2009).

Das Prinzip besteht darin, die primären Amine der Peptide mit unterschiedlichen Isotopen zu markieren, wodurch bei nahezu identischen chemischen Eigenschaften ein definierter Massenshift in die Peptide eingeführt wird. Aufgrund des Massenunterschieds können die verschiedenen Proben frei miteinander kombiniert und die Peptide in einer einzigen LC-MS/MS-Analyse gleichzeitig identifiziert sowie relativ zueinander quantifiziert werden (Ong and Mann, 2005). Das Markierungsschema der Replikate dieser Arbeit ist der Tabelle 1 zu entnehmen.

Hierzu wurden die Proben zunächst mit Natriumacetat auf eine Konzentration von 0,5 mg/ml mit einem pH-Wert von 5,4 eingestellt. Zur Kennzeichnung der Peptide wurden 4 % Formaldehyd (CH_2O , leicht), deuteriertes Formaldehyd (CD_2O , mittelschwer) und ^{13}C -markiertes, deuteriertes Formaldehyd ($^{13}\text{CD}_2\text{O}$, schwer) eingesetzt.

Um die Reaktion zu initiieren, wurden zu den Proben mit leichter und mittelschwerer Markierung Natriumcyanoborhydrid (NaBH_3CN) und zur Probe mit schwerem Label deuteriertes Natriumcyanoborhydrid (NaBD_3CN) hinzugegeben. Hierbei handelt es sich um eine Iminbildung aus dem Formaldehyd und dem N-Terminus bzw. der ϵ -Aminogruppe von Lysinresten der Peptide. Die generierte Schiff'sche Base wird durch Natriumcyanoborhydrid reduziert. Wie in Abbildung 13 ersichtlich, werden durch die Kombination von unterschiedlich schwerem Formaldehyd und Natriumcyanoborhydrid drei differente Massenzunahmen je Peptid erreicht. Die Kombination von „leichtem“ Formaldehyd und Natriumcyanoborhydrid bewirkt eine Massenzunahme um 28 Da pro Aminogruppe eines Peptids. Die Kombination von Natriumcyanoborhydrid mit „mittelschwerem“ deuteriertem Formaldehyd führt zu einer Massenzunahme um 32 Da pro Aminogruppe. Wenn „schweres“ ^{13}C markiertes, deuteriertes Formaldehyd mit deuteriertem Natriumcyanoborhydrid reagiert, bewirkt dies eine zusätzliche Massenzunahme um 4 Da auf 36 Da pro Aminogruppe.

Die Massendifferenz von 4 Da ist essentiell für eine präzise Quantifizierung, da dadurch potentielle Überschneidungspunkte der Peptidisotope weitgehend reduziert werden können (Boersema *et al.*, 2008).

Es folgte eine Inkubation der Proben bei 30°C und 600 rpm 1 h lang (Schüttler). Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 4% Ammoniak beendet. Daraufhin wurden die Proben mit Ameisensäure auf pH 2 angesäuert und bei Raumtemperatur für weitere fünfzehn Minuten inkubiert. Nachdem die Proben, wie oben beschrieben, erneut entsalzt wurden, wurden deren Eluate in der Vakuumzentrifuge getrocknet.

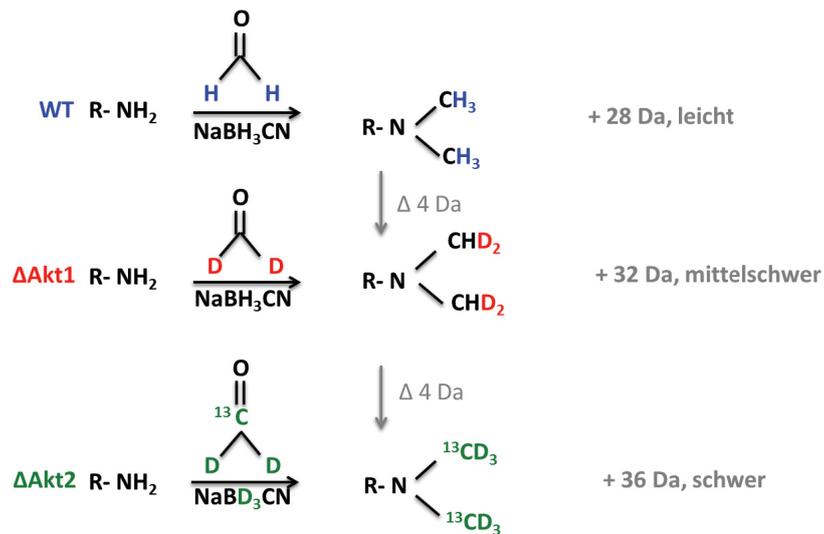


Abb. 13: Schema des Dimethyl-Labelings mit unterschiedlichen Isotopen. Die primären Amine der Peptide aus den mitochondrialen Proteinproben einer Wildtyp, ΔAkt1 und ΔAkt2 -Maus wurden mit unterschiedlichen Isotopen markiert und damit ein definierter Massenshift in die Peptide eingeführt (modifiziert nach Boersema *et al.*, 2008).

Experiment	Markierung WT	Markierung ΔAkt1	Markierung ΔAkt2	Insulin
1	leicht	mittelschwer	schwer	-
1	leicht	mittelschwer	schwer	+
2	schwer	leicht	mittelschwer	-
2	schwer	leicht	mittelschwer	+
3	mittelschwer	schwer	leicht	-
3	mittelschwer	schwer	leicht	+
4	leicht	mittelschwer	schwer	-
4	leicht	mittelschwer	schwer	+

Tabelle 1: Markierungsschema unterschiedlicher Experimente (n=4)

2.9.1.3 Vorabmessungen

Um eine valide relative Quantifizierung der Phosphopeptide zu gewährleisten, ist es essentiell, dass gleiche Proteinmengen eingesetzt werden. Da trotz Abgleichung der Proteinmengen via BCA-Assay im weiteren Prozedere Abweichungen von der exakten Proteinmenge entstehen können, wurden jeweils 2 μl der verschiedenen Eluate nach dem Labelingsprozess entnommen, vereint, getrocknet und im Massenspektrometer analysiert.

Minimale Unterschiede in den Proteinmengen konnten durch die Vorabmessungen detektiert und korrigiert werden, sodass die Proben in einem 1:1:1- Verhältnis vereint werden konnten.

2.9.1.4 Phosphopeptidanreicherung

Eine effektive Phosphopeptidanreicherung ist ein wichtiger Schritt für eine erfolgreiche MS-Analyse, um durch Reduktion der Probenkomplexität eine hohe Ausbeute an identifizierten Phosphopeptiden zu bekommen.

Daher wurden die Phosphopeptide aus den ursprünglich 300 µg Protein entsprechend den Vorabmessungen im Verhältnis 1:1:1 gemischt bzw. vereint und mit dem Fe-NTA Phosphopeptide Enrichment Kit nach Herstellerprotokoll angereichert (Pierce Biotechnologies, Rockford, USA). Die Durchflüsse, die die nichtphosphorylierten Peptide bzw. diese ohne Phosphosites enthalten, wurden zur späteren Proteomanalyse aufgefangen.

Nach der Elution der angereicherten Peptide wurden zusätzlich Graphite Spin Columns eingesetzt (Pierce Biotechnologies, Rockford, USA). Durch die Säulen werden einerseits die hydrophilen Peptide gebunden, während die hydrophoben Peptide, Harnstoff, Salze und weitere Kontaminanten entfernt werden, sodass sowohl die Sensitivität als auch die MS- Spektren verbessert werden können. Nach einer weiteren Trocknung der Eluate in der Vakuumzentrifuge standen die Proben zur massenspektrometrischen Analyse bereit.

2. 9. 1. 5 Peptidfraktionierung und Nano-LC-ESI-MS/MS-Analyse

Die Analyse der Phosphopeptide erfolgte auf der Grundlage einer automatisierten Nano-LC-ESI-MS/MS-Analyse.

Um die Komplexität der drei vereinigten Proben im Vorfeld zu reduzieren, wurden die Phosphopeptide zunächst mittels einer SCX (strong cation exchange) vorfraktioniert. Dazu wurde die Mikrofraktionierungsoption des WPS 3000 PL Probensammlers einer Ultimate3000 HPLC genutzt.

Die Peptide wurden auf 1 mm x 15 cm Polysulfethyl-Aspartatamid Säulen (Dionex, Thermo Scientific) aufgetragen und über einen Gradienten von 0- 10 % Gradientenpuffer für zwanzig Minuten, 10- 20 % Puffer für zehn Minuten, 20- 60 % Puffer für fünfzehn Minuten und 60- 100 % Puffer für fünf Minuten bei einer Flussrate von 50 µl/min separiert und die jeweiligen Fraktionen gesammelt und in der Vakuumzentrifuge getrocknet.

Puffer A:

5 mmol/l NaH₂P0₄,
pH 2,7

Gradientenpuffer:

5 mmol/l NaH₂P0₄
15 % Acetonitril
500 mmol/l NaCl
pH 2,7

Nach der Kationenaustauschchromatographie wurde die Probenkomplexität der drei biologischen Replikate weiter reduziert, indem die Phosphopeptide mit einem 2D- LC Ultimate 3000 System (Dionex Coporation, Sunnyvale, USA) in einem zweistündigen Gradienten aufgetrennt wurden. Die LC wurde mit dem Softwareprogramm Chromeleon, Version 6.8, SP2c (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA) gesteuert.

Im Anschluss an die Reversed-Phase-Chromatographie wurden die Peptide direkt in die ESI-Quelle des Nano-LC-ESI-MS/MS (LTQ-Orbitrap XL Massen Spektrometer, Thermo Scientific) eluiert. Zunächst

wurden die Phosphopeptide zum Entsalzen auf eine Umkehrphasen Fused-Silica Säule (100 μm x 2 cm) aufgetragen. Danach wurden die Peptide über Fused-Silica Trennsäulen (75 μm x 18 cm) aufgetrennt. Nach Elution der Phosphopeptide erfolgte der Transfer in die Gasphase mittels Elektronensprayionisation über einen SilicaTip Emitter (New Objectiv, Woburn, USA) ins Massenspektrometer. Die Flussrate entlang der Säulen betrug 230 nl/min und die angelegte Spannung 2 kV. Die Transferkapillare wurde konstant auf 140°C temperiert.

Die Elution der Phosphopeptide folgte einem linearen Lösungsmittelgradienten von 4- 60 % des Lösungsmittels B für insgesamt sechzig Minuten und einem anschließenden Anstieg auf 99 % des Lösungsmittels B für fünf Minuten.

Die Säulen wurden anschließend mit dem Lösungsmittel A äquilibriert.

Lösungsmittel A:

4 % Acetonitril
0,1 % Ameisensäure

Lösungsmittel B:

84 % Acetonitril
0,1 % Ameisensäure

Die Aufzeichnung der massenspektrometrischen Messungen am Massenspektrometer LTQ-Orbitrap-XL (Thermo Scientific, San Jose, CA) begann mit dem Start des Gradienten. Die MS-Analyse wurde mit der dynamic-exclusion Funktion der XCalibur-Software, Version 2.0.7, (Thermo Scientific, San Jose, USA) vollautomatisiert gesteuert. Die Messungen der LTQ Orbitrap erfolgte auf der Grundlage festgelegter Parameter (s. Tab. 9).

Jedem Übersichtsspektrum (MS-Scan) (Masse/Ladungsverhältnis m/z 300-2000, Ionenfüllwert 10^6 Ionen, Auflösung $r = 60.000$ bei $m/z = 400$) folgte ein Fragmentierungsspektrum (MS/MS-Scan) der zehn intensivsten Ionen. Hierfür lag die normalisierte Kollisionsenergie der CID bei 35.

Bereits fragmentierte Ionen, die innerhalb von 20 sec. bei einer maximalen Massenabweichung von 10 ppm ein weiteres Mal detektiert wurden, kamen auf eine Ausschlussliste, um repetitive Analysen zu verhindern.

Die massenspektrometrischen Messungen wurden von Dr. Michael Reinartz, Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie, durchgeführt. Die definierten Einstellungen der LTQ-Orbitrap-XL sind in Tab. 2 aufgelistet.

Parameter	Einstellung
FT MS	Fullscan
Massenbereich	350-2000 m/z
Auflösung	60.000
Aktivierungsstart	CID
normalisierte Kollisionsenergie	35
Aktivierung Q	0,25
Aktivierungszeit	30.000 ms
mehrstufige Aktivierung	aktiv
neutrale Massenverluste	24,49;32,66;48,99;97,97
Suche nach Ladungszustand	aktiv

Tabelle 2: definierte Einstellung der LTQ-Orbitrap-XL

2. 9. 1. 6 Proteinidentifizierung, Datenbankrecherche und relative Quantifizierung

Die Peptididentifizierung und Proteinquantifizierung wurde mittels Uniprot mouse Reference Proteome-Datenbank (81.823 Einträge, Download 16.05.2013) über den SEQUEST-Algorithmus mit der Bioworks-Software (Thermo Scientific) oder der MaxQuant-Software (Version 1.3.0.5)(Cox and Mann, 2008) durchgeführt.

Jedes identifizierte Peptid korrespondiert zu einem typischen MS-Spektrum.

Ein MS-Spektrum ist charakterisiert durch die Peptidmasse und -intensität (Abbildung 14). Die drei verschiedenen Label eines jeden MS-Spektrums resultieren in drei Höchstwerten, die mit der leichten, mittelschweren oder schweren Isotopenform korrespondieren.

Die Identifizierung der Peptide erfolgte durch den Abgleich der MS/MS-Spektren mit theoretischen (*in silico*) erstellten Fragmentspektren eines Peptides (Steen and Mann, 2004). Auf Basis der Proteindatenbank werden die theoretisch möglichen m/z-Signale der ganzen Peptide und ihrer Fragmente berechnet, und diese theoretischen Fragmentspektren mit den realen abgeglichen.

Hieraus erhält man eine Liste identifizierter Phosphoproteine.

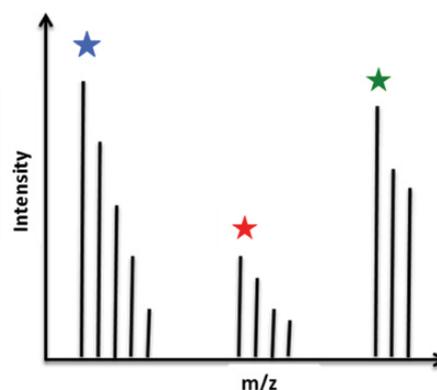


Abb. 14: Exemplarische Darstellung eines MS-Spektrums eines Phosphopeptides nach dreifacher Isotopenmarkierung. Die Sterne repräsentieren jeweils eine leichte (blau), mittelschwere (rot) und schwere (grün) Probe.

Im vorliegenden quantitativen Phosphoproteomics-Experiment erhält man durch den Vergleich der Signalintensität (= Peakfläche) von gelabelten Peptiden die Peptidratiros (Ong and Mann, 2005).

Die Suchparameter in MaxQuant sind in Tab. 3 dargestellt.

Parameter	Einstellung
Enzym	Trypsin
fixe Modifikation	Dimethylierung K: N-term. und/oder intern; Carbamidomethylierung C
variable Modifikation	Oxidierung M Phosphorylierung S, T, Y Dimethylierung (+Deut.) K: N-term. und/oder intern Dimethylierung (+ Deut. und C13) K: M-term. und/oder intern
MS/MS (Orbitrap) erste Suche	20 ppm
MS/MS (Orbitrap) zweite Suche	6 ppm
MS/MS (Iontrap)	0,5 Da
peptide false discovery rate	0,01
protein false discovery rate	0,01
min Peptidlänge	6 AS
min Score	60

Tabelle 3: Definierte Einstellungen zur Analyse mit MaxQuant: K: Lysin, C: Cystein, M: Methionin, S: Serin, T: Threonin, Y: Tyrosin, N-term.: N-terminal, Deut.: Deuterium, C13: ^{13}C , ppm: $\times 10^{-6}$

Es wurden die LC-MS/MS-Analysen aller SCX-Fractionen aller Replikate gemeinsam mittels der Andromeda-Suchmaschine analysiert, um bekannte Kontaminanten sowie invertierte Sequenzen zu überprüfen. Hierbei wurde die Funktion „matching between runs“ der MaxQuant-Software verwendet, mit einem Zeitfenster von zwei Minuten.

Die sog. „Output Tables Phospho (STY)“ aus MaxQuant mit den entsprechend identifizierten Phosphopeptiden wurden für die Datenanalyse verwendet. Die bioinformatische und statistische Auswertung wurde durchgeführt mittels Perseus (Version 1.3.0.4, Max Planck Institut für Biochemie, München) und Microsoft Office Excel (Version 2010).

2. 10 Qualitative Proteomics/ Phosphoproteomics

2. 10. 1 Mitochondriale Proteinidentifizierung

Sämtliche identifizierte Peptide wurden auf eine eventuell bekannte mitochondriale Lokalisation überprüft. Die Charakterisierung erfolgte mittels Gene Ontology (GO)-Term-Analyse 2.1.1. Plugin (Update 20.03.2014), PhosphoSitePlus (<http://www.phosphosite.org>), UniProtKB

(<http://www.uniprot.org>), Genecards (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MICE>), Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) sowie erweiterter Autor-initiiertes Internetrecherche.

2. 10. 2 Chromosomale und biochemische Charakterisierung identifizierter Phosphoproteine

Die chromosomale Verteilung identifizierter mitochondrialer Proteine wurde mithilfe von UniProtKB (<http://www.uniprot.org>) sowie DAVID Bioinformatics Resources 6.7 (<https://david.ncifcrf.gov>) durchgeführt. Die prozentuale Frequenz wurde berechnet, indem die Anzahl identifizierter distinkter Phosphoproteine je individuellem Chromosom durch die Gesamtzahl aller in dieser Studie identifizierten distinkten Phosphoproteine dividiert worden ist.

Zur Prädiktion von Transmembrandomänen in den Phosphoproteinen wurden die Programme TMHMM Server V.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) (Brewis and Brennan, 2010; Krogh *et al.*, 2001; Qian *et al.*, 2005) und UniProtKB angewandt. Zur Prädiktion von mitochondrialen Targetingpeptiden wurde der TargetP 1.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) (Emanuelsson *et al.*, 2000) verwendet.

Das Molekulargewicht, der isoelektrische Punkt sowie der GRAVY (Grand Average of Hydropathy) wurden mithilfe des ExPASy ProtParam-Werkzeugs (<http://web.expasy.org/protparam/>) bestimmt.

2. 10. 3 Strukturelle und funktionale Charakterisierung identifizierter Phosphoproteine

Die submitochondriale und/ oder subzelluläre Charakterisierung identifizierter Proteine wurde auf der Basis von Gene Ontology (GO)-Term-Analyse 2.1.1. Plugin (Update 20.03.2014), PhosphoSitePlus (<http://www.phosphosite.org>), UniProtKB (<http://www.uniprot.org>), Genecards (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MICE>), Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) sowie erweiterter Autor-initiiertes Internetrecherche ermittelt. Die prozentuale Verteilung wurde berechnet, indem die Anzahl identifizierter distinkter Phosphoproteine je submitochondrialem bzw. subzellulärem Kompartiment durch die Gesamtzahl aller in dieser Studie identifizierten distinkten Phosphoproteine dividiert und mit 100 multipliziert worden ist.

Die oben genannten Programme wurden auch zur funktionalen Zuordnung eingesetzt. Jedes Phosphoprotein wurde entsprechend seiner Hauptfunktion einer der 7 Funktionsklassen zugeordnet, mit „Unbekannt“ als zusätzlicher Kategorie. Die prozentuale Verteilung wurde wie oben beschrieben kalkuliert.

Zusätzlich wurde DAVID Bioinformatics Resources 6.7 (<https://david.ncifcrf.gov>) eingesetzt, um die Phosphoproteine KEGG Signalwegen zuzuordnen. Dies ermöglichte die Identifikation angereicherter biologischer Prozesse mit dem Genotyp Maus IPI Datenbank als Background (International Protein Index). P-Werte der Anreicherung wurden durch die EASE-Methode in DAVID berechnet. Ein P-Wert < 0,01 nach Korrektur durch die Benjamini-Hochberg-Methode wurde als signifikant betrachtet. In

dieser Arbeit abgebildet sind die acht am stärksten angereicherten Signalwege. Zur besseren Visualisierung wurden die p-Werte in log₂-Werte transformiert.

2. 10. 4 Assoziation mit Pathologien

Zur Untersuchung eines potentiellen Zusammenhangs zwischen identifizierten Phosphoproteinen und möglichen Pathologien wurden die humanen Orthologe der murinen Phosphoproteine in OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM[®]. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD), 20.11.15; <http://www.omim.org>) analysiert. OMIM ist ein Katalog humaner Gene und genetischer Dysfunktionen, der von NCBI entwickelt worden ist.

2. 10. 5 Suche von Akt-Substraten

Zur Identifikation von Akt-Substraten wurde PhosphoSitePlus (<http://www.phosphosite.org>) eingesetzt. Dort sind bisher 324 bzw. 35 Phosphorylierungsstellen für Akt1 bzw. Akt2 beschrieben worden (22.11.15).

2. 10. 6 Kinasenprädiktion identifizierter Phosphorylierungsstellen und identifizierte Kinasen im Phosphoproteom

Zur Identifizierung potentieller Kinasen identifizierter Phosphorylierungsstellen wurde das Programm NetworKIN (Linding *et al.*, 2007) eingesetzt. Mit NetworKIN wurde eine Liste mit potentiellen Kinasen für jede Phosphorylierungsstelle generiert. Die Kinase mit dem jeweils höchsten Score wurde der untersuchten Phosphorylierungsstelle zugeordnet. Die Vorhersage des Programms basiert dabei auf dem Vergleich der Phosphorylierungsstelle mit bekannten Konsensussequenzen unterschiedlicher Proteinkinasen. Auch hier wurden die bei PhosphoSitePlus angegebenen humanen Orthologe der murinen Phosphoproteine angewendet.

Zur Identifizierung potentieller Kinasen im Phosphoproteom wurde die GO-Term-Analyse mit der Suchfunktion „Kinasenaktivität“ durchgeführt.

2. 10. 7 Charakterisierung der Phosphorylierungsstellen

Die Phosphopeptide wurden in 2 Kategorien eingeteilt. Die, deren Phosphorylierungsstellen mit einer Lokalisationswahrscheinlichkeit von $> 0,78$ bestätigt werden konnten (hohe Konfidenz) und diejenigen, deren Phosphorylierungsstelle mit einer Lokalisationswahrscheinlichkeit von $< 0,78$ berechnet worden ist (niedrige Konfidenz). Wenn man den Wahrscheinlichkeitsalgorithmus mit einem Cut-Off $> 0,78$ auf das gesamte Phosphoproteom überträgt, konnten im Phosphoproteom (- Insulin) von insgesamt 412 identifizierten Phosphorylierungsstellen 324 (79 %) hochkonfident mit einem medianen Wahrscheinlichkeitsscore von 0,999 angegeben werden. Im Phosphoproteom (+ Insulin) wurden von insgesamt 556 identifizierten Phosphorylierungsstellen 428 (77 %) als hochkonfident mit einem medianen Wahrscheinlichkeitsscore von ebenfalls 0,999 eingestuft.

Die systematische Charakterisierung (bekannte vs. neue Stellen; neue Stellen in Maus und in Säugetieren; Stellen mit bekanntem kardialen Ursprung; Stellen mit bekannten nichtmurinen Orthologien), die Aminosäuredistribution sowie die funktionale Klassifizierung der hochkonfidenten Phosphorylierungsstellen erfolgte mit PhosphoSitePlus (<http://www.phosphosite.org>).

2.11 Quantitative Proteomics/ Phosphoproteomics

2.11.1 Statistische Analyse

Für die statistische Analyse signifikanter Veränderungen im Phosphoproteom kardialer Mitochondrien wurden zunächst die normalisierten relativen Peptidverhältnisse eingesetzt. Zur Untersuchung von Abweichungen zwischen KO und WT, wurde die Verteilung der Ratios auf Basis der logarithmierten Werte untersucht.

Um Akt-isoformspezifische bzw. -unspezifische Effekte zu ermitteln, wurden die normalisierten log₂-Werte korrespondierender Phosphopeptide von Δ Akt1/WT und Δ Akt2/WT miteinander verglichen. Von allen log₂-Verhältnissen eines jeden biologischen Replikates wurden jeweils für Δ Akt1/WT und Δ Akt2/WT der Mittelwert μ , der Median χ sowie die Standardabweichung σ_x ermittelt. Anschließend wurde das 95 %-Konfidenzintervall (Median $\chi \pm 1,96 \times$ Standardabweichung σ_x) berechnet. Peptide, deren Werte innerhalb des Vertrauensintervalls lagen, wurden als nicht reguliert beurteilt. Peptide außerhalb des Konfidenzintervalls, die also an den extremen Enden der log₂-Kurve liegen, repräsentieren potentielle Kandidaten, die hochwahrscheinlich einer Akt-abhängigen Signaltransduktion unterliegen. Anschließend wurde innerhalb des 1. Konfidenzintervalls ein zweites 95 %-Konfidenzintervall berechnet. Dazu wurden die veränderten Peptide nach der 1. Analyse herausselektiert und die verbliebenen Peptide erneut der Berechnung von Median, Standardabweichung und Konfidenzintervall unterzogen. Grundlage dieser Überlegung ist die Annahme, dass andere potentielle Kandidaten nach der 1. Analyse entweder durch zu strikte Kriterien oder durch den dominierenden Einfluss extrem stark regulierter Peptide nicht erkannt werden können (Reinartz *et al.*, 2014).

Um Veränderungen auf Phosphoproteomebene von Veränderungen auf Proteomebene zu differenzieren, wurden auch statistische Analysen auf Basis der nichtphosphorylierten Peptide durchgeführt. Hier wurden jedoch nicht die normalisierten relativen Peptidverhältnisse, sondern die Proteinverhältnisse eingesetzt. Zur Verteilung der logarithmierten Werte wurde auch von ihnen der korrespondierende log₂-Wert berechnet. Zur Untersuchung Akt-vermittelter Effekte wurden die Werte von Δ Akt1/WT und Δ Akt2/WT miteinander verglichen. Nach Berechnung des Konfidenzintervalls wurden die nichtveränderten Proteinverhältnisse, d.h. diese innerhalb des Intervalls, als Referenzgröße veränderter Peptidverhältnisse eingesetzt. Anhand dieser quantitativen Analyse der nichtphosphorylierten Peptide konnte differenziert werden zwischen signifikanten Veränderungen in der Phosphorylierung eines Peptides und einer veränderten Abundanz des korrespondierenden Proteins im Proteom. Es galten folgende weitere Kriterien zur Bestimmung signifikant regulierter

Phosphopeptide: das Peptid musste in mindestens zwei von vier Replikaten signifikant reguliert sein und die Regulationsrichtung durfte in den übrigen Replikaten, in denen keine signifikante Änderung nachgewiesen werden konnte, keine gegensätzliche Tendenz zeigen. Außerdem wurden nur die Phosphopeptide als reguliert betrachtet, die auf Proteomebene nachweislich keine Regulation zeigten, d.h. wahrscheinlich keiner veränderten Expression des Proteins unterlagen.

Als interne Qualitätskontrolle eines exakten 1:1:1-Mischungsverhältnisses galt die Atp5a1. Die mitochondrialen Proteinmengen eines jeden Replikates wurden initial mit Atp5a1 als Bezugsgröße aufeinander abgestimmt.

3 Ergebnisse

3.1 Mitochondrienisolation

3.1.1 Ausbeute der isolierten mitochondrialen Fraktion

Wie unter 2.6 beschrieben, wurden zunächst drei verschiedene Methoden zur Isolierung von Mitochondrien aus Herzgewebe verglichen. Zum Vergleich der Effektivität in der Mitochondrienisolation wurden die Proteinmengen der mitochondrialen Fraktionen unterschiedlicher Protokolle beispielhaft miteinander verglichen.

Exemplarisch war die Proteinmenge bei gleichen Volumina der isolierten mitochondrialen Fraktion nach dem Antikörper-basierten Auftrennverfahren mit 1,4 mg/ml 2,6 mal höher als die des Differentialzentrifugation-Protokolls (527 $\mu\text{g/ml}$) und 3,3 mal höher als die der Dichtegradienten-Methode (425 $\mu\text{g/ml}$). Der Vergleich der Proteinmengen indiziert, dass die höchste Proteinmenge in der isolierten mitochondrialen Fraktion über das Antikörper-basierte Auftrennverfahren erzielt wird.

Durchschnittlich ($n = 30$) konnten durch das Antikörper-basierte Auftrennverfahren 1,04 mg/ml Protein isoliert werden. Hierunter konnten durchschnittlich im WT 881 $\mu\text{g/ml}$, im ΔAkt1 942,3 $\mu\text{g/ml}$ und im ΔAkt2 1305 $\mu\text{g/ml}$ isoliert werden. Die Proteinmenge in der mitochondrialen Fraktion unterschied sich im ΔAkt2 signifikant im Vergleich zum WT ($p = 0,003$). Der Unterschied in der Proteinausbeute zwischen dem ΔAkt1 und WT war hingegen nicht signifikant ($p = 0,6$) (Abbildung 15).

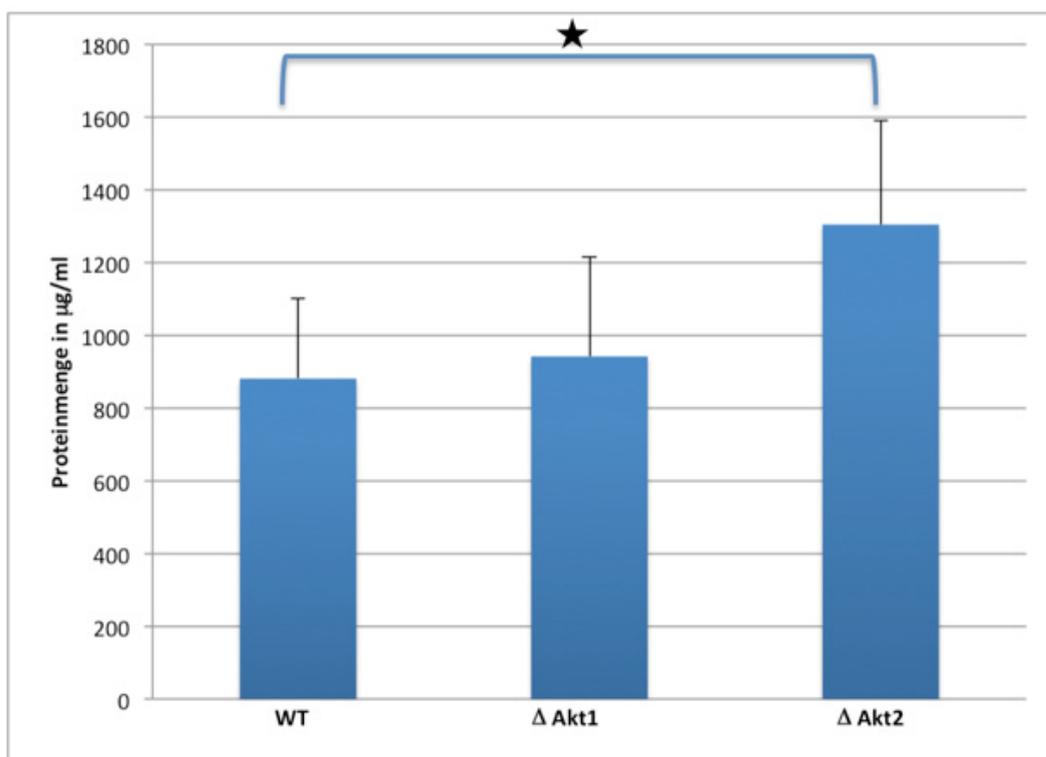


Abb. 15: Berechnete Proteinmenge der isolierten mitochondrialen Fraktionen durch das Antikörper-basierte Auftrennverfahren im WT, ΔAkt1 und ΔAkt2 (Daten repräsentieren $n = 10$ Präparationen/ Genotyp).

3. 1. 2 Anreicherung der isolierten Mitochondrien

Die relative Anreicherung von mitochondrialem Protein wurde durch eine Western Blot Analyse kontrolliert. Der eingesetzte Antikörper war spezifisch gegen ein mitochondriales Markerprotein, die α -Untereinheit der ATP-Synthase (Atp5a1) gerichtet. Die ATP-Synthase ist ein Enzymkomplex aus mehreren Untereinheiten, bestehend aus zwei funktionellen Domänen, F_0 und F_1 . Die α -Untereinheit ist eine Komponente der F_1 -Domäne.

Wie in der Abbildung 19 ersichtlich, wurden zur Untersuchung der Mitochondrienanreicherung eines jeden Protokolls die Proben der jeweiligen Aufreinigungsschritte aufgetragen. Die detektierte mitochondriale Proteinmenge im 1. Überstand, d.h. dem Homogenat nach Abtrennen von Geweberesten durch die erste Niedrigzentrifugation, wurde als Referenzgröße auf 100 % gesetzt und die mitochondriale Proteinmenge in der mitochondrialen Fraktion darauf normiert (Abbildung 16). Die Western Blot Analysen zeigen zunächst, dass erwartungsgemäß mitochondriales Protein mit allen 3 Methoden isoliert werden konnte. Die aus den Western Blot Analysen abgeleiteten prozentualen Daten sind in den jeweils korrespondierenden Schemata angegeben. Die höchste mitochondriale Proteinanreicherung wurde im Antikörper-basierten Auftrennverfahren nachgewiesen.

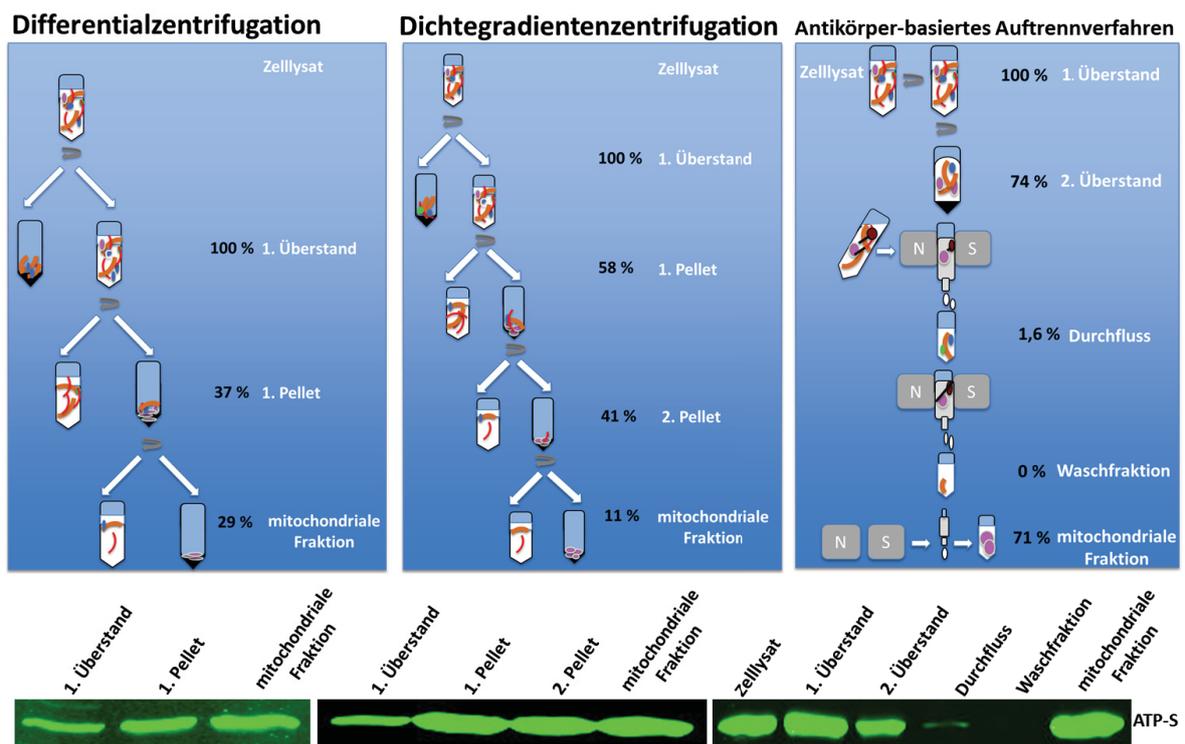


Abb. 16: Schematische Darstellung der Anreicherung isolierter Mitochondrien mittels Differentialzentrifugation, Dichtegradientenzentrifugation und dem Antikörper-basierten Auftrennverfahren (von links nach rechts). Zu jeder mitochondrialen Anreicherungsmethode ist unten der korrespondierende Western Blot angezeigt. Die prozentualen Angaben in den Anreicherungsschemata sind aus den Western Blot Analysen abgeleitet.

3. 1. 3 Reinheit der mitochondrialen Fraktion

In weiteren Untersuchungen wurde die Reinheit der Mitochondrienfraktion überprüft.

Potentielle Kontaminanten in der Präparation sind insbesondere Bestandteile der Zellmembran, des Zytoplasmas, der Plasmamembran, des Nukleus, des Golgi-Apparates, der Lysosomen, der Peroxisomen und des Endoplasmatischen Retikulums.

Die Reinheit wurde mithilfe von Western Blot Analysen kontrolliert, indem Antikörper, die spezifisch gegen ein Markerprotein eines Organells bzw. eines Zellkompartiments gerichtet sind, eingesetzt wurden. Gegen folgende Markerproteine wurden spezifische Antikörper angewandt: Na⁺-K⁺-ATPase (Zellmembran), α-Enolase (Zytoplasma), Caveolin 3 (Plasmamembran), Histon H3 (Nukleus), LAMP1 (Lysosom), Katalase (Peroxisom) und EEA1 (Endosom). Mit dem Licor Odyssey-Scanner wurden die Fluoreszenzsignale gemessen. Da diese sich linear zur Proteinmenge verhalten, war eine quantitative Schätzung der Proteinanreicherung möglich. Dieser Wert wurde anschließend wie oben beschrieben mit dem Quotienten $\frac{\text{Probengesamtvolumen}}{\text{eingesetztes Volumen}}$ multipliziert. Das Produkt erlaubt eine Aussage über den relativen Anteil des Proteins im Vergleich zur Ausgangsmenge. Zur Quantifizierung der jeweiligen Kontaminationen wurde die Proteinmenge im 1. Überstand als Bezugsgröße auf 100 % gesetzt und die angereicherte Proteinmenge von Kontaminanten in der Mitochondrienfraktion darauf normiert.

Die Analysen der Proben nach dem Antikörper-basierten Auftrennverfahren (Abbildung 18A) demonstrieren, dass Kontaminanten aus der Zellmembran (0 %), dem Zytosol (0,05 %) sowie den Endosomen (1 %) in der Mitochondrienfraktion kaum vertreten waren. Im Gegensatz dazu waren Kontaminanten aus der Plasmamembran (2,6 %) sowie aus dem Nukleus (2,8 %) und aus den Peroxisomen (74 %) stark in der Mitochondrienfraktion vertreten. Dies zeigt, dass Proteine aus diesen Kompartimenten nicht vollständig entfernt werden konnten. Es muss aber gleichzeitig darauf verwiesen werden, dass trotz einer hohen peroxisomalen Anreicherung bezogen auf das Gesamtlysate, die absolute Zahl an peroxisomaler Kontamination innerhalb der mitochondrialen Fraktion unterhalb der 1 %-Grenze liegt, wie sich in den folgenden massenspektrometrischen Analysen des Phosphoproteoms zeigt (Abbildung 24). Ein interessantes Ergebnis zeigte das lysosomale Markerprotein LAMP1. Es zeigte sich, dass das 40 kDa Protein (nichtglykosylierte Form) in hohem Maße, teilweise nahezu vollständig in der Mitochondrienfraktion angereichert worden ist (100 %). Im Gegensatz dazu wurde die glykosylierte Form (120 kDa) während der Reinigung nahezu vollständig aus der Mitochondrienfraktion eliminiert (0 %) (Abbildung 18A). Es sei darauf hingewiesen, dass in den Abbildungen 17 und 18 lediglich das glykosylierte LAMP1 berücksichtigt worden ist.

Zusammenfassend wurden die Kontaminationen im Verlauf der Mitochondrienpräparation weitgehend eliminiert, wobei vor allem Bestandteile der Plasmamembran, des Nukleus, der Peroxisomen und Lysosomen in der Mitochondrienfraktion detektiert wurden.

Die Western Blot Analysen der mitochondrialen Fraktion aus der Differentialzentrifugation (Abbildung 18B) zeigten vergleichsweise höhere und die aus der Dichtegradientenzentrifugation (Abbildung 18C) niedrigere Kontaminationsraten. Nach der Differentialzentrifugations-Methode waren insbesondere Bestandteile der Zellmembran, der Plasmamembran, des Endoplasmatischen Retikulums sowie

lysosomale Anteile um ein Vielfaches im Vergleich zu den anderen Methoden erhöht (Abbildung 17). Das Dichtegradientenzentrifugations-Protokoll zeigt eine mitochondriale Fraktion, in der sämtliche Kontaminanten mit Ausnahme des nichtglykosylierten LAMP1 (43 %-ige Anreicherung) unterhalb der 2 %-Grenze angereichert worden sind (Abbildung 17 und 18 C). Die Analysen zeigen, dass eine vollkommen kontaminationsfreie Mitochondrienisolation durch keine Methode möglich ist. Sie zeigen jedoch, dass die Kontaminationsrate der mitochondrialen Fraktion durch die Dichtegradientenzentrifugation niedriger als durch das magnetische Auftrennverfahren bzw. die Differentialzentrifugation ist (Dichtegradientenzentrifugation < Antikörper-basiertes Auftrennverfahren < Differentialzentrifugation).

Im Hinblick auf die Fragestellung zu einem Import von Akt in die Mitochondrien wurde auch die Verteilung von Akt untersucht. Der Nachweis von Pan-Akt in der mitochondrialen Fraktion im Basalzustand, d.h. ohne Insulinstimulation, konnte trotz gleicher Proteinmengen von jeweils 25 µg nur in geringer Anreicherung in der Differentialzentrifugation (0,7 %) und dem Antikörper-basierten Auftrennverfahren (0,4 %) nachgewiesen werden. In der mitochondrialen Fraktion der Dichtegradientenzentrifugation konnte Pan-Akt nicht detektiert werden (Daten hier nicht gezeigt).

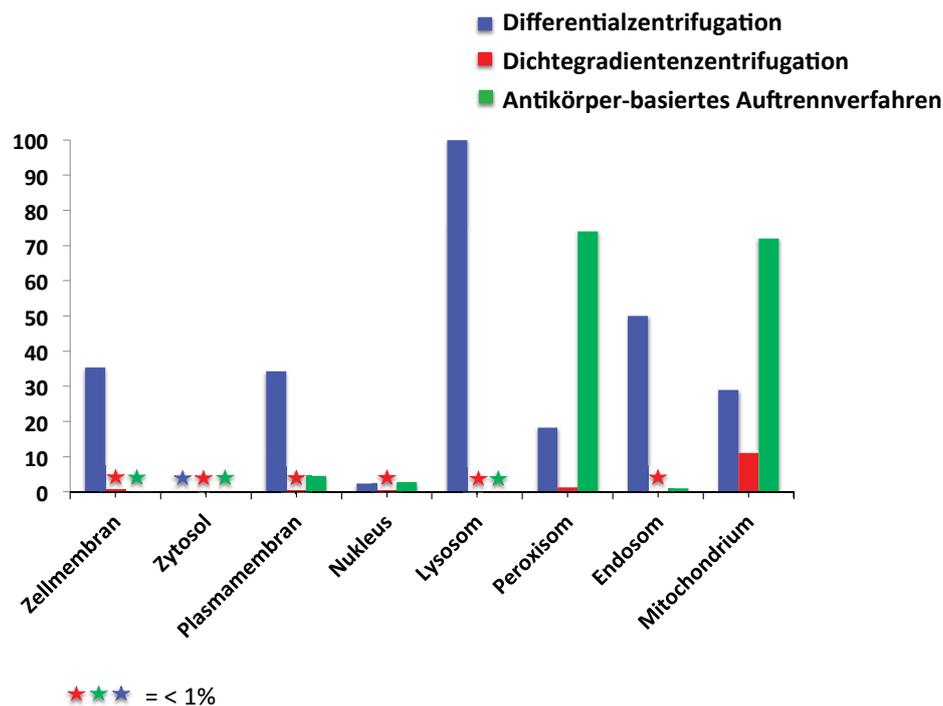
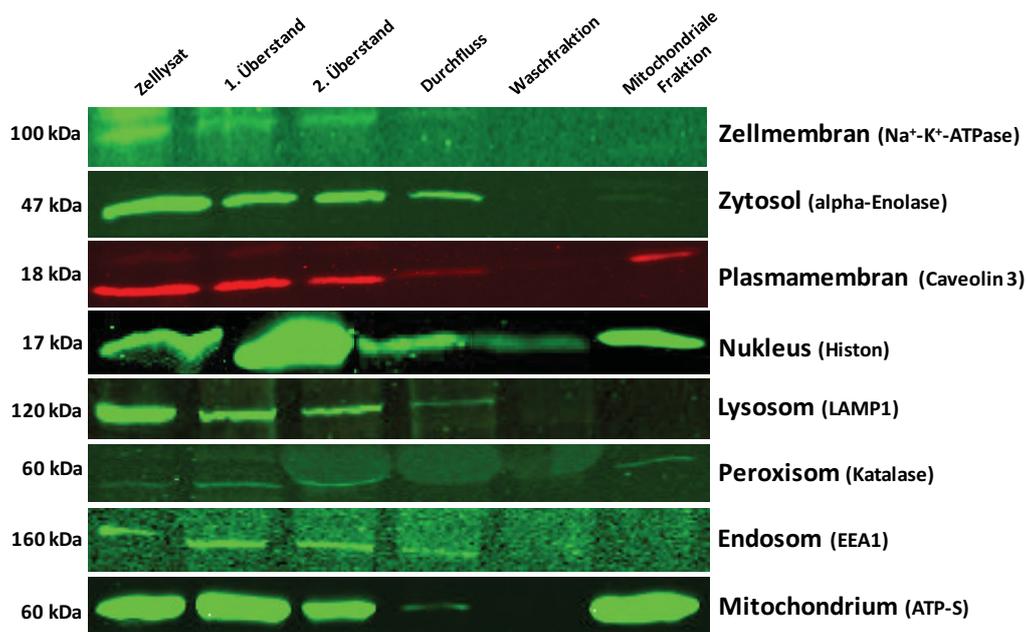


Abb. 17: Diagramm zur Darstellung der prozentualen Anreicherung von kontaminierendem Protein in der mitochondrialen Fraktion nach Differentialzentrifugation (blau), Dichtegradientenzentrifugation (grün) und dem Antikörper-basierten Trennverfahren (rot). Die Sterne symbolisieren Kontaminationen, die nach Western Blot Analysen zu weniger als 1 % in der mitochondrialen Fraktion detektiert wurden.

A



B

C

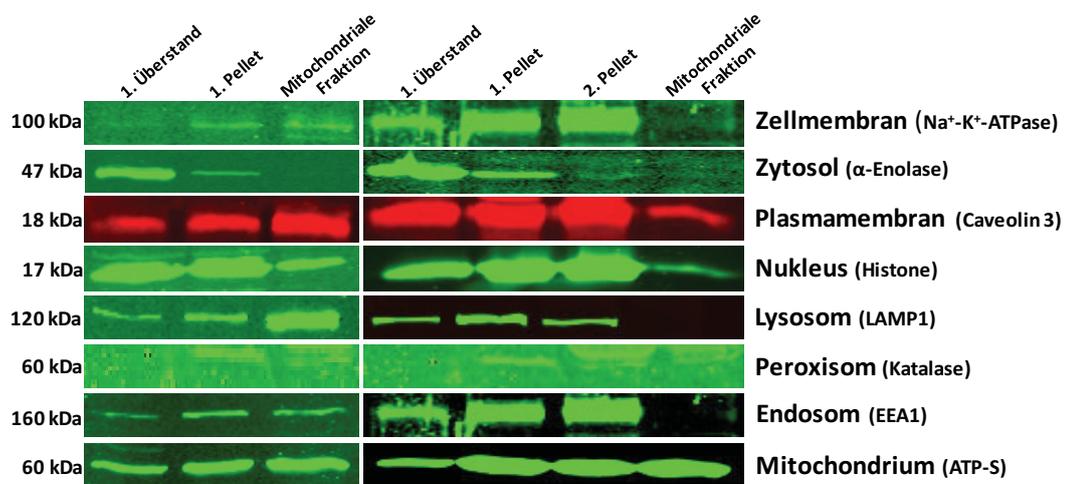


Abb. 18: Western Blot Analyse zur Kontrolle der Reinheit der isolierten mitochondrialen Fraktion. Der Grad an potentiellen Kontaminationen wurde durch Western Blot Analysen mithilfe organell- bzw. zellkompartimentspezifischer Antikörper im magnetischen Auftrennverfahren (A) sowie im Differential- (B) und Dichtegradientenzentrifugationsverfahren (C) untersucht.

Der wesentliche Vorteil des Antikörper-basierten Auftrennverfahrens gegenüber der Dichtegradientenzentrifugation und Differentialzentrifugation liegt insbesondere darin, dass das Isolationsprotokoll auch bei geringem Ausgangsmaterial (100 mg) einsatzfähig ist, was für die Realisierung des Versuchsmodells dieser Arbeit essentiell war. Die im Vergleich zu den anderen Isolationsmethoden deutlich höhere Ausbeute mitochondrialen Proteins, die relativ gute Reinheit der mitochondrialen Fraktion sowie der Nachweis des Proteinimports waren die ausschlaggebenden

Argumente, weshalb in dieser Arbeit die Mitochondrien aus den murinen Herzen über das Antikörper-basierte Verfahren isoliert wurden (Tabelle 4).

Parameter	Antikörper-basiertes Trennverfahren	Dichtegradientenzentrifugation	Differentialzentrifugation
Dauer	+++	++	+
Kontaminationsrate	++	+	+++
Ausbeute	+++	+	++

Tabelle 4: Tabellarische Zusammenfassung zum Vergleich unterschiedlicher mitochondrialer Isolationsmethoden (Antikörper-basiertes Auftrennverfahren, Dichtegradientenzentrifugation, Differentialzentrifugation) im Hinblick auf Dauer, Kontaminationsrate und Ausbeute (+++ Gutes Ergebnis, + schlechtes bzw. nachteiliges Ergebnis).

3.1.4 Reproduzierbarkeit des Antikörper-basierten Trennverfahrens

Die mitochondriale Proteinanreicherung über das Antikörper-basierte Trennverfahren wurde auf ihre Reproduzierbarkeit im Folgenden untersucht.

Exemplarisch wurden in einer Western Blot Analyse aus drei unabhängigen Experimenten nach dem Antikörper-basierten-Protokoll jeweils der 1. Überstand ($\hat{=}$ 100 % Mitochondrien) und die korrespondierende mitochondriale Fraktion untersucht (Abbildung 19). Nach Bestimmung der Proteinmengen innerhalb der mitochondrialen Fraktion mittels BCA-Assay wurden die gleichen Mengen mitochondrialen Proteins aufgetragen, die Signalintensitäten der ATP-Synthase (in arbiträren Einheiten) gemessen und diese mit dem Quotienten aus $\frac{\text{Ausgangsvolumen } (\mu\text{l}) \text{ der jeweiligen Probe (Überstand bzw. mitochondriale Fraktion)}}{\text{eingesetztes Volumen } (\mu\text{l})}$ multipliziert. Hierbei zeigte sich zunächst die Beobachtung, dass die relative Menge an mitochondrialem Protein mit der Gesamtproteinmenge in der mitochondrialen Fraktion korrelierte ($R^2 = 0,86$).

Im Hinblick auf die Proteinmengen der isolierten Mitochondrienfraktionen zeigten sich auch genotypunabhängig Unregelmässigkeiten mit Standardabweichungen von 219 $\mu\text{g/ml}$ im WT (Mittelwert 881 $\mu\text{g/ml}$), 275 $\mu\text{g/ml}$ im ΔAkt1 (Mittelwert 942 $\mu\text{g/ml}$) und 285 $\mu\text{g/ml}$ im ΔAkt2 (Mittelwert 1305 $\mu\text{g/ml}$) (Abbildung 15). Das Protokoll scheint somit eine variable Proteinausbeute zu garantieren.

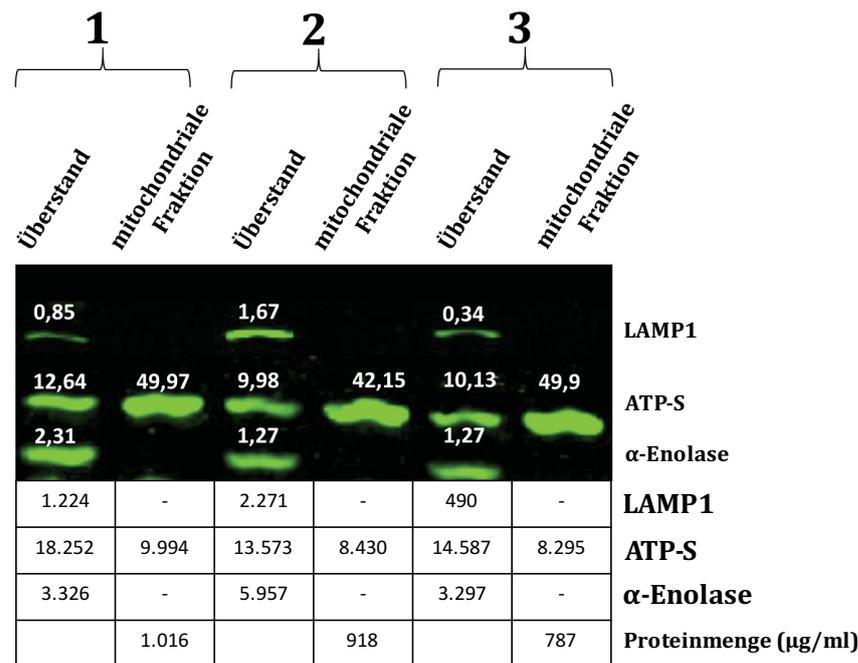


Abb. 19: Western Blot Analyse zur Untersuchung der Anreicherung mitochondrialen und nichtmitochondrialen Proteins je mitochondrialer Fraktion (nach dem Antikörper-basierten Trennverfahren). Der Western Blot zeigt den Überstand und die mitochondriale Fraktion aus drei unabhängigen Experimenten. Im Western Blot angegebene Zahlen geben die gemessenen Signalintensitäten wieder. Die tabellarisch zusammengefassten Werte sind das Produkt aus $\frac{\text{Gesamtvolumen } (\mu\text{l}) \times \text{Signalintensität } (aE)}{\text{eingesetztes Volumen } (\mu\text{l})}$.

Darüber hinaus wurde exemplarisch die mitochondriale Anreicherung aus drei unabhängigen Experimenten mit einer vergleichbaren Proteinmenge in der mitochondrialen Fraktion verglichen (Abbildung 20). Trotz ähnlicher Proteinmengen zeigten sich starke Divergenzen in der mitochondrialen Anreicherung mit Differenzen bis zu 35 %. Darüber hinaus wird aus der Darstellung ersichtlich, dass Verluste von mitochondrialem Protein insbesondere nach dem Zentrifugationsschritt des 1. Überstandes sowie nach magnetischer Auftrennung des 2. Überstandes auftreten können. Durch Vergleich der quantifizierten Signalintensitäten des Zellysats und des 1. Überstandes, werden auch hier beachtliche Unterschiede in der Anreicherung registriert. Durch die unterschiedlichen Proteinverluste in der Anreicherungsreihe der drei Experimente wird untermauert, dass die Methode kein vollständig reproduzierbares Isolationsverfahren darstellt.

Aus diesen Ergebnissen kann man auch ableiten, dass die Untersuchung der mitochondrialen Anreicherung nur eine begrenzte Aussage über die tatsächliche Ausbeute der Isolationsprozedur ermöglicht.

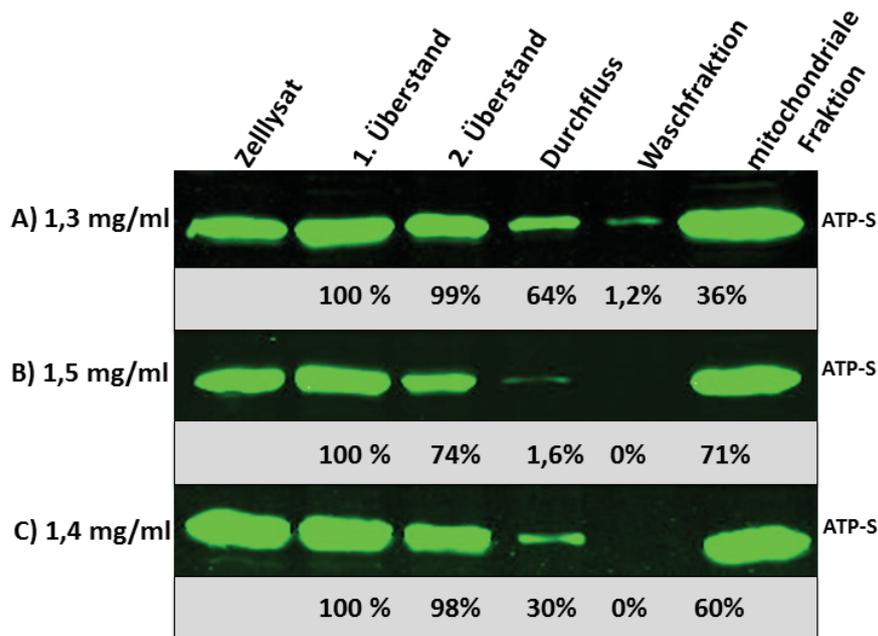


Abb. 20: Exemplarische Darstellung der mitochondrialen Anreicherungsschritte aus 3 unabhängigen Experimenten. Die Prozentwerte beziehen sich auf den 1. Überstand, den 2. Überstand, den Durchfluss, die Waschfraktion sowie die mitochondriale Fraktion.

Zusammenfassend ist das Antikörper-basierte Auftrennverfahren eine Methode, durch die unterschiedlich hohe Proteinmengen gewonnen werden. Die Höhe der Proteinmenge je mitochondrialer Fraktion steht in proportionalem Zusammenhang zur tatsächlichen mitochondrialen Proteinmenge.

Da es für die Phosphoproteomstudie dieser Arbeit von essentieller Bedeutung war, dass die zu analysierenden Replikate gleiche Mengen an mitochondrialem Protein enthalten, ist der Protein-BCA-Assay eine geeignete Strategie zur Abschätzung der mitochondrialen Proteinmengen und darauffolgenden exakten Anpassung der mitochondrialen Proteinmengen.

3. 1. 5 Mitochondrialer Akt-Proteinimport

Nach der Identifizierung des Isolationsprotokolls, das für die Analyse Akt-isoformspezifischer und – unspezifischer Effekte auf das kardiale mitochondriale Phosphoproteom geeignet zu sein schien, wurde untersucht, inwieweit die Akt-Isoformen 1 und 2, die im Herzen exprimiert werden, in die Mitochondrien importiert werden. Zu diesem Zweck wurden WT, iCMAkt1 KO (Δ Akt1) und iCMAkt2 KO (Δ Akt2) Mäuse entweder unter basalen Bedingungen oder nach Insulinstimulation eingesetzt. Aus dem Herzen wurden die Mitochondrien isoliert und der Akt-Gehalt in der Mitochondrienfraktion mittels Western Blot bestimmt.

Wie in der Abbildung 21 ersichtlich, wurden sowohl im WT, Δ Akt1 und Δ Akt2 nach Insulinstimulation im Vergleich zum Basalzustand eine deutliche Steigerung des Akt-Gehalts gefunden (Pan-Akt-Antikörper). Die Analyse mittels phospho-Akt-spezifischer Antikörper zeigt entsprechend auf Insulinstimulation eine verstärkte Phosphorylierung der Akt an Ser473. Diese Beobachtung wird auch durch die erhöhten Phospho-Akt/Pan-Akt-Quotienten in den mitochondrialen Fraktionen unterstützt.

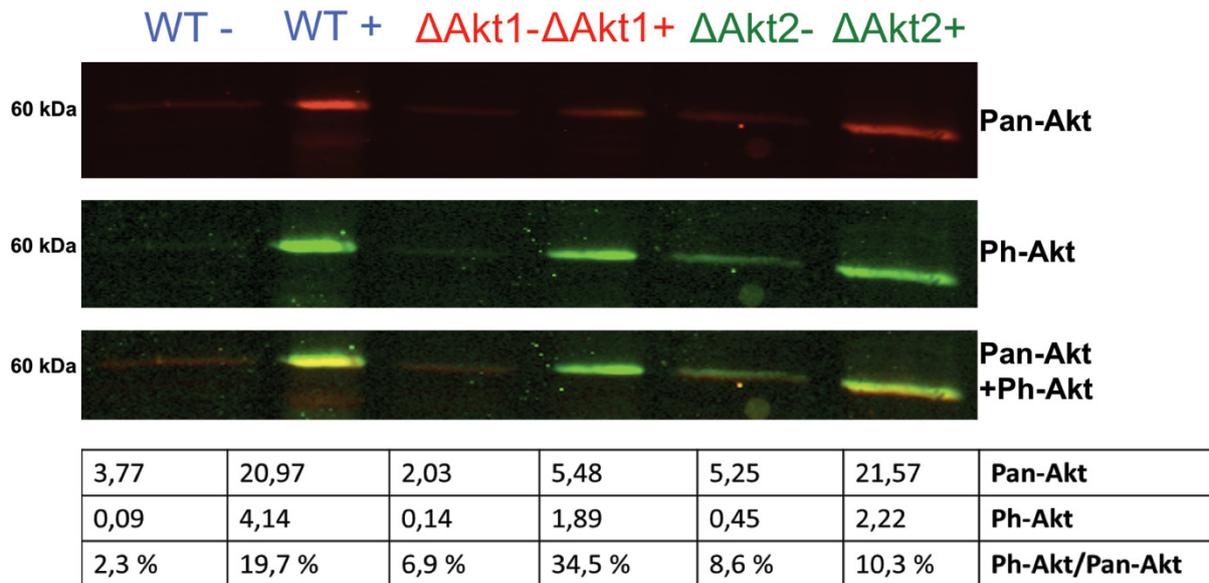


Abb. 21: Western Blot Analyse zur Kontrolle der mitochondrialen Translokation von Akt nach Insulinstimulation. Die mitochondrialen Fraktionen von Wildtyp, Δ Akt1 KO und Δ Akt2 KO wurden im Basalzustand (-) und nach Insulinstimulation (+) miteinander verglichen. Pan-Akt (rot) und Phospho-Akt (grün) wurden in der Kontrolle (WT) und im KO (Δ Akt1, Δ Akt2) detektiert. Die Tabelle zeigt die Quantifizierung der Signalintensitäten in arbiträren Einheiten (a.E.). Es wurden gleiche Proteinmengen aufgetragen.

3.2 Charakterisierung des murinen kardialen mitochondrialen Phosphoproteoms

3.2.1 Arbeitsschema

Für die Untersuchung Akt-isoformspezifischer Effekte auf das kardiale mitochondriale Phosphoproteom wurde eine dreifache Formaldehyd-Markierung genutzt, die die Identifizierung und relative Quantifizierung von Proteinen aus den Herzen verschiedener Mäuse ermöglicht.

Initial wurden in jedem Experiment ($n = 4$) eine iCMAkt1 KO, iCMAkt2 KO sowie eine Wildtypmaus zur Aktivierung der Akt mit Insulin stimuliert. Mäuse ohne Insulininjektion dienten der Charakterisierung des Basalzustandes. Anschließend wurden die Mitochondrien aus den murinen Herzen isoliert. Nähere Details zum Probenaufbereitungsprozess siehe in 2. 9. 1. *Experimentelle Arbeitsmethode* und Abbildung 22. Die nichtphosphorylierten Peptide, die das mitochondriale Proteom repräsentieren, wurden während der Phosphopeptid-Anreicherung durch die Fe-NTA-Säule als Durchlauf aufgefangen. Zur späteren Identifikation regulierter Phosphopeptide sind die nichtphosphorylierten Peptide eine wichtige Referenzgröße. Dadurch lässt sich nämlich differenzieren, ob veränderte Phosphorylierungsgrade von Phosphopeptiden auf Regulationen auf der Phosphoproteomebene zurückzuführen sind oder ob eine Regulationen auf der Proteomebene einen Einfluss auf die Abundanz eines Phosphopeptids haben könnte. Nach der Nano-LC-ESI-MS/MS-Analyse wurden die Peptide schließlich identifiziert und relativ quantifiziert.

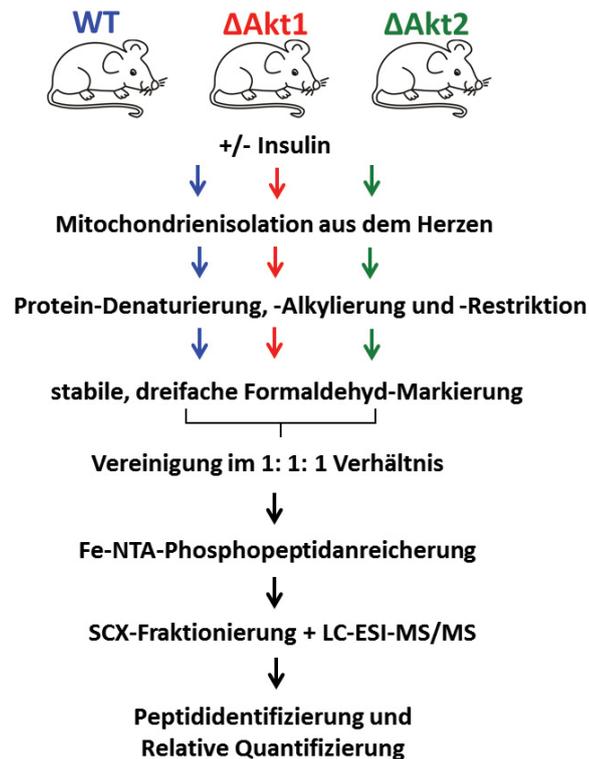


Abb. 22: Experimentelles Arbeitsschema zur Identifizierung Akt-isoformspezifischer und -unspezifischer Effekte auf das kardiale mitochondriale Phosphoproteom. Die Phosphoproteomanalyse wurde in kardialen Mitochondrien aus WT, iCMAkt1 KO und iCMAkt2 KO nach Insulinstimulation durchgeführt (4 biologische Replikate). Nach Proteindenaturierung, -alkylierung und -verdauung wurden die Peptidproben einer stabilen, dreifachen Formaldehyd-Markierung unterzogen. Die Probenvereinigung in einem 1:1:1-Verhältnis erlaubt eine relative Quantifizierung der Peptide in einem Durchlauf. Nach einer Fe-NTA-Phosphopeptidanreicherung wurden die Proben fraktioniert, um die Probenkomplexität zu reduzieren. Nach der Nano-LC-ESI-MS/MS-Analyse wurden die MS-Spektren via MaxQuant unter definierten Einstellungen weiterverarbeitet.

3. 2. 2 Qualitative Analyse

3. 2. 2. 1 Effekt von Insulin auf das mitochondriale Phosphoproteom

In der qualitativen Phosphoproteom-Untersuchung wurden zunächst die identifizierten Proteine summiert und genotypunabhängig analysiert. Im Basalzustand (Tabelle 5) wurden insgesamt 412 Phosphopeptide identifiziert. Die 267 nichtredundanten Phosphopeptide lassen sich 220 distinkten Phosphoproteinen und 324 Phosphorylierungsstellen zuordnen. Nahezu 50 % (204) aller (412) Phosphopeptide konnten als mitochondrial klassifiziert werden. Darunter sind 132 mitochondriale nichtredundante Phosphopeptide, die sich 94 distinkten Phosphoproteinen und 156 Phosphorylierungsstellen zuteilen lassen.

Interessanterweise wurden im Phosphoproteom nach Insulinstimulation insgesamt 35 % mehr nichtredundante Phosphopeptide als im Basalzustand identifiziert. Den 359 nichtredundanten Phosphopeptiden werden 265 distinkte Phosphoproteine und 428 Phosphorylierungsstellen zugeordnet. Von der Gesamtheit aller Phosphopeptide (556) wurden 52 % als Peptide mitochondrialen Ursprungs identifiziert. Auch auf mitochondrialer Ebene werden nach Insulinstimulation im Vergleich zum Basalzustand (302 vs. 204) 48 % mehr Phosphopeptide identifiziert. Die 190 nichtredundanten

Phosphopeptide können 121 distinkten Phosphoproteinen und 228 Phosphorylierungsstellen zugeteilt werden.

- Insulin

Parameter	Proteine	Mitochondriale Proteine *
Phosphopeptide insgesamt	412	204
Nichtredundante Phosphopeptide	267	132
Distinkte Phosphoproteine	220	94
Phosphorylierungsstellen	324	156

+ Insulin

Parameter	Proteine	Mitochondriale Proteine*
Phosphopeptide insgesamt	556	302
Nichtredundante Phosphopeptide	359	190
Distinkte Phosphoproteine	265	121
Phosphorylierungsstellen	428	228

Tabelle 5: Zusammenfassung der in jeweils n = 4 Experimenten identifizierten Phosphoproteine, Phosphopeptide und Phosphorylierungsstellen in der mitochondrialen Fraktion, vor (-) und nach (+) Insulinstimulation. Dargestellt sind neben den identifizierten Proteinen auch der Anteil der laut Datenbanken als mitochondrial bekannten Proteine (*).

Im Vergleich zum Basalzustand konnten nach Insulinstimulation auch 29 % mehr distinkte Phosphoproteine und 46 % zusätzliche Phosphorylierungsstellen (Abbildung 23) identifiziert werden. Diese Beobachtung suggeriert, dass durch Insulin eine höhere Anzahl an mitochondrialen Proteinen phosphoryliert wird. Die Abbildung 23 zeigt außerdem, dass in der hier durchgeführten Analyse 33 mitochondriale Phosphoproteine bzw. 103 mitochondriale Phosphorylierungsstellen exklusiv im Phosphoproteom (+ Insulin) auftreten, nicht aber im basalen Phosphoproteom. Dies legt die Vermutung nahe, dass durch Insulin nicht nur mehr, sondern auch differente (im Vergleich zum Basalzustand) Proteine phosphoryliert werden.

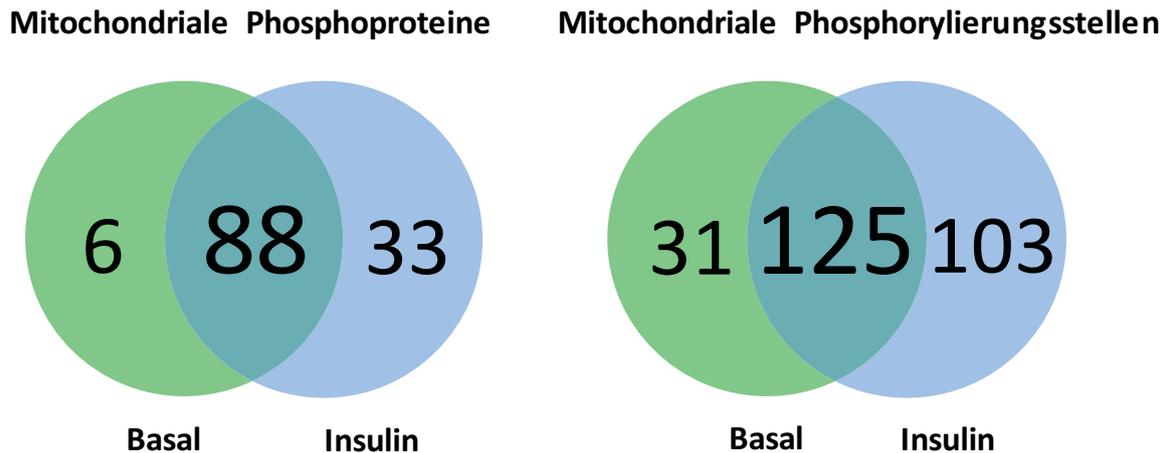


Abb. 23: Venn-Diagramm zur Darstellung identifizierter distinkter mitochondrialer Phosphoproteine und distinkter mitochondrialer Phosphorylierungsstellen aus isolierten Mitochondrien muriner Herzen vor und nach Insulinstimulation.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass für durchschnittlich 51 % der in der Mitochondrienfraktion identifizierten Phosphopeptide eine mitochondriale Lokalisation bekannt ist.

Darüber hinaus konnten in den Proben nach Insulinstimulation mehr und unterschiedliche mitochondriale Phosphopeptide, Phosphoproteine, und Phosphorylierungsstellen im Vergleich zu den Proben im Basalzustand identifiziert werden. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass Insulin mitochondriale Prozesse durch gesteigerte Phosphorylierung mitochondrialer Proteine reguliert.

3. 2. 2. 2 Charakterisierung nichtmitochondrialer Phosphoproteine

Eine weitere Fragestellung war die nähere Betrachtung der sog. nichtmitochondrialen Phosphoproteine. Sowohl basal als auch nach Insulinstimulation betrug der prozentuale Anteil nichtmitochondrialer Phosphopeptide in den Gesamtproben 51 % (basal) bzw. 48 % (Insulin). Ein wesentlicher Anteil der kontaminierenden Proteine ist im Zytoplasma und im Zytoskelett lokalisiert (Abbildung 24). Diese umfassen insbesondere den kontraktilen Apparat aus Myosin- und Aktinfilamenten. Angesichts der mitochondrialen Subpopulationen innerhalb einer Kardiomyozyte -interfibrillär und subsarkolemmal ist es fragwürdig, ob die interfibrilläre Mitochondrienpopulation grundsätzlich kontaminationsfrei zu isolieren ist.

Weiterhin wurden Proteine identifiziert, die normalerweise mit dem ER assoziiert sind. Der Anteil an Kontaminanten aus dem ER betrug in beiden Phosphoproteomen ca. 10 %. Jeweils 20 % der kontaminierenden Fraktion konnten außerdem dem Nukleus und der Plasmamembran zugeordnet werden. Extrazelluläre, lysosomale, peroxisomale Proteine sowie Proteine des Golgi-Apparates sind in der Kontaminationsfraktion ebenso vertreten.

Trotz einer relativ hohen absoluten Zahl an identifizierten Kontaminanten muss dennoch darauf hingewiesen werden, dass diese Zahl nicht die absolute numerische Anreicherung der Phosphopeptide, sondern deren relative Abundanz widerspiegelt. So sind beispielsweise die Proteine Phospholamban (Pln) und Gap junction (Gja1) Proteine mit einer hohen Expressionsrate. Die daraus resultierende hohe

Abundanz bedeutet eine hohe Auftretenswahrscheinlichkeit und somit eine relativ höhere Detektionswahrscheinlichkeit durch die Massenspektrometrie, die in eine Überrepräsentanz hochabundanter und Unterrepräsentanz niedrigabundanter Proteine resultiert. Weitere Details hierzu siehe *Diskussion*.

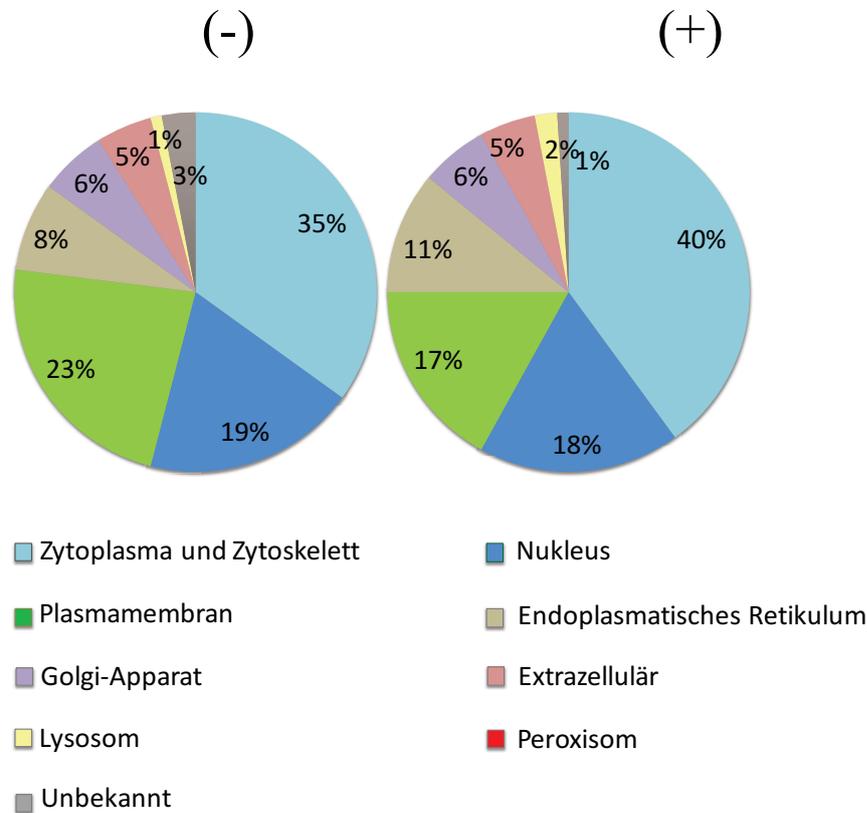


Abb. 24: Diagramm repräsentiert Lokalisation nichtmitochondrialer Phosphoproteine. Untersucht wurden das Phosphoproteom basal (-) und nach Insulinstimulation (+).

3. 2. 2. 3 Chromosomale und biochemische Zuordnung identifizierter Phosphoproteine

Zur chromosomalen Analyse des mitochondrialen Phosphoproteoms wurde die Genomverteilung aller gencodierten identifizierten Phosphoproteine (Zusammenfassung aller distinkten Phosphoproteine unter basalen und stimulierten Bedingungen) untersucht. Die genetische Information ist bei Säugetieren hauptsächlich in den Chromosomen lokalisiert, während nur 1 % des gesamten DNA-Bestandes auf die mtDNA entfällt. Die weitreichende Mehrheit (99 %) der identifizierten Phosphoproteine wird vom nukleären Genom kodiert (Abbildung 25A). Dabei sind die meisten detektierten Phosphoproteine auf den Chromosomen 8, 11, und 13 lokalisiert, nur das ATP-Synthase Protein 8 konnte dem mitochondrialen Genom zugeordnet werden.

Da Mitochondrien bimembranäre Organellen sind, sind zahlreiche der mitochondrialen Proteine membranär lokalisiert. Unter den distinkten Phosphoproteinen besitzen 27 % mindestens eine Transmembrandomäne (Abbildung 25B).

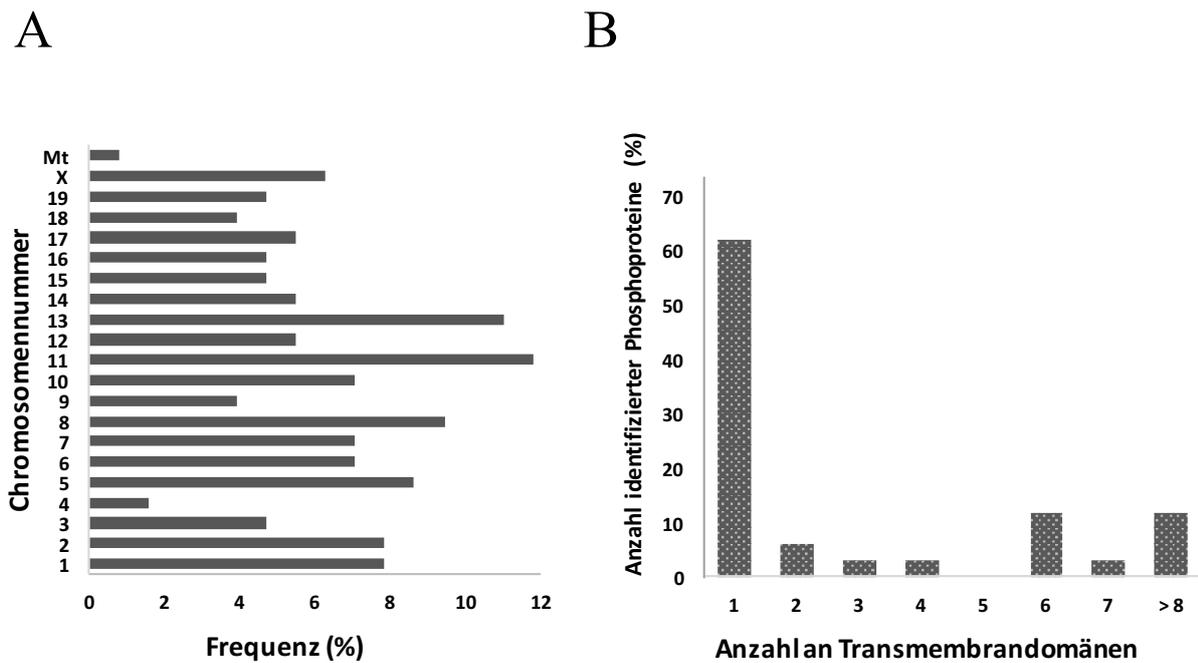


Abb. 25: Genomverteilung aller distinkten gencodierten Phosphoproteine, die in den murinen kardialen Mitochondrien identifiziert worden sind (A). Biochemische Eigenschaften der identifizierten Phosphoproteine: Untersuchung der Anzahl an Transmembrandomänen (B).

Des Weiteren weisen 49 % der identifizierten Phosphoproteine mit einer hohen Vorhersagewahrscheinlichkeit ein mitochondriales Targetingpeptid (MTP) auf (Abbildung 26A). Da das mitochondriale Genom nur für wenige Proteine kodiert, müssen viele zytoplasmatisch synthetisierte mitochondriale Proteine posttranslational in Mitochondrien in das entsprechende Subkompartiment importiert werden, sodass Importprozesse eine wesentliche Rolle spielen. Die sog. Reliabilitätsklasse (RK) zur Identifizierung eines mitochondrialen Importsignals ist in diesem Kontext eine Grösseneinheit von 1- 5, die die Differenz zwischen dem höchsten und zweithöchsten Output Score angibt, wobei die RK 1 die höchste Vorhersagewahrscheinlichkeit indiziert. Die Daten wurden mit dem Softwareprogramm TargetP 1.1 Server ermittelt.

Zur weiteren Analyse biochemischer Eigenschaften wurden das Molekulargewicht (MW), der Isoelektrische Punkt (pI) und der durchschnittliche Hydropathiewert (grand average hydropathy value = GRAVY) bestimmt. Wie in der Abbildung 26B ersichtlich, weisen 50 % aller identifizierten Phosphoproteine ein $MW \leq 40$ kDa auf.

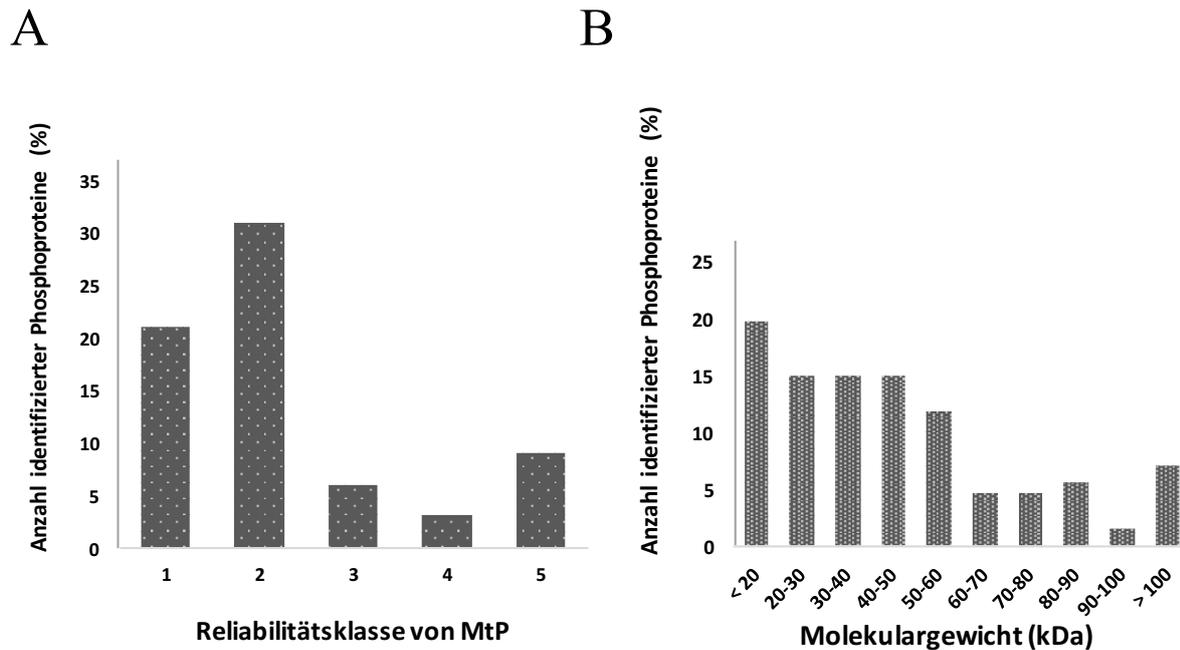


Abb. 26: Biochemische Eigenschaften der identifizierten Phosphoproteine: Untersuchung der Reliabilitätsklassen von mitochondrialen Transit-Peptidsequenzen (A) und Zuordnung der Proteine entsprechend des Molekulargewichts (B).

Die Untersuchung des isoelektrischen Punktes ergibt, dass 65 % der Phosphoproteine einen alkalischen pI ($\geq 8,0$) aufweisen (Abbildung 27A). In der Abbildung 27B wird zudem eine recht symmetrische Verteilung der GRAVY-Werte erkennbar. Sowohl der charakteristische alkalische Schwerpunkt als auch die Bandbreite der Hydropathie mitochondrialer Proteine wurden bereits in anderen Proteomstudien gezeigt (Zhang *et al.*, 2008) und konnten nun auch für das mitochondriale Phosphoproteom bestätigt werden.

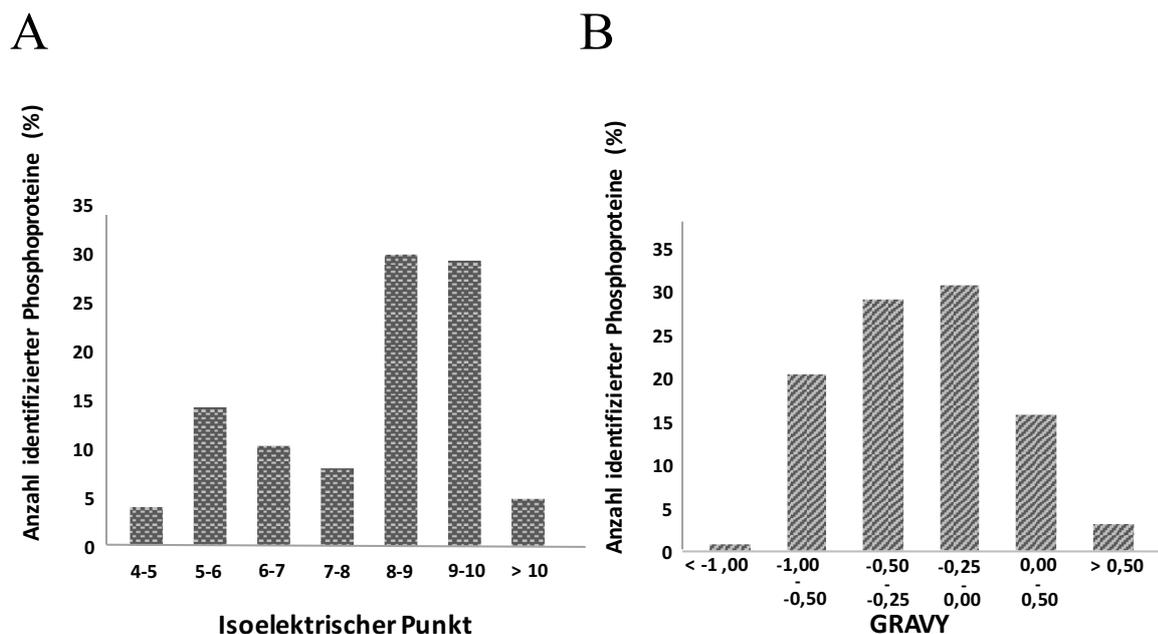


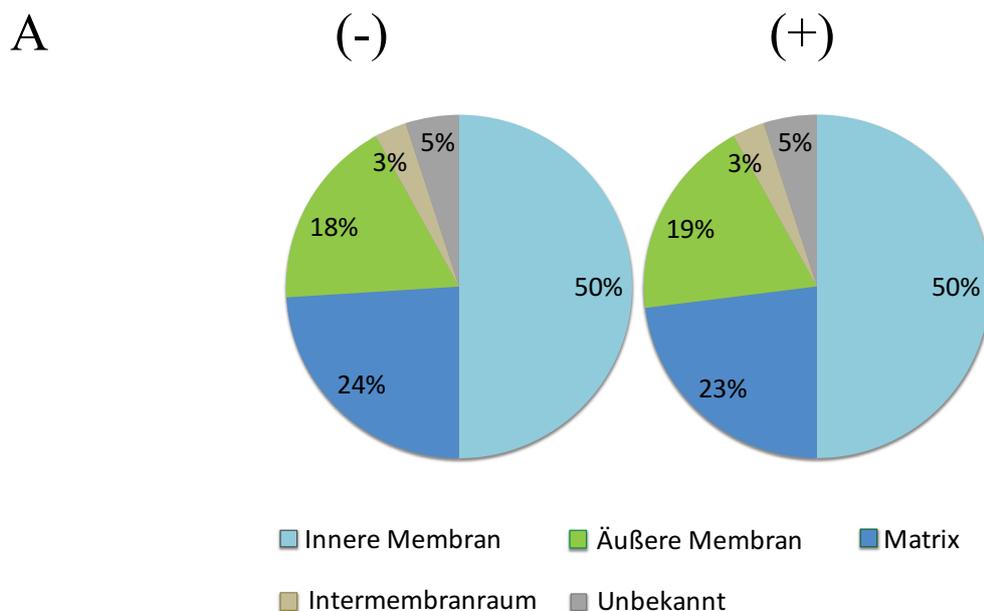
Abb. 27: Biochemische Eigenschaften der identifizierten Phosphoproteine: Untersuchung des isoelektrischen Punktes (A) sowie des durchschnittlichen Hydropathiewertes, der sog. GRAVY (B).

3. 2. 2. 3 Strukturelle und Funktionale Charakterisierung des mitochondrialen Phosphoproteoms

Nach der strukturellen Zuordnung identifizierter Phosphoproteine zu ihren jeweiligen mitochondrialen Subkompartimenten fällt auf, dass sowohl basal (Abbildung 28A (-)) als auch nach Insulinstimulation (Abbildung 28A (+)) 50 % der Phosphoproteine mit der inneren Membran assoziiert sind. 24 % bzw. 23 % sind in der Matrix lokalisiert, während 18 % bzw. 19 % der äußeren Membran zugehörig sind. Nur ein marginaler Anteil der Phosphoproteine ist mit dem Intermembranraum assoziiert (jeweils 3 %), während wenige Proteine (jeweils 5 %) bisher nicht näher submitochondrial lokalisiert worden sind. Es sind somit sämtliche mitochondriale Subkompartimente im Phosphoproteom repräsentiert.

Die 94 (basal) bzw. 121 (Insulin) distinkten Phosphoproteine wurden aufgrund ihrer Hauptfunktion 8 verschiedenen Kategorien zugeordnet (Abbildung 28B). Die funktionelle Struktur des Phosphoproteoms basal ist dem nach Insulinstimulation sehr ähnlich (Abbildung 28B (-) und (+)). Über 50 % der Phosphoproteine lassen sich jeweils der oxidativen Phosphorylierung und dem Metabolismus zuordnen. Weitere Phosphoproteine wurden außerdem in der Signaltransduktion (12 % bzw. 10 %), dem Transport (13 % bzw. 12 %), der DNA/RNA-Synthese und -Reparatur (9 % bzw. 8 %), in der Apoptose (7 % bzw. 7 %) und der Zellstruktur (5 % bzw. 8 %) detektiert.

Spannenderweise wurden Phosphoproteine identifiziert, deren Funktionen noch nicht bekannt sind (*Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing Protein*, *M-Protein* und *Transmembranprotein 186*). Diese funktionelle Klassifizierung der identifizierten Phosphoproteine führt zu der Schlussfolgerung, dass ein weites Spektrum mitochondrialer Proteine Ziel einer kovalenten Modifizierung sind und konsekutiv zahlreiche mitochondriale Funktionen durch reversible Proteinphosphorylierung reguliert werden können.



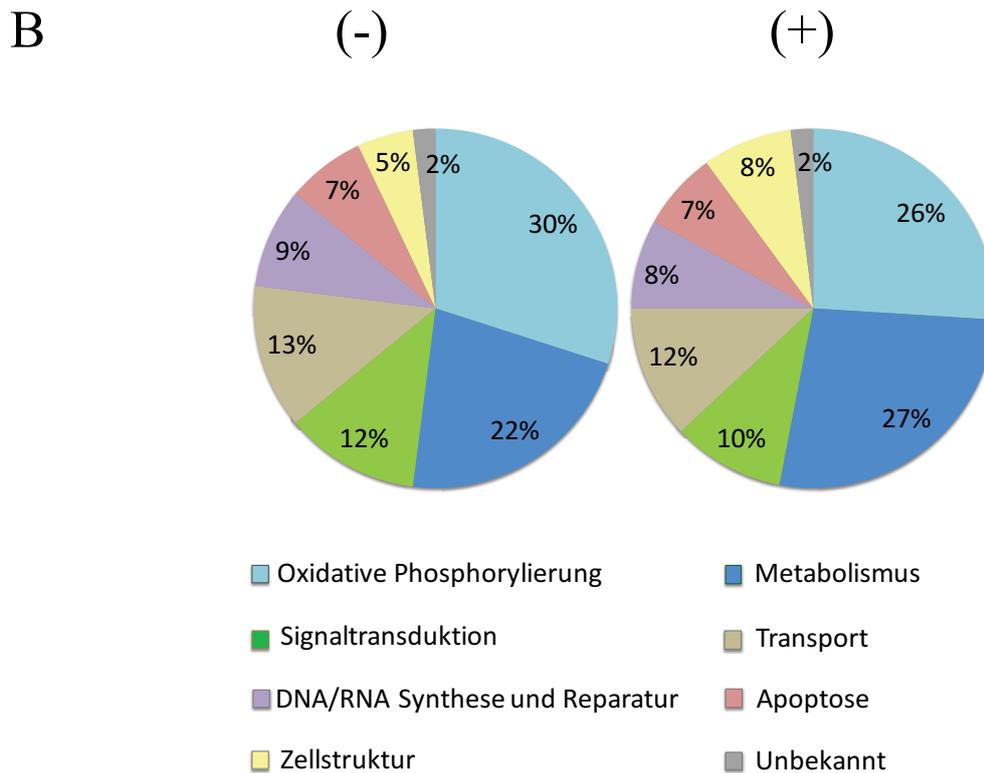


Abb. 28: Funktionelle und räumliche Distribution identifizierter Phosphoproteine. Diagramme repräsentieren die submitochondriale Lokalisation (A) und mitochondriale funktionale Distribution (B). Untersucht wurden das Phosphoproteom basal (-) und nach Insulinstimulation (+).

In der Abbildung 29 sind die Top-8 KEGG Signalwege angereicherter mitochondrialer Phosphoproteine dargestellt. Aus der KEGG-Analyse geht hervor, dass in beiden Phosphoproteomen die klassischen mitochondrialen Funktionen oxidative Phosphorylierung (OXPHOS), Citratzyklus, Pyruvat-, Aminosäure- und Fettsäuremetabolismus am stärksten angereichert sind. Im Vergleich der Phosphoproteome „basal“ und „Insulin“ wird ersichtlich, dass in sämtlichen Stoffwechselwegen mit Ausnahme des Glyoxylat- und Dicarboxylatmetabolismus wesentlich mehr Phosphoproteine nach Insulinbehandlung angereichert sind. Die größten Differenzen in der Anreicherung mit einem Zuwachs von mehr als 115 % im insulinstimulierten Phosphoproteom liegen in den Kategorien oxidative Phosphorylierung, Fettsäuremetabolismus und PPAR Signalweg. Diese Beobachtung indiziert, dass insbesondere diese Signalwege von Insulin beeinflusst werden.

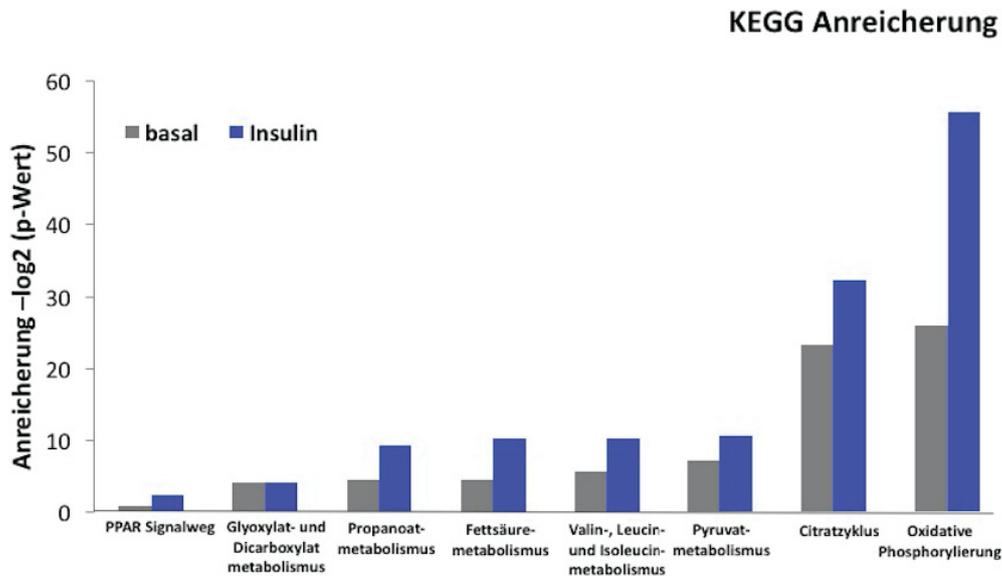


Abb. 29: KEGG-Signalweg-Analyse zeigt die Anreicherung mitochondrialer Phosphoproteine in spezifischen Signalwegen. Die acht am stärksten angereicherten Signalwege (-log₂ (p-Wert)) sind hier dargestellt. In grau sind die Anreicherungen aus dem basalen Phosphoproteom, in blau diejenigen aus dem Insulin-Phosphoproteom dargestellt.

In der Abbildung 30 sind die Zusammenhänge zwischen Funktion und submitochondrialer Lokalisation sämtlicher mitochondrialer Phosphoproteine anschaulich zusammengefasst. Es lässt sich ableiten, dass die meisten Phosphoproteine in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert sind und ihre Funktion im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung bzw. des Metabolismus erfüllen.

Darüber hinaus kann man der Abbildung die Phosphoproteine entnehmen, die im Phosphoproteom exklusiv unter basalen Bedingungen (grau markiert) oder nach Insulinstimulation (blau markiert) identifiziert worden sind. Daraus geht hervor, dass Insulin offensichtlich einen Effekt auf die Phosphorylierung von Proteinen sämtlicher Funktionsklassen vom Transport bishin zur Apoptose ausübt. Auch lässt sich erkennen, dass Insulin die Proteinphosphorylierung aller mitochondrialer Subkompartimente beeinflusst.

Von insgesamt 127 distinkten Phosphoproteinen in den kardialen Mitochondrien sind 44 (35 %) Phosphoproteine einzig mitochondrial, während 83 (65 %) nicht ausschließlich in den Mitochondrien vorkommen, sondern auch in einem oder mehreren weiteren zellulären Kompartimenten lokalisiert sein können (Abbildung 31), wie z. B. im Nukleus (40), dem extrazellulären Raum (38), dem Zytoplasma (33) und der Plasmamembran (19).

	Unbekannt (10)	ÄMM (28)	IMR (4)	IMM (75)	Matrix (38)	Genname
Apoptose (9)		■		■		Aifm1
		■				Bnip3
						Bnip3l
	■					Dnajc5
						Ebag9
		■				Fam82a2
				■	■	Mtch1
					■	Ppif
	■					Stk11
DNA/RNA Synthese- und Reparatur (13)				■		Abce1
					■	Brca1
				■		Gm9755
					■	Gm9897
					■	Hars2
					■	Mrpl55
					■	Mrps36
				■		Phb
				■		Phb2
					■	Ptrf
					■	Pus1
					■	Rps3
					■	Trnt1
Metabolismus (33)				■		Acacb
					■	Acadl
				■		Acadvl
				■	■	Acat1
					■	Aco2
		■				Acs1
					■	Bckdha
					■	Bckdk
				■		Ckmt1
				■		Ckmt2
		■				Cpt1b
					■	Cs
				■		Cyb5r1
					■	Decr1
					■	Dlat
					■	Dld
				■	■	Eci1
					■	Fh
				■	■	Got2
		■				Gpam
				■	■	Hadha
		■				Hk1
		■	■			Hsd17b8
				■		Idh2
				■	Mcat	
			■	■	Mdh2	
				■	Mccc1	
				■	Ogdh	
				■	Pcca	
				■	Pck2	
				■	Pdha1	
	■				Plin5	
				■	Sucla2	

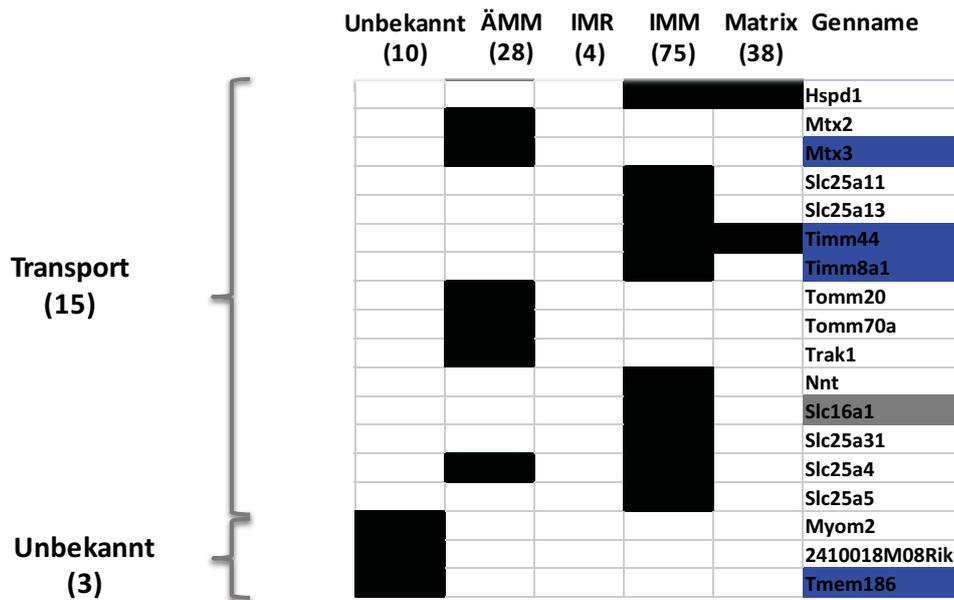


Abb. 30: Funktionelle und räumliche Distribution identifizierter Phosphoproteine. Jedes Phosphoprotein wurde entsprechend der repräsentativen Funktion und der räumlichen Lokalisation zugeordnet. Die Abszisse repräsentiert die submitochondrialen Kompartimente, denen ein mitochondriales Phosphoprotein zugeordnet wird. Die Ordinate repräsentiert die primäre Funktionskategorie. Grau markiert sind sämtliche Phosphoproteine, die einzig im Phosphoproteom basal identifiziert worden sind. Blau markiert sind sämtliche Phosphoproteine, die einzig im Phosphoproteom nach Insulinstimulation gefunden wurden. Nicht farblich markiert sind Phosphoproteine, die Bestandteil beider Phosphoproteome sind.

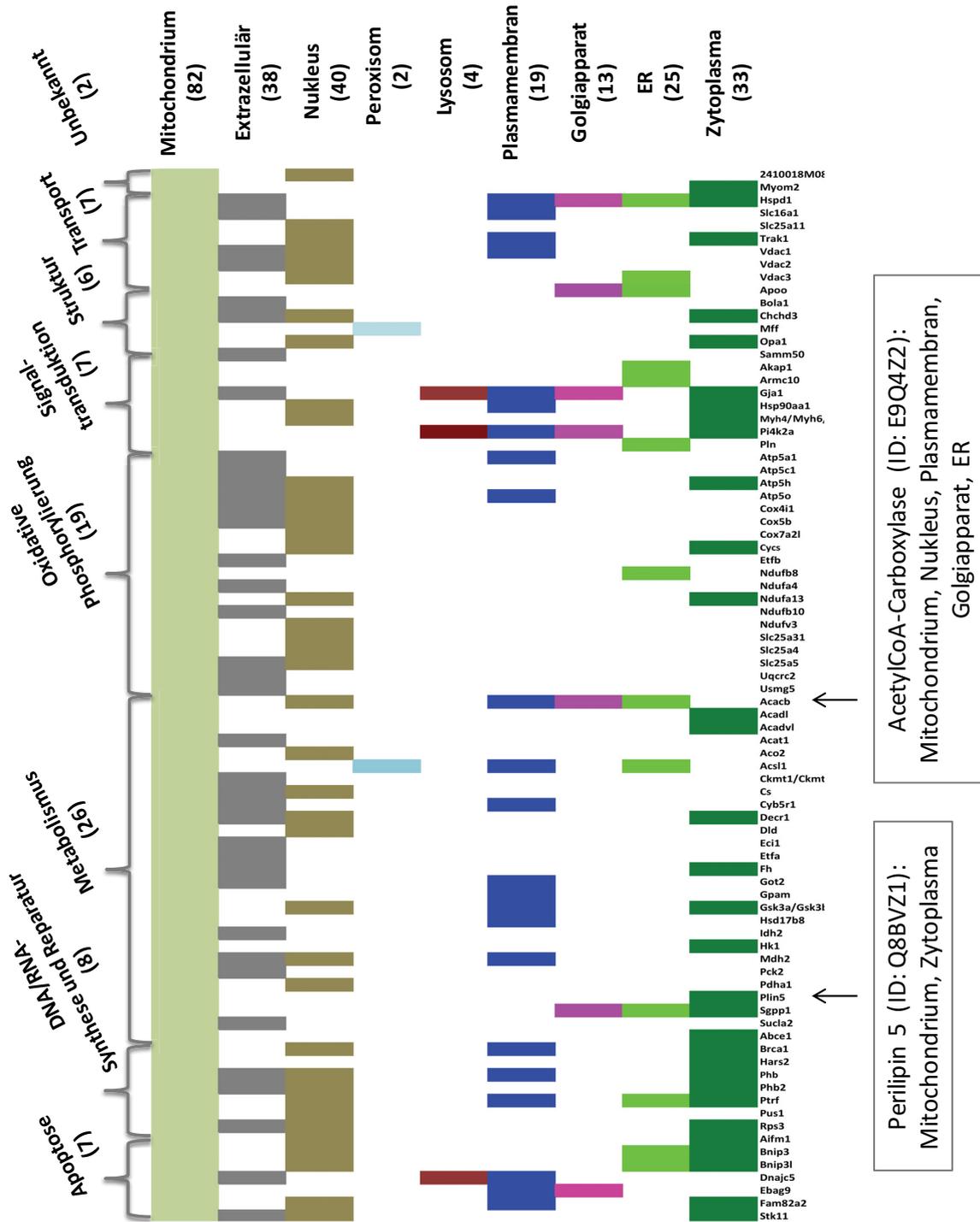


Abb. 31: Funktionelle und räumliche Distribution identifizierter Phosphoproteine. Jedes Phosphoprotein wurde entsprechend der repräsentativen Funktion und der räumlichen Lokalisation zugeordnet. Die Ordinate repräsentiert die subzellulären Kompartimente, denen ein mitochondriales Phosphoprotein zugeordnet wird. Die Abszisse repräsentiert die Funktionskategorie. Die Pfeile zielen auf zwei Beispiele, wie der *Acetyl-CoA-Carboxylase*; dieses wurde auch im Nukleus, in der Plasmamembran, dem Golgiapparat und dem ER nachgewiesen (siehe UniProtKB (<http://www.uniprot.org> Gene Ontology (GO)-Term-Analyse 2.1.1. Plugin (Update 20.03.2014))).

3. 2. 2. 4 Assoziation mit Herzpathologien

Die potentielle Bedeutung der identifizierten Phosphoproteine für Herzerkrankungen wurde anhand humaner Orthologe in OMIM, einem von NCBI etablierten Katalog für humane Gene und genetische Erkrankungen, untersucht. Für 117 der hier identifizierten Phosphoproteine (91 %) sind krankheitsassoziierte Genvarianten bereits bekannt. Von diesen 117 Einträgen sind bei 40 Phosphoproteinen der pathologische Phänotyp und bei 39 die kausalen molekularen Mechanismen bereits beschrieben. Außerdem stehen 10 % der krankheitsassoziierten Phosphoproteine im Zusammenhang mit kardialen Pathologien (Tabelle 6). Auch wenn laut Datenbank einige der Phosphoproteine als krankheitsassoziierte Gene bereits bekannt sind, bleibt die Frage, inwieweit eine veränderte Phosphorylierung an der Entstehung eines Krankheitsmusters beteiligt ist, zunächst noch offen.

Protein ID	Genname	Pathologischer Phänotyp
Q7TMQ1	Gja1	Atrioventrikulärer Septumdefekt Typ3, Hypoplastisches Linksherzsyndrom Typ1
A0A075DCI0	Mt-Atp8	Apikale hypertrophische und infantile Kardiomyopathie
H7BX59	Pus1	Myopathie
P48962	Slc25a4	Mitochondriales DNA Depletionssyndrom Typ12, kardiomyopathischer Typ
Q3U6C7	Sucla2	Mitochondriales DNA Depletionssyndrom Typ5, kardiomyopathischer Typ

Tabelle 6: Assoziation identifizierter mitochondrialer kardialer Phosphoproteine mit pathologischen kardialen Phänotypen.

3. 2. 2. 5 Charakterisierung der Phosphorylierungsstellen

Zum Verständnis des mitochondrialen Phosphoproteoms ist eine systematische Kartierung von Phosphorylierungsstellen essentiell. Im Phosphoproteom wurden basal 156 und insulinstimuliert 217 Phosphorylierungsstellen hoher Konfidenz identifiziert (Abbildung 33A). Ob es sich bei bestimmten Phosphorylierungsstellen tatsächlich um eine Mehrfachphosphorylierung oder eine Einfachphosphorylierung mit (noch) unklarer Zuordnung der exakten Phosphorylierungsstelle handelt, bleibt durch die Programmanalyse zunächst offen.

Ein repräsentatives Spektrum eines Phosphopeptides inklusive einer Phosphorylierungsstelle ist hierzu in Abbildung 32 dargestellt.

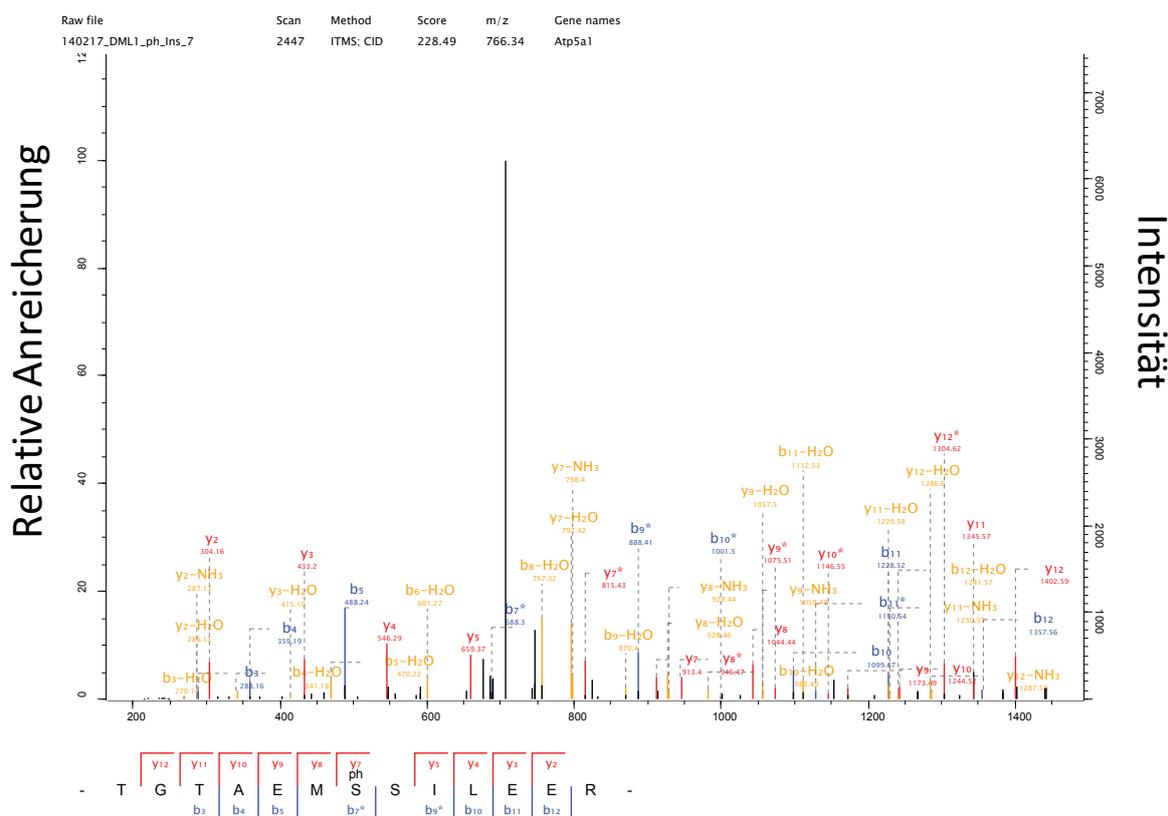


Abb. 32: Beispielhaftes MS- Spektrum. Es zeigt ein Fragmentierungsmuster zur Peptidentifikation und zur Bestimmung der Phosphorylierungsstelle aus Tandem Massenspektrometrie-Daten: ATP-Synthase Untereinheit α mit S53 mit einem PhosphoRS Localization Score (pRS Wahrscheinlichkeit) von 0,99.

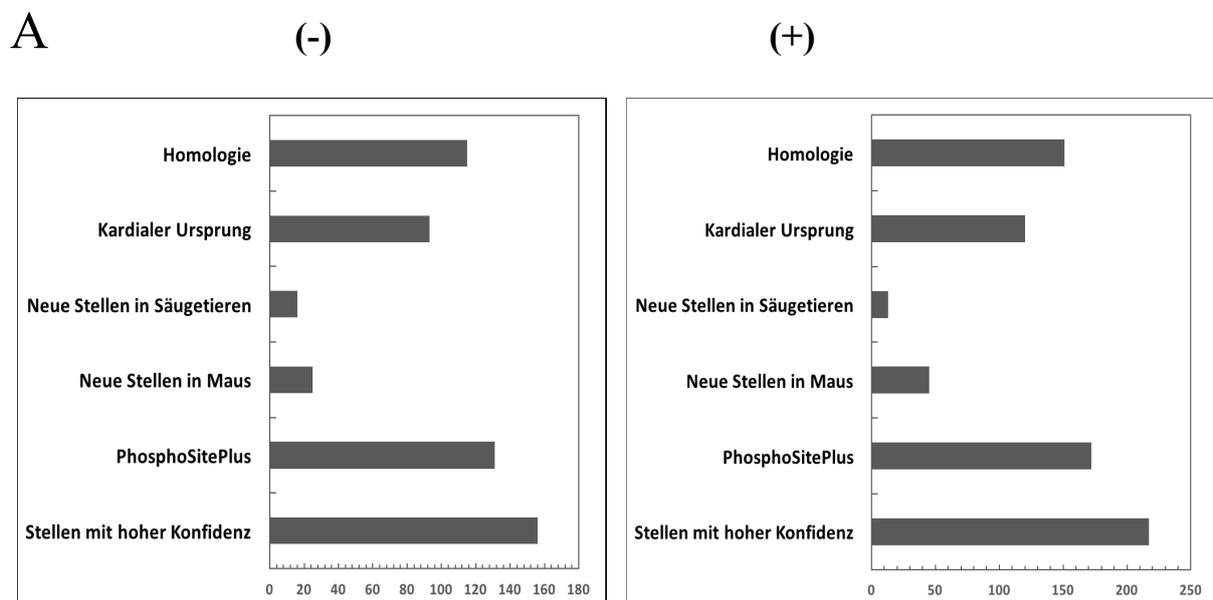
Die Analyse der Phosphorylierungsstellen ergab, dass auch neue, bisher unbekannte Phosphorylierungsstellen identifiziert wurden.

Insgesamt sind 31 Phosphorylierungsstellen exklusiv im Basalzustand, 103 einzig nach Insulinstimulation und 125 unter beiden Bedingungen identifiziert worden (Tabelle 7). Davon sind basal 25 (16 %) und insulinstimuliert 46 (21 %) als neue murine Phosphorylierungsstellen detektiert worden; die übrigen sind bereits bei Phosphositeplus beschrieben. Interessanterweise sind 6 neue Phosphorylierungsstellen exklusiv unter basalen Bedingungen (-) und 27 neue Phosphorylierungsstellen exklusiv nach Insulinstimulation (+) nachweisbar (Tabelle 7), was einem Anstieg von 350 % entspricht. Unter allen neuen Stellen sind 16 (basal) und 13 (insulinstimuliert) erstmalig bei Säugetieren detektiert worden. Im stimulierten Phosphoproteom konnte außerdem das *Mitochondrial Fission Process-Protein* erstmalig bei der Maus als Phosphoprotein nachgewiesen bzw. beim *Transcription Termination Factor-Protein* erstmalig drei Phosphorylierungsstellen entdeckt werden.

Unter allen Stellen sind 93 (60 %) (basal) bzw. 120 (55 %) (Insulin) bereits am Herzen identifiziert worden. Homologe Phosphorylierungsstellen zu den identifizierten Stellen gibt es 115 (74 %) (basal) bzw. 151 (70 %) (Insulin) (aus PhosphoSitePlus (<http://www.phosphosite.org>), 05.11.2015) (Abbildung 33A).

Zusammenfassend sind im Phosphoproteom nach Insulinstimulation sowohl mehr Phosphorylierungsstellen als auch mehr neuartige Stellen identifiziert worden. Es muss jedoch angemerkt werden, dass die Reproduzierbarkeit dieser Ergebnisse eingeschränkt war. Nur 15 % aller Phosphorylierungsstellen ließen sich im Phosphoproteom (- Insulin) und lediglich 19 % aller Phosphorylierungsstellen ließen sich im Phosphoproteom (+ Insulin) über alle vier Experimente hinweg nachweisen. Hingegen ließen sich 66 % aller Phosphorylierungsstellen im Phosphoproteom (- Insulin) bzw. 70 % im Phosphoproteom (+ Insulin) in $n \geq 2$ Experimenten nachweisen. Die geringe Reproduzierbarkeit deckt sich mit den Ergebnissen anderer Phosphoproteomstudien (Bak *et al.*, 2013). In der Betrachtung der Verteilung phosphorylierter Aminosäuren konnte in dem Phosphoserin/Phosphothreonin/Phosphotyrosin-Verhältnis basal (77:16:7) kein wesentlicher Unterschied zu dem Verhältnis nach Insulinstimulation (80:14:6) erkannt werden (Abbildung 33B). Die Mehrheit der identifizierten Phosphorylierungsstellen ließ sich unter beiden Bedingungen dem Metabolismus sowie der oxidativen Phosphorylierung zuordnen (Abbildung 33C).

Hieraus lässt sich die Hypothese vermuten, dass Phosphorylierungen ein essentielles Element in der Regulation mitochondrialer Funktionen sind. Darüber hinaus bestärken die Ergebnisse die Vermutung, dass Insulin mitochondriale Prozesse durch gesteigerte Phosphorylierung mitochondrialer Proteine reguliert. Des Weiteren suggerieren die Ergebnisse, dass die insulinvermittelten Modifikationen dynamisch und reversibel sind.



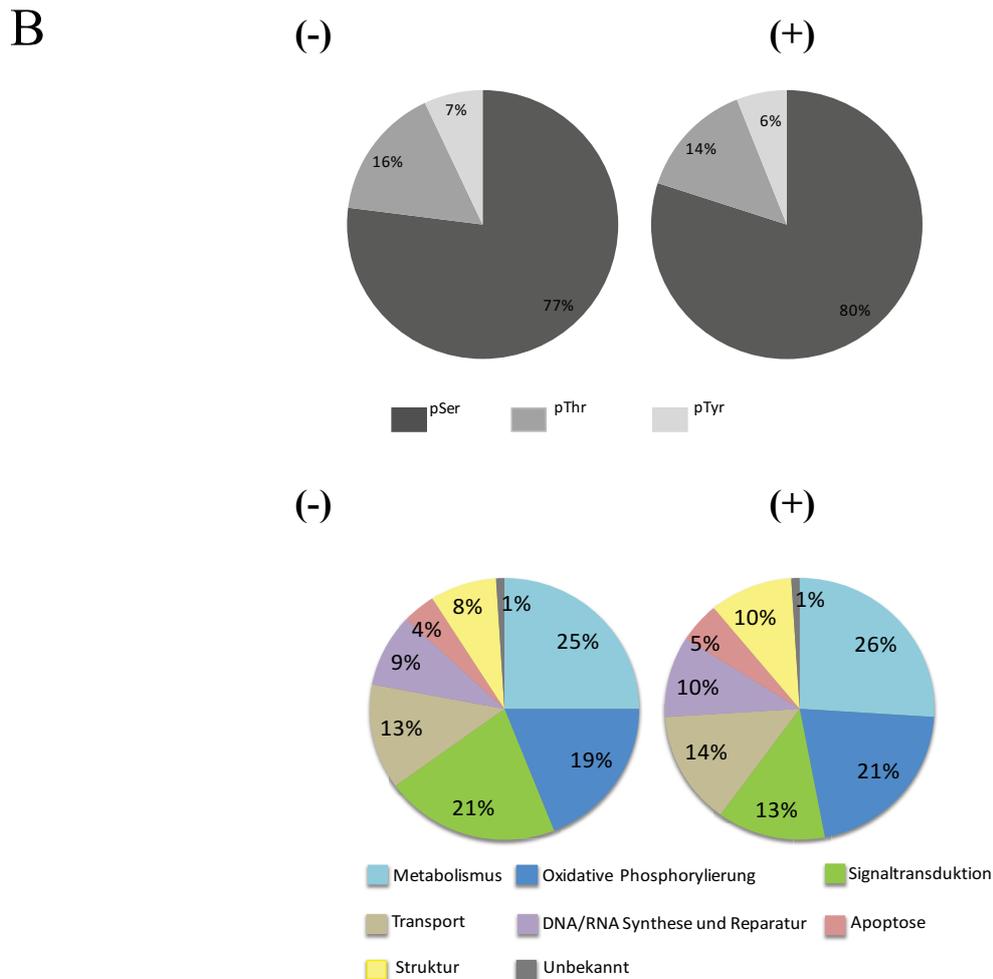


Abb. 33: Systematische Übersicht der Ergebnisse des Phosphoproteoms basal (-) und nach Insulinstimulation (+). Zusammenfassung der identifizierten Phosphorylierungsstellen mit hoher Konfidenz, der bei PhosphoSitePlus bereits bekannten Stellen, der neuen Stellen in Maus und Säugetieren, der Stellen mit beschriebenem kardialen Ursprung und der mit bekannten Orthologien (A). Kuchendiagramm zur Darstellung der Verteilung des Serin (pSer)-, Threonin (pThr)- und Tyrosin (pTyr)- Phosphorylierungsmusters (B). Funktionale Zuordnung aller identifizierten mitochondrialen Phosphorylierungsstellen (C).

3. 2. 2. 5. 1 Phosphorylierungsmuster des ATP-Synthase-Komplexes

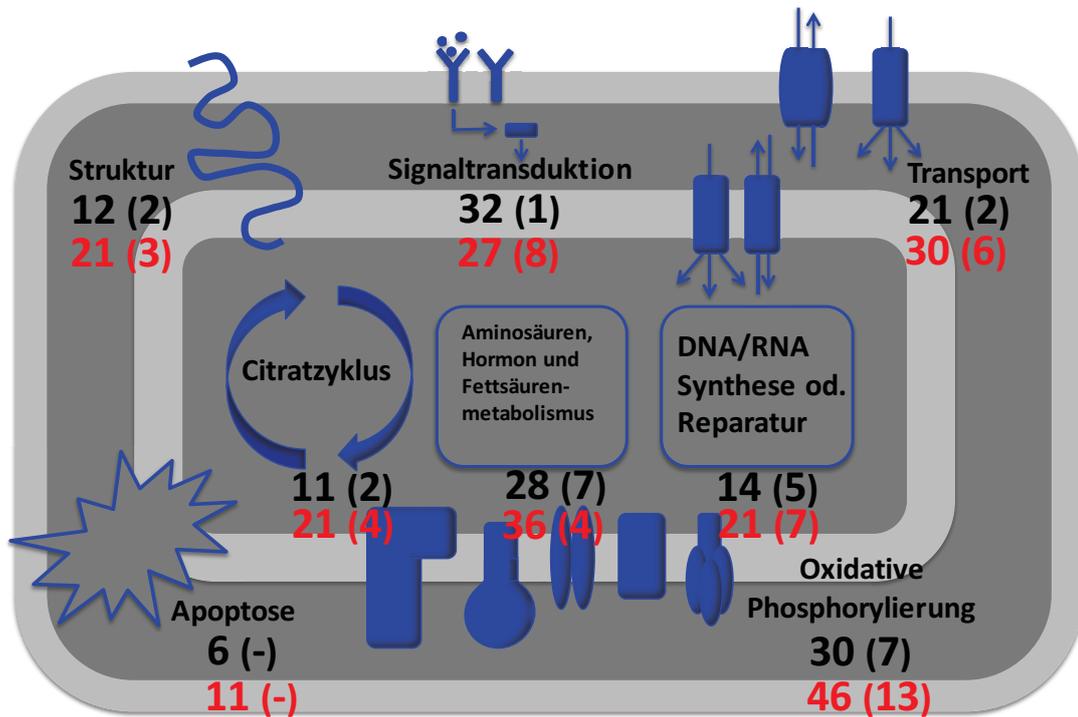
Die Zuordnung von Phosphorylierungsereignissen zu wichtigen mitochondrialen Stoffwechselwegen ermöglicht eine Interpretation der potentiellen funktionellen Bedeutsamkeit identifizierter Phosphopeptide (Abbildung 34A). Zur näheren Aufschlüsselung wurde das Phosphorylierungsmuster der am stärksten angereicherten Signalwege- des Metabolismus sowie der oxidativen Phosphorylierung inklusive der ATP-Synthase- näher aufgeschlüsselt (Abbildung 34B, C und Abbildung 35).

Der ATP-Synthase-Komplex setzt sich aus zwei funktionellen Domänen, F_0 und F_1 , zusammen. F_1 ist in der mitochondrialen Matrix lokalisiert und besteht aus den fünf Untereinheiten α , β , γ , δ und ϵ . F_0 besteht aus den Untereinheiten c, a, b, d, F_6 , OSCP und den akzessorischen Untereinheiten e, f, g, und A6L. Während unter basalen Bedingungen 6 Phosphoproteine mit 11 Phosphorylierungsstellen nachgewiesen wurden, stieg diese Zahl nach Insulinstimulation deutlich an: insgesamt 9 distinkte Phosphoproteine und 16 Phosphorylierungsstellen konnten der ATP-Synthase zugeordnet werden (Abbildung 34C).

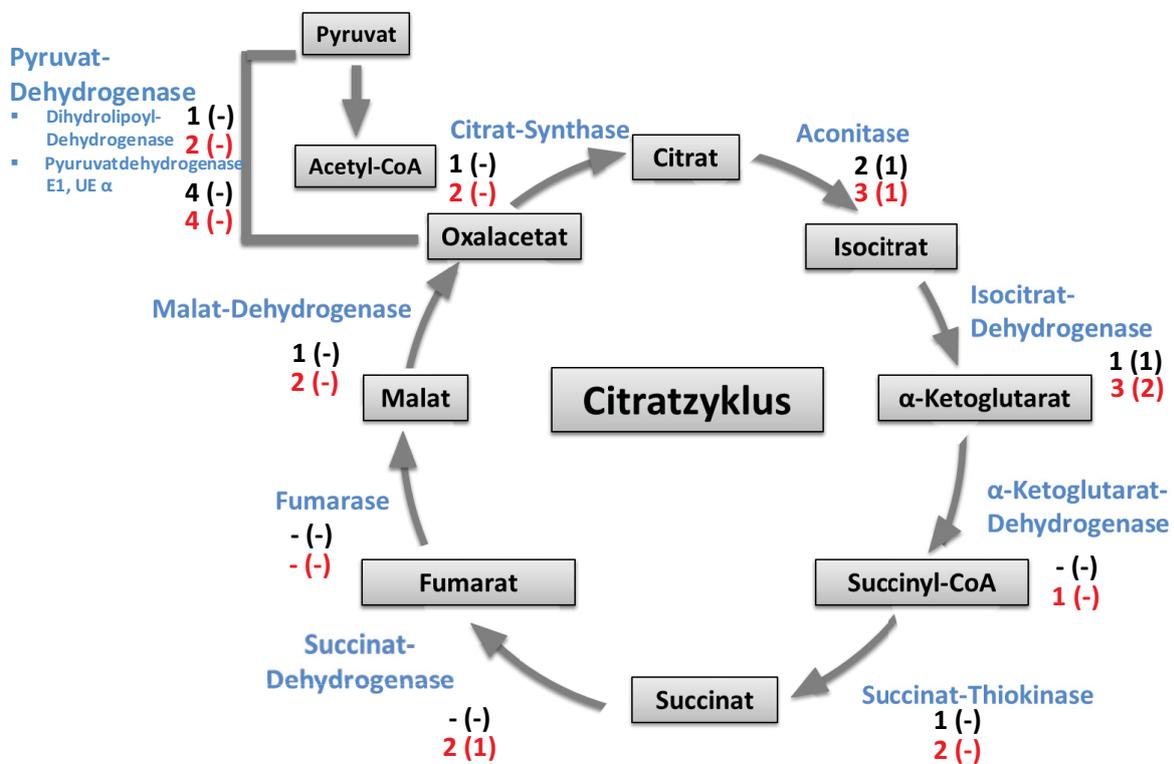
Die Phosphoproteine *ATP-Synthase Untereinheit δ* (Atpd), *ATP-Synthase Untereinheit d* (Atp5h) sowie *Oligomycin sensitivity conferral protein* (Atp5o) wurden bezeichnenderweise nur im Phosphoproteom nach Insulinstimulation detektiert (Abbildung 34C und 35). Des Weiteren wurden erstmalig drei neue Phosphorylierungsereignisse in der ATP-Synthase identifiziert: im Phosphoproteom (-) und (+) Insulin *ATP-Synthase Untereinheit γ* (Atp5c1) (T144), im Phosphoproteom (+) Insulin *ATP-Synthase Untereinheit δ* (Atpd) (S139) sowie *Oligomycin sensitivity conferral protein* (Atp5o) (S180). Repräsentative MS-Spektren der neuen Phosphorylierungsstellen sind in der Abbildung 36 zusammengefasst.

Dies erlaubt den Rückschluss, dass Insulin einen bedeutsamen Einfluss auf die ATP-Synthase durch gesteigerte Phosphorylierung von Proteinen der ATP-Synthase ausübt.

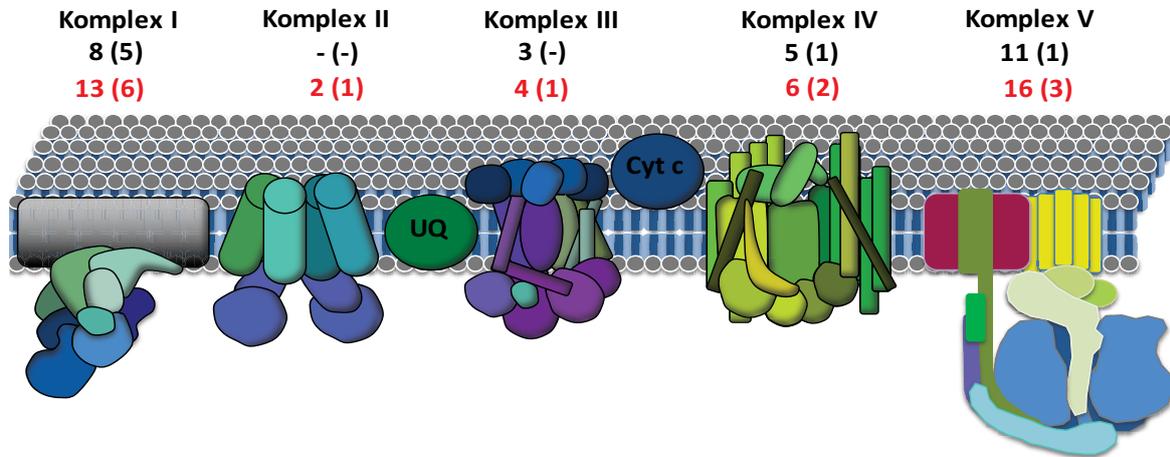
A Mitochondrion



B Citratzyklus



C Atmungskette

**Komplex I**

1) Uncharacterized Protein C6orf203 Homolog	1 (-)	1 (-)
2) NADH Dehydrogenase 1 α UE 2	1 (-)	1 (-)
3) NADH Dehydrogenase 1 α UE 4	2 (1)	2 (1)
4) NADH Dehydrogenase 1 α UE 13	- (-)	1 (1)
5) NADH Dehydrogenase 1 β UE 8	2 (2)	2 (2)
6) NADH Dehydrogenase 1 β UE 10	- (-)	- (-)
7) NADH Dehydrogenase 1 β UE 11	- (-)	2 (1)
8) NADH Dehydrogenase Iron Sulfur Protein	1 (-)	1 (-)
9) NADH Dehydrogenase Iron Sulfur Protein 7	- (-)	2 (-)
10) NADH Dehydrogenase Flavoprotein 3	1 (1)	1 (1)

Komplex II

1) Succinat Dehydrogenase Flavoprotein	- (-)	2 (1)
2) Ubiquinon Biosynthese Protein COQ9	1 (-)	1 (-)
3) Elektronen Transfer Flavoprotein UE α	- (-)	2 (-)
4) Elektronen Transfer Flavoprotein UE β	1 (-)	1 (-)
5) Elektronen Transfer Flavoprotein-Ubiquinon Oxidoreduktase	1 (-)	1 (-)

Komplex III

1) Cytochrom c Oxidase UE 4, Isoform 1	2 (-)	2 (-)
2) Cytochrom c Oxidase UE 5	- (-)	- (-)
3) Cytochrom c Oxidase UE 7a	- (-)	1 (1)
4) Cytochrom c	1 (-)	1 (-)

Komplex IV

1) Cytochrom b-c1 UE 1	1 (-)	2 (1)
2) Cytochrom b-c1 UE 2	3 (1)	3 (1)
3) Cytochrom b-c1 UE 6	1 (-)	1 (1)

Komplex V

1) ATP-Synthase UE α	4 (-)	5 (-)
2) ATP-Synthase UE γ	2 (1)	2 (1)
3) ATP-Synthase UE δ	- (-)	2 (1)
4) ATP-Synthase UE d	- (-)	1 (-)
5) ATP-Synthase UE e	1 (-)	1 (-)
6) ATP-Synthase UE O	- (-)	1 (1)
7) ATP-Synthase- Coupling Faktor 6	1 (-)	1 (-)
8) ATP-Synthase Protein 8	1 (-)	1 (-)
9) Up-regulated During Skeletal Muscle Growth Protein 5	2 (-)	2 (-)

Abb. 34: Gesamtübersicht sämtlicher Phosphorylierungsereignisse in Mitochondrien im Basalzustand und nach Insulinstimulation in acht mitochondrialen Funktionsklassen (A), in dem Citratzyklus (B) und in der Atmungskette (C). Die schwarz markierten Zahlen repräsentieren die jeweils identifizierten Phosphorylierungsereignisse im Basalzustand, die rot unterlegten Zahlen repräsentieren die Phosphorylierungsereignisse nach Insulinstimulation. Die Zahlen in Klammern weisen auf die Anzahl der neu identifizierten Phosphorylierungsstellen hin.

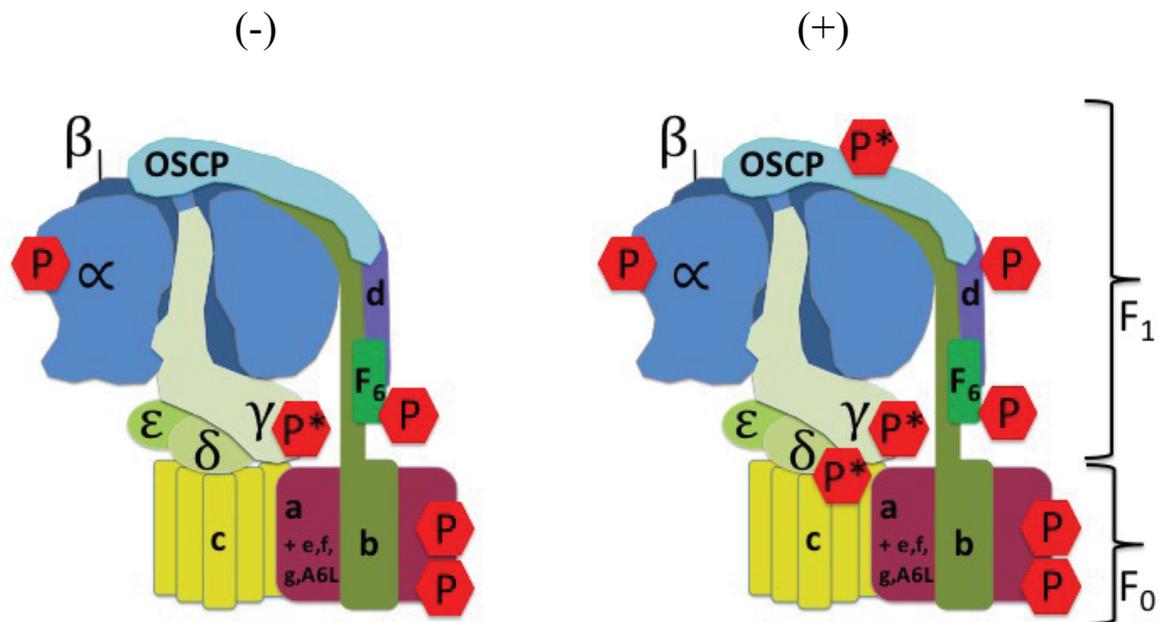


Abb. 35: Schematische Darstellung der ATP-Synthase und ihrer Phosphorylierungsstellen vor (-) und nach (+) Insulinstimulation (modifiziert nach (Jonckheere *et al.*, 2012)). Die ATP-Synthase setzt sich aus zwei funktionellen Domänen, F₀ und F₁, zusammen. F₀ ist in der mitochondrialen Matrix lokalisiert und besteht aus den fünf Untereinheiten α , β , γ , δ und ϵ . F₁ besteht aus den Untereinheiten c, a, b, d, F₆, OSCP und den akzessorischen Untereinheiten e, f, g, und A6L. Die roten Markierungen kennzeichnen die identifizierten Phosphorylierungsereignisse. Die Markierung * symbolisiert neue mitochondriale Phosphorylierungsstellen laut der Datenbank von PhosphoSitePlus. Nicht dargestellt ist die Phosphorylierungsstelle von *Up-regulated During Skeletal Muscle Growth Protein 5* (Usmg5), da die Lokalisation des Proteins innerhalb der ATP-Synthase noch nicht bekannt ist (Ohsakaya *et al.*, 2011; Wittig and Schagger, 2008).

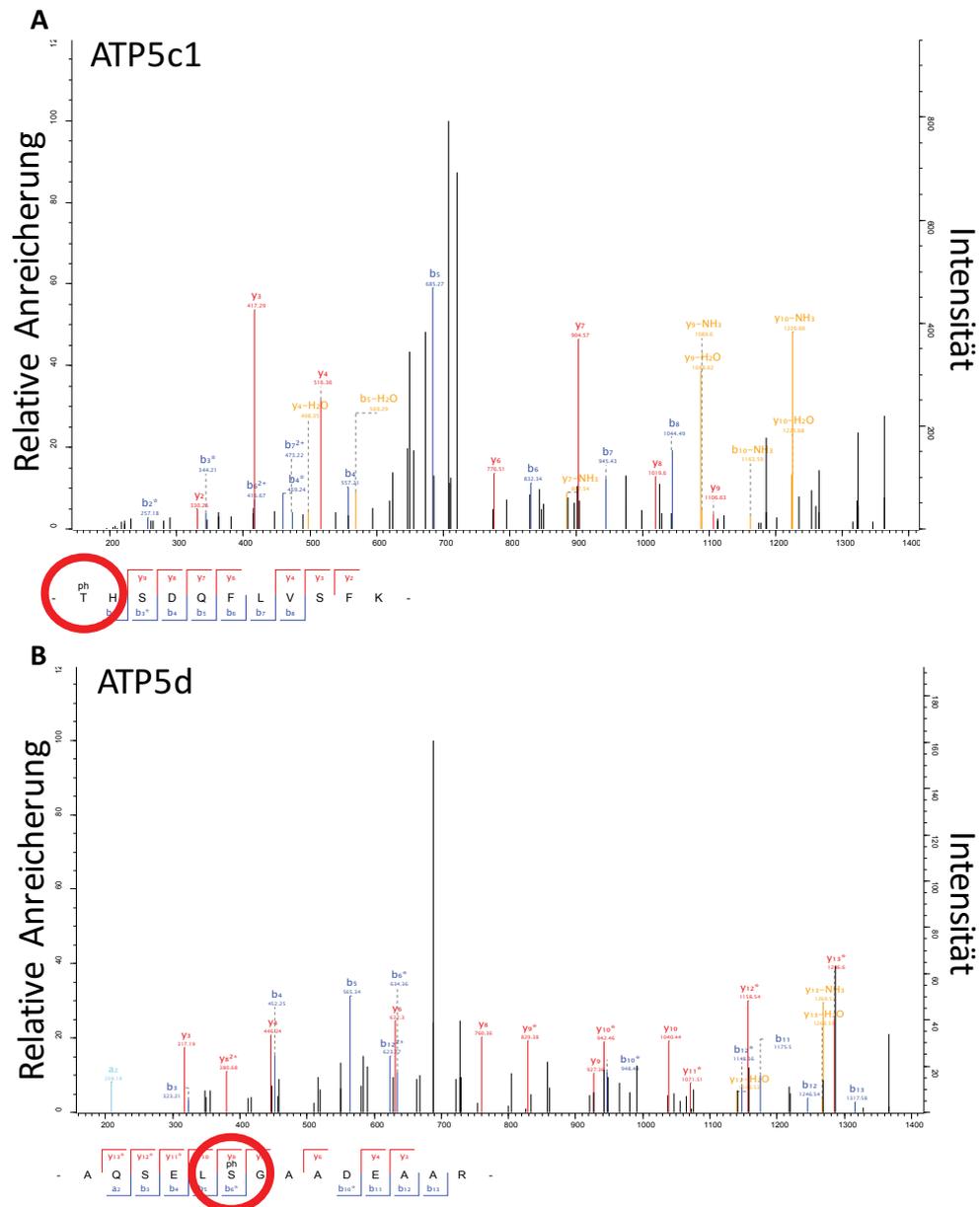


Abb. 36: Spektrum mit Zuordnung der erstmalig identifizierten Phosphorylierungsstelle aus Tandem Massenspektrometrie-Daten. A) *ATP-Synthase Untereinheit γ* (ATP5c1) mit neuer Phosphorylierungsstelle T144. B) *ATP-Synthase Untereinheit δ* (ATP5d) mit neuer Phosphorylierungsstelle S139.

Uniprot ID	Genname	basal	basal + Insulin	Insulin
Q9CQF4	1700021F05Rik		S106	
B2RPU8	2410018M08Rik		S45	
P61222	Abce1	T514#, T526#, Y527#		
E9Q4Z2	Acacb		S1332	
P51174	Acadl		S54, S55, S193	
P50544	Acadvl	S58#		S57
Q3TQP7	Acat1			S238
Q99KI0	Aco2		S40#, S237	S669
D3Z041	Acs1		S197, S233	S230, S621
Q9Z0X1	Aifm1		S370	S121, S374
O08715	Akap1		S55, S103	
Q9DCZ4	Apoo		S44	
Q9D0L7	Armc10	T48	S43	
Q03265	Atp5a1	T64	T48, S53, S65	S52, S63
Q3UD06	Atp5c1		T144#, S146	
Q4FK74	Atp5d			S139#, S142
Q9DCX2	Atp5h			S106
Q06185	Atp5i		S68	
P97450	Atp5j		S108	
Q9DB20	Atp5o			S180#
Q3U3J1	Bckdha		S344	
O55003	Bnip3		S88	T86
Q3TEW0	Bnip3l			S61
Q9D8S9	Bola1			S81
P48754	Brc1	S186		
Q9CRB9	Chchd3		S29, S50, S51, S56, S58, T188#	
Q91VN4	Chchd6		S13	
Q6P8J7	Ckmt2	S211#, T356		Y208, Y368
Q6P8J7/Q54	Ckmt1/Ckmt2	S323	S319	
Q8K1Z0	Coq9		S81	
A2RSV8	Cox4i1		S56, S58	
E9PZS8	Cox7a2l			S47#
Q3UIM5	Cpt1b		S330	
Q9CZU6	Cs		S226	S225
Q9DB73	Cyb5r1		S150#	
Q4FJK0	Decr1	T69#		T65#
Q8BMF4	Dlat	S470		
O08749	Dld			S285, S297
Q921J3	Dnajc5		S10	
P42125	Eci1		S221	T265#, S266
Q99LC5	Etfa			S140, S193
Q9DCW4	Etfb		S69	
Q921G7	Etfdh		S550	
Q9CWE0	Fam54b		S235	S100, S220, S234
Q3UJU9	Fam82a2	S44		S46, S50
Q7TMQ1	Gja1	Y265	S306, S314, S325, T326, S328, S330, S365, S372, S373	S5, S364
G3UWG1/Q5	Gm10108/Cyca		S48	
D3YVN7	Tufm		S312	
A0A096P6K7	Mterf			S300#, Y301#, S308#
P05202	Got2		S133	S123#, T332#
Q69ZG4	Gpam		S694	
Q2NL51	Gsk3a/Gsk3b	S215	Y216	
Q8BMS1	Hadha	T418#	S231, S316, T395	S419, S643
Q99KK9	Hars2			S66
P17710	HK1			T913
A0A068BEQ2	Hsd17b8	S55	S58	
P07901	Hsp90aa1	Y628		S400
P63038	Hspd1	S67, S70, S488		T231#
P54071	Idh2		S301#	S408#, S423
Q8CAQ8	Immt		T320, S387, S554#	S113, S115, S355
Q8R3F5	Mcat	S41		
Q99MR8	Mccc1			S715
P08249	Mdh2		S246	T235
Q6PCP5	Mff			S146
Q9CZ83	Mrpl55	S112		
Q9CQX8	Mrps36	T59#	S58#, S89	S60
A0A075DCI0	mt-Atp8		S63	
Q791T5	Mtch1			S382
Q3TI65	Mtftp1			S164

Uniprot ID	Genname	basal	basal + Insulin	Insulin
O88441	Mtx2		T199	
D3YTP3	Mtx3			S311
B2RQQ1	Myh4/Myh6/Myh7		S1147, S1201	
O55124	Myom2	S76		
Q9ERS2	Ndufa13			T114#
Q9CQ75	Ndufa2		S78	
Q62425	Ndufa4		S67, S73#	
Q9D6J5	Ndufb8		S40#, T44#	
O09111	Ndufb11			S39, Y126#
E9QPX3	Ndufs4			S144
Q9DC70	Ndufs7		S39	S41
Q8BK30	Ndufv3		S54#	
Q61941	Nnt		Y373	S75#, S769#
Q60597	Ogdh			S636
H7BX01	Opa1			S401#
Q3UGC8	Pcca			S247, S248
Q3TDE6	Pck2			S304
P35486	Pdha1	Y301	S293, S295, S300	S232
P67778	Phb		Y249	S101, T141#
O35129	Phb2		S151, T155	S161
Q2TBE6	Pi4k2a			S462
Q8BVZ1	Plin5	S290#, S292	S163	
P61014	Pln		S16, T17	
Q99KR7	Ppif		S122	
O54724	Ptrf		S38, S42	T40
H7BX59	Pus1			T422
P62908	Rps3			T221
Q8K2B3	Sdha			S530, S663#
Q3UDY2	Sgpp1		S101, T103	
Q5SX53	Slc25a11		S203#	T115#, Y202
Q9QXX4	Slc25a13		S51	
B2RTC8	Slc25a31		Y94, T97	
P48962	Slc25a4		S22, S150, Y191, Y195	S42, S149, T197#, S276
P51881	Slc25a5		S22, Y191, Y195	
Q9WTK7	Stk11			S31
Q3U6C7	Sucla2	S176	S279	S281
Q9WVA2	Timm8a1			S57, S96
Q78HW2	Tmem186			S48
Q4KL41	Tomm20		S135, S138	
Q80TT4	Tomm70a	S99	S94	S108
Q80TL6	Trak1		S199	S716
Q8K1J6	Trnt1			T337#, S340#
Q9CZ13	Uqcrc1		S212	S386#
Q9DB77	Uqcrc2		S228#, S367, S368#	
Q9CQ69	Uqcrcq		S29	
Q78IK2	Usmg5		S6, T25	
Q60932	Vdac1	S115	T32, S59, S117, S253,	S57, S228, T230, T271#
Q60930	Vdac2		S116, S252	S54#
Q3TTN3	Vdac3		S45#, T70#	S37#, Y49#

Tabelle 7: Mitochondriale Phosphoproteine und ihre Phosphorylierungsstellen aus kardialen murinen Mitochondrien vor und nach Insulinstimulation. Die Markierung # symbolisiert neue mitochondriale Phosphorylierungsstellen laut der Datenbank von PhosphoSitePlus. Ob es sich bei bestimmten Phosphorylierungsstellen tatsächlich um eine Mehrfachphosphorylierung oder eine Einfachphosphorylierung mit (noch) unklarer Zuordnung der exakten Phosphorylierungsstelle handelt, bleibt durch die Programmanalyse zunächst offen.

3. 2. 2. 6 Akt-isoformspezifische Substrate

Um herauszufinden, welche Phosphopeptide ein Substrat von Akt sind, d.h. ein RXXS* Akt-ähnliches Substratmotiv (Abbildung 37) tragen, wurden die in dieser Studie identifizierten Phosphopeptide mit bereits bekannten Akt-Substraten verglichen, die bei PhosphoSitePlus publiziert sind.

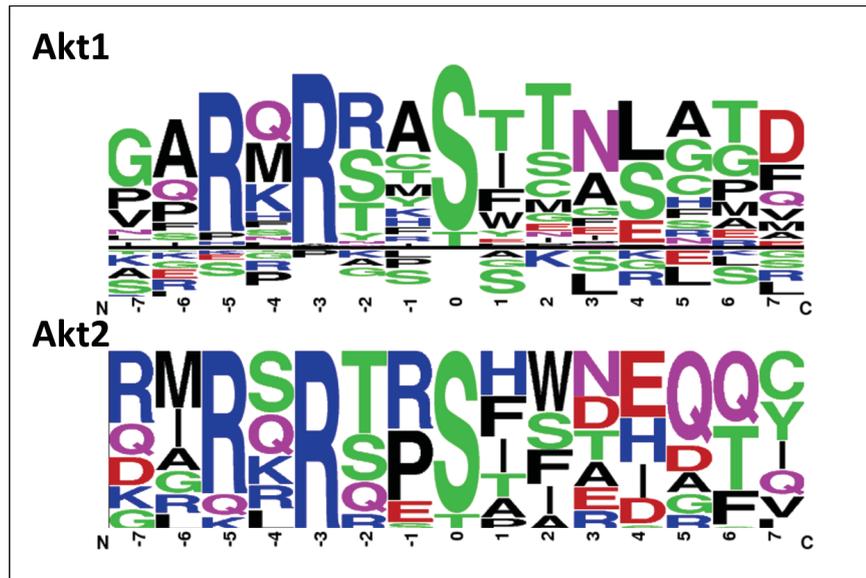


Abb. 37: RXXS*Akt-isoformspezifisches Substratmotiv (modifiziert nach PhosphoSitePlus). Die obere Sequenz repräsentiert Akt1, die untere Sequenz Akt2.

Im Phosphoproteom basal und nach Insulinstimulation wurden jeweils drei Phosphoproteine identifiziert, die als Substrat von Akt1 bekannt sind. Unter den Phosphoproteinen *DnaJ homolog subfamily C member 5*, *Gap junction protein* und *Cardiac phospholamban* sind Phosphopeptide mit isoformspezifischem Substratmotiv bei bekannter Akt-Phosphorylierungsstelle (s. oben) identifiziert worden. Spannenderweise konnte im Phosphoproteom basal das Protein *Breast cancer type 1 susceptibility protein homolog*- ein Peptid mit Konsensusmotiv an der Phosphorylierungsstelle S186-entdeckt werden, das der Datenbank Phosphositeplus zufolge bisher nicht als Akt-Ziel bekannt ist.

Wie in Abbildung 38 ersichtlich, wurden in beiden Phosphoproteomen Substrate von Akt1, nicht jedoch von Akt2 identifiziert. Darüber hinaus wurden in dieser Studie im Vergleich zu den bei PhosphoSitePlus publizierten Daten nur ein Bruchteil aller bekannten Akt-Substrate identifiziert. Da die Mehrheit aller regulierten Phosphopeptide kein Akt-spezifisches Target repräsentiert, darf angenommen werden, dass entweder bisher unbekannte Sequenzen oder makromolekulare Interaktionen eine Akt-abhängige Phosphorylierung der Substrate vermitteln oder dass Akt indirekt über ein Netzwerk an Kinasen Einfluss auf die Regulation von Phosphopeptiden ausübt. Dies führte zu der Frage, welche anderen Kinasen zu den Phosphorylierungsänderungen beitragen.

Uniprot ID	Genname	Phosphosite	Modifizierte Sequenz	Akt1-Substrat	Akt2-Substrat
P48754	Brca1	S186	_SY(ph)QRKGS(ph)R_	x	-
Q921J3	Dnajc5	S10	_SLS(ph)TSGESLYHVLGLDK_	x	-
Q921J3	Dnajc5	S10	_SLS(ph)TSGESLYHVLGLDK_	x	-
Q7TMQ1	Gja1	S373	_AS(ph)S(ph)RPRPDDLEI_	x	-
Q7TMQ1	Gja1	S373	_AS(ph)S(ph)RPRPDDLEI_	x	-
P61014	Pln	S16	_RAS(ph)T(ph)IEMPQQAR_	x	-
P61014	Pln	S16	_RAS(ph)T(ph)IEMPQQAR_	x	-

Abb. 38: Übersicht identifizierter bekannter Akt-isoformspezifischer Substrate. Grau markiert sind identifizierte Phosphoproteine im basalen Phosphoproteom, blau markiert diejenigen im Phosphoproteom nach Insulinstimulation. „X“ symbolisiert identifiziertes isoformspezifisches Substrat, „-“ symbolisiert nichtidentifiziertes isoformspezifisches Substrat. Brcal zeigt Akt-Konsensussequenz „RXXS“ bei bisher unbekannter Phosphorylierungsstelle und impliziert damit eine neue Akt-Targetstelle.

3. 2. 2. 7 Kinasenprädiktion identifizierter Phosphorylierungsstellen

Mithilfe von NetworKIN (Linding *et al.*, 2007) wurde eine Liste aller potentiellen Kinasen für jede einzelne Phosphorylierungsstelle erarbeitet (Abbildung 39). Die Vorhersage basiert auf dem Vergleich der Phosphorylierungsstelle mit Konsensussequenzen individueller Proteinkinase. Jeweils die Kinase mit dem höchsten Score wurde als potentieller Interaktionspartner einer Phosphorylierungsstelle angenommen. Der Analyse zufolge kann angenommen werden, dass im basalen Phosphoproteom der größte Anteil (68 %) der identifizierten Phosphorylierungsstellen potentielles Substrat der PKC, CAMKII, CKI, JAK2 und PAK (in absteigender Reihenfolge) und im Phosphoproteom mit Insulin die Mehrheit (70 %) potentielles Substrat der PKC, CAMKII, JAK2, CKII, CKI und PAK (ebenso in absteigender Reihenfolge) ist. NetworKIN zufolge konnte Akt nicht als unmittelbare potentielle Kinase einzelner Phosphorylierungsstellen detektiert werden. Allerdings schließt diese Untersuchung nicht aus, dass Akt an einer direkten Modulation einzelner Proteine beteiligt ist, da der Score nur eine Wahrscheinlichkeit vorhersagt, eine Funktion aufgrund eines niedrigeren Scores aber nicht ausschließt. Es fällt auf, dass im Phosphoproteom nach Insulinstimulation insbesondere die CAMKII, Jak2, CKII, MAPK sowie die DAPK eine bedeutende Rolle zu spielen scheinen. Im Vergleich zum Basalzustand nehmen diese Kinasen einen gesteigerten Einfluss auf die Proteinphosphorylierung um jeweils 35 % (CAMKII), 13 % (JAK2), 73 % (CKII), 113 % (MAPK) und 135 % (DAPK). Der scheinbar wachsende Einfluss genannter Kinasen nach Insulinstimulation wird durch Erkenntnisse aus der Literatur unterstützt. Die insulinaktivierte Calcium-Calmodulin-abhängige Kinase II (CAMKII) moduliert die insulininduzierte Erk-1/2-Aktivierung und Zellproliferation, außerdem vermittelt sie die Herunterregulation der insulinstimulierten Akt-Phosphorylierung, GLUT4-Translokation und konsekutiven Glukoseaufnahme (Illario *et al.*, 2009). Ebenso die Januskinase (JAK2) wird durch Insulinstimulation aktiviert und inhibiert die insulinabhängige Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) sowie Akt (Thirone *et al.*, 2006). Auch Kasein Kinase II (CKII) wird unter anderem durch Insulin aktiviert (Sommercorn *et al.*, 1987) und phosphoryliert darauffolgend die Akt (Di Maira *et al.*, 2005). Die MAPK wird durch Insulin über den Ras-abhängigen Signalweg aktiviert (Carel *et al.*, 1996). Die Interaktionen zwischen MAPK und Akt sind noch nicht vollständig verstanden, jedoch gibt es deutliche Hinweise auf eine Herunterregulation des PI3K/Akt-Signalweges durch die ERK MAP Kinase (Hayashi *et al.*, 2008). Die Signalwege der Death-associated-protein-Kinase (DAPK) und Akt sind ebenso noch nicht ausreichend erfasst, jedoch wird eine Herunterregulation der DAPK durch die aktivierte Akt angenommen (Das *et al.*, 2016).

Es ist außerdem hochinteressant, dass zwei potentielle Kinasen- ATM und MAK- ausschließlich im insulinstimulierten Phosphoproteom vorhergesagt werden.

Ein Zusammenhang zwischen Akt und MAK ist bisher noch nicht zuvor beschrieben worden. Hingegen ist bereits bekannt, dass als Antwort auf einen Insulinstimulus die ATM (Ataxia Teleangiectasia Mutated)- eine Serin/Threoninkinase aus der Superfamilie der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)-Akt am Ser473 phosphoryliert (Vinięgra *et al.*, 2005). Außerdem konnte gezeigt werden, dass aus Knock Out Modellen für Akt und ATM ähnliche Defekte wie phänotypische Abnormalität, Wachstumsretardierung und Insulinresistenz resultieren (Barlow *et al.*, 1996; W. S. Chen *et al.*, 2001; Cho *et al.*, 2001a). Aus weiteren Untersuchungen ging hervor, dass über die Insulin-ATM-Akt-Signaltransduktion Glukosetransporter (GLUT4) an die Zelloberfläche von Muskelzellen transloziert werden (Halaby *et al.*, 2008).

Zusammenfassend reflektiert die Konsensussequenz der Phosphopeptidmotive die kinasenspezifische Regulation mitochondrialer Phosphoproteine. Die Ergebnisse stellen die Hypothese in den Raum, dass Insulin einen Effekt auf die Phosphorylierung mitochondrialer Proteine durch eine unterschiedliche Regulation der Kinasenaktivität ausübt. Die Analyse suggeriert außerdem, dass insbesondere die CAMKII, Jak2, CKII, MAPK sowie die DAPK in der insulinabhängigen Phosphorylierung mitochondrialer Proteine von hoher Bedeutung sind.

Zudem kann die Hypothese formuliert werden, dass die Mehrheit aller im Akt1/Akt2 KO regulierten Phosphopeptide indirekt durch andere Kinasen beeinflusst werden, jedoch in einem Akt-abhängigen Regulationsmechanismus. Dies zeigt, dass veränderte Phosphorylierungsmuster einem komplexen, weitreichendem Signalnetzwerk unterliegen.

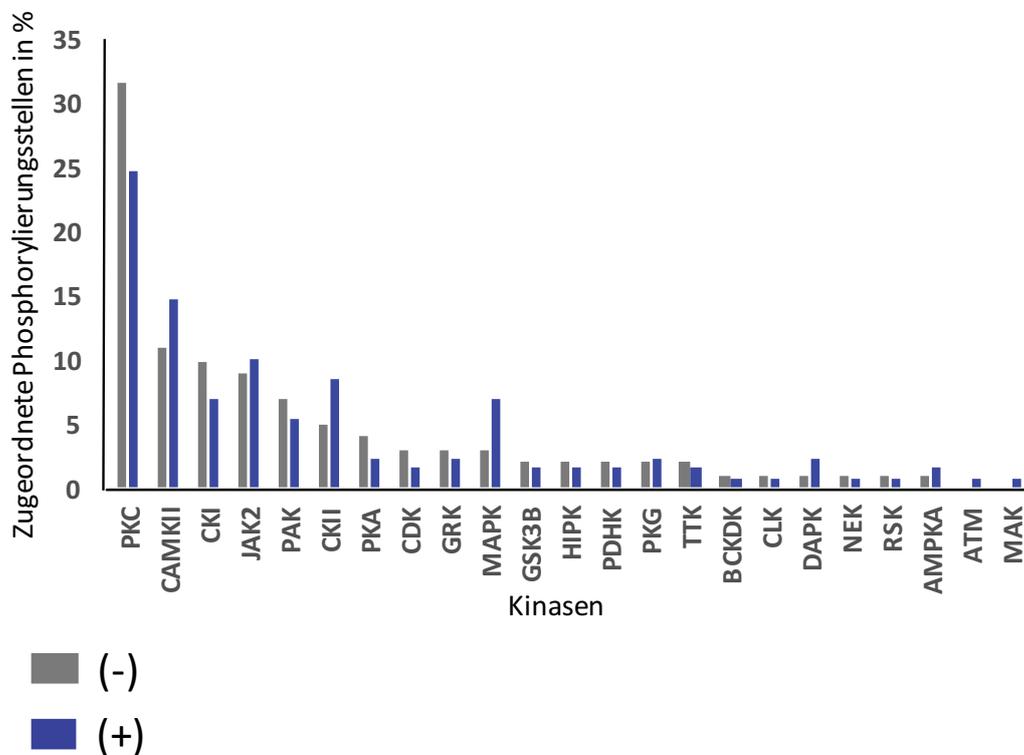


Abb. 39: Vorhersage von Kinasenfamilien aller identifizierten Phosphorylierungsstellen durch NetworKIN. Grau unterlegt sind die vorhergesagten Kinasenfamilien im basalen Phosphoproteom (-), blau unterlegt sind diejenigen im Phosphoproteom mit Insulin (+). Auf der Abszisse sind die identifizierten potentiellen Kinasen gelistet, auf der Ordinate der prozentuale Anteil der zugeordneten Phosphorylierungsstellen.

3. 2. 3 Quantitative Proteomics/ Phosphoproteomics

3. 2. 3. 1 Akt-isoformspezifische Regulationen

In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob Veränderungen im mitochondrialen Phosphoproteom spezifisch durch die Isoformen Akt1 oder Akt2 vermittelt werden. Dazu wurde in der Phosphoproteomanalyse die relative Quantifizierung im Vergleich mit Wildtyp als Referenz durchgeführt. Mithilfe statistischer Analysen (Abbildung 40) wurden die Verhältnisse (Δ Akt1/WT bzw. Δ Akt2/WT) auf veränderte Phosphorylierungsmuster untersucht. In der Untersuchung wurden signifikante Veränderungen in der Peptidmenge und damit dem Expressionsniveau im KO im Vergleich zum Wildtyp bestimmt.

In der daran anschließenden Proteomanalyse (Δ Akt1/WT bzw. Δ Akt2/WT) wurde durch relative Quantifizierung untersucht, ob die identifizierten Proteine eventuell auf Expressionsebene unterschiedlich reguliert werden.

Daher wurden die Phosphopeptide, die auf der Phosphoproteomebene eine signifikante Veränderung zeigten, mit dem korrespondierendem Protein auf Proteomebene verglichen. Zeigte das korrespondierende Protein auf Proteomebene bereits eine signifikante Abweichung im Expressionsniveau, so war die Veränderung auf Phosphoproteomebene kritisch zu beurteilen: es ließ sich nicht bestimmen, ob der veränderte Phosphorylierungsgrad aus einem veränderten Proteinexpressionsniveau resultierte oder ob unabhängig von Veränderungen auf Proteomebene eine Modifikation des Phosphorylierungsgrades stattgefunden hatte.

Lag jedoch das zum veränderten Phosphopeptid korrespondierende Protein innerhalb des Vertrauensintervalls, d.h. unverändert vor, konnte mit einer hohen Wahrscheinlichkeit von einer Regulation durch Phosphorylierung ausgegangen werden. Diese Phosphopeptide repräsentieren Kandidaten, die mit hoher Wahrscheinlichkeit einer Akt-abhängigen Signaltransduktion unterliegen.

Wie der bildliche Eindruck aus zwei repräsentativen Experimenten in Abbildung 40 bereits vermittelt, war der Hauptanteil aller Phosphopeptide durch Akt1 KO bzw. Akt2 KO und Insulinbehandlung nicht beeinflusst.

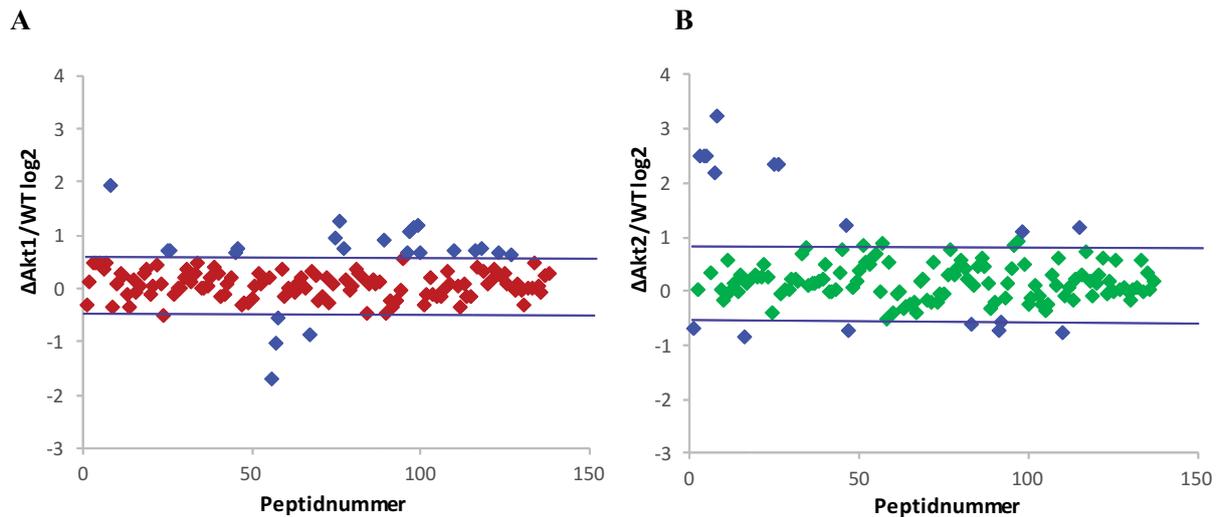


Abb. 40: Verteilung der ΔAkt1 \log_2 Werte aller identifizierten Phosphopeptide aus Experiment A (+Insulin) ($n=4$), die sich um den Median $\tilde{x} = 0,09$ und den Mittelwert μ von $0,14$ bei einer Standardabweichung von $\sigma_x = 0,43$ verteilen. Mit durchgezogener Linie sind die Grenzen ($0,67$ und $-0,5$) eingezeichnet, die nach doppelter statistischer Analyse bestimmt wurden. Diese Grenzen trennen Phosphopeptide mit signifikant veränderter Phosphorylierung von Peptiden mit unverändertem Phosphorylierungsmuster. Phosphopeptide, die unterhalb des Konfidenzintervalls liegen, werden als herunterreguliert betrachtet, Phosphopeptide oberhalb der Grenze werden als heraufreguliert erachtet (A). Verteilung der ΔAkt2 \log_2 Werte der Phosphopeptide aus gleichem Experiment A (+Insulin), die um den Median $\tilde{x} = 0,14$ und den Mittelwert μ von $0,26$ bei einer Standardabweichung von $\sigma_x = 0,65$ streuen. Mit durchgezogener Linie sind die statistischen Grenzen ($0,9$ und $-0,65$) eingezeichnet, die nach doppelter statistischer Analyse bestimmt wurden (B). Nichtregulierte Phosphopeptide, die innerhalb des Konfidenzintervalls liegen, sind rot (ΔAkt1) bzw. grün (ΔAkt2) markiert, Werte außerhalb der statistisch kalkulierten Grenzen sind blau markiert.

Unter basalen Bedingungen wurden im Wildtyp insgesamt 94 Phosphoproteine mit korrespondierenden 204 Phosphopeptiden und 156 Phosphorylierungsstellen identifiziert. In den parallel untersuchten Akt1 KO bzw. Akt2 KO Mäusen waren insgesamt 4 Phosphoproteine mit korrespondierenden 4 Phosphopeptiden bzw. 4 Phosphorylierungsstellen signifikant reguliert, d.h. zeigten ein verändertes Phosphorylierungsmuster. Ein Vergleich dieser Phosphorylierungsstellen ergab, dass die Phosphorylierung der Proteine durch beide Akt- Isoformen beeinflusst wird (Abbildung 41A).

Dieses Bild änderte sich nach Insulinstimulation. Im Wildtyp wurden 121 Phosphoproteine mit korrespondierenden 302 Phosphopeptiden bzw. 228 Phosphorylierungsstellen identifiziert. In den Akt1 KO bzw. Akt2 KO Mäusen wurden insgesamt 13 signifikant regulierte Phosphoproteine mit korrespondierenden 14 Phosphopeptiden bzw. 19 Phosphorylierungsstellen identifiziert. Hier zeigte sich, dass jeweils 2 Phosphorylierungsstellen entweder Akt1- oder Akt2-isoformspezifisch verändert waren, jedoch die weite Mehrheit aller Phosphorylierungsstellen einer isoformenspezifischen Regulation unterliegt (Abbildung 42A). Die Beobachtung, dass nach Insulinstimulation mehr Phosphorylierungsänderungen identifiziert wurden, ist ein starker Hinweis darauf, dass die Regulation mitochondrialer Phosphoproteine durch Insulin wesentlich beeinflusst wird.

Bei Betrachtung des Proteoms unter basalen und insulinstimulierten Bedingungen fällt auf, dass auch auf dieser Ebene die Mehrheit der Proteine nicht durch einen Akt KO beeinflusst wird. Es werden jedoch

im Vergleich zur Phosphoproteomebene wesentlich mehr Proteine Akt-isoformspezifisch als isoformunspezifisch beeinflusst. Ein Insulineffekt ist erwartungsgemäß aufgrund zu kurzer Zeitspanne nicht direkt erkennbar (s. dazu Abbildung 41B und 42B).

Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse lässt sich im Wesentlichen schlussfolgern, dass auf der Phosphoproteom- und Proteomebene basal und nach Insulinstimulation die Mehrheit der Peptide nicht durch einen Akt KO beeinflusst wird.

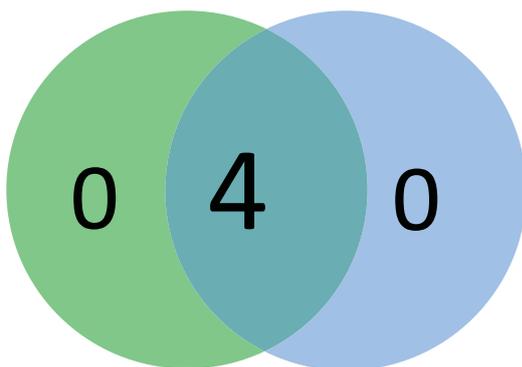
In beiden Phosphoproteomen (-/+ Insulin) wird jedoch die Mehrheit der regulierten Phosphopeptide in einer Akt-isoformunabhängigen Funktionsweise moduliert, während in beiden Proteomen die Mehrheit der regulierten Peptide in einem Akt-isoformspezifischen Mechanismus beeinflusst wird. Ferner übt Insulin einen deutlichen Effekt auf die Regulation einiger Phosphopeptide aus.

Basal

(A) Phosphorylierungseffekte

Δ Akt1

Δ Akt2



(B) Proteinniveau

Δ Akt1

Δ Akt2

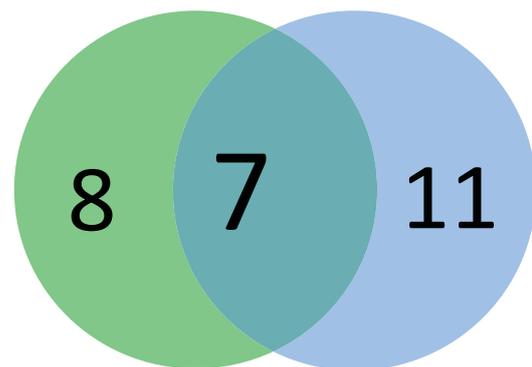


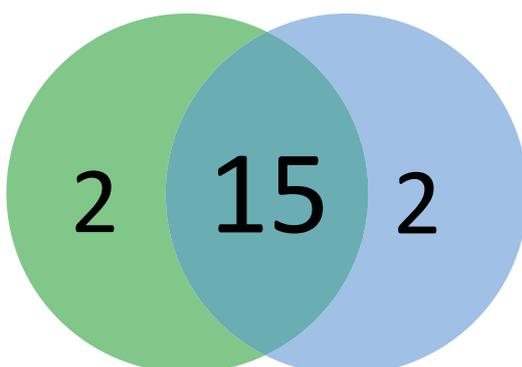
Abb. 41: Darstellung identifizierter Phosphosites signifikant regulierter Phosphopeptide (A) und Übersicht signifikant regulierter Proteine (B) in Δ Akt1 und Δ Akt2 unter basalen Bedingungen.

Insulin

(A) Phosphorylierungseffekte

Δ Akt1

Δ Akt2



(B) Proteinniveau

Δ Akt1

Δ Akt2

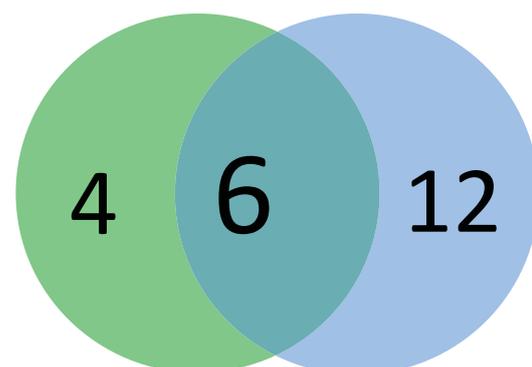


Abb. 42: Darstellung identifizierter Phosphosites signifikant regulierter Phosphopeptide (A) und Übersicht signifikant regulierter Proteine (B) in Δ Akt1 und Δ Akt2 nach Insulinstimulation.

3. 2. 3. 2 Phosphoproteinebene: Akt-isoformspezifische Regulationen

Veränderte Phosphopeptide, deren korrespondierende Proteine unverändert waren, repräsentieren Kandidaten, die mit hoher Wahrscheinlichkeit einer Regulation durch Phosphorylierung unterlagen. Die Tabelle 8 zeigt die Zusammenstellung dieser Peptide.

Hier wird der Insulineffekt besonders deutlich: im Vergleich zum Basalzustand (4 Phosphopeptide) sind nach Insulinstimulation wesentlich mehr Akt-abhängig regulierte Phosphopeptide (14) vorhanden. Diese Regulationen betreffen 4 Phosphoproteine unter basalen Bedingungen, und 13 Phosphoproteine nach Insulinstimulation. Dieser Befund zeigt, dass Akt über insulinvermittelte Mechanismen die Funktion diverser weiterer Proteine beeinflusst.

Spannenderweise handelt es sich im basalen Phosphoproteom bei 75 % aller Regulationen in Δ Akt1 und Δ Akt2 um negative Regulationen, während 25 % heraufreguliert sind. Im Phosphoproteom (+ Insulin) sind ebenso 82 % aller Regulationen nach unten gerichtet, während 18 % einen heraufregulierten Phosphorylierungsgrad zeigen. Dies deutet zum einen darauf hin, dass die Mehrheit der regulierten Kandidaten einer direkten Regulation durch Akt-Phosphorylierung unterliegt. Zum anderen legt dies die Vermutung nahe, dass die übrigen Kandidaten indirekt durch eine reduzierte Phosphataseaktivität bzw. reduzierte Inhibition einer Akt-nachgeschalteten Kinase reguliert werden.

Es ist außerdem eine interessante Beobachtung, dass im Phosphoproteom (- Insulin) keine isoformspezifischen Regulationen in den Δ Akt1/WT-Mitochondrien bzw. Δ Akt2/WT-Mitochondrien identifiziert worden sind, jedoch nach Insulinstimulation. Nicht nur wurden nach Insulinstimulation in den Δ Akt1/WT-Mitochondrien bzw. Δ Akt2/WT-Mitochondrien gleich viele veränderte Phosphorylierungsmuster konstatiert, sondern auch die Abweichung im Phosphorylierungsgrad war vergleichbar. Aus diesem eindrücklichen Befund lässt sich vorsichtig die Hypothese aufstellen, dass beide Isoformen synergistische bzw. kompensatorische Effekte auf die Regulation von Proteinen ausüben.

Im Folgenden wurde der Frage nachgegangen, ob in den identifizierten Proteinen ein konsistentes Phosphorylierungsmuster zu beobachten war. Es treten zwei Phosphoproteine hervor, die sowohl basal als auch nach Insulinstimulation reguliert werden: Die *Isocitratdehydrogenase* ist unter beiden Bedingungen isoformunabhängig heraufreguliert, jedoch ist der Phosphorylierungsgrad der Isocitratdehydrogenase nach Insulinstimulation niedriger als unter basalen Bedingungen (Δ Akt1 und Δ Akt2: ~ 30 % Abnahme).

Die *Pyruvatdehydrogenase E1 UE* \propto ist isoformunabhängig in beiden Zuständen herunterreguliert, wobei auch hier der Phosphorylierungsgrad nach Insulinstimulation stärker abnimmt (Δ Akt1: ~ 40 % Abnahme, Δ Akt2: ~ 50 % Abnahme). Diese Beobachtungen unterstützen die Hypothese, dass Insulin in einem Akt-abhängigen Mechanismus diverse mitochondriale Prozesse durch Phosphorylierungsänderung mitochondrialer Proteine reguliert.

Bei näherer Betrachtung der Phosphorylierungsstellen der regulierten Kandidaten konnten die regulierte Phosphorylierungsstelle der *Isocitrat-Dehydrogenase* (S301) sowie die *Cytochrom B-C1 Komplex Untereinheit 2* (S368) im Phosphoproteom (- Insulin) als erstmalig neue Stellen identifiziert werden. Auch die regulierte Phosphorylierungsstelle von *Prohibitin* (T141) im Phosphoproteom (+ Insulin) ist erstmalig neu entdeckt worden.

Interessanterweise ist das im Phosphoproteom (+ Insulin) regulierte *Prohibitin* zwar ein bereits bekanntes Akt1-Substrat, jedoch trägt das identifizierte Phosphopeptid nicht das isoformspezifische Motiv „RXXS“. Das regulierte kardiale *Phospholamban* (S16 und T17) ist ein bekanntes Akt-Substrat und trägt das isoformspezifische Motiv „RXXS“ bei bereits bekannter Akt-Phosphorylierungsstelle. Unter den weiteren 15 signifikant regulierten Kandidaten ist kein Akt-Substrat bekannt. Die Frage, inwiefern die Suche von Konsensusmotiven eine zuverlässige Methode zur Identifizierung von Akt-Substraten ist, wird in 4. 3. 2 *Akt-isoformspezifische Regulationen* näher besprochen.

Repräsentative MS-Spektren regulierter Phosphopeptide sind in der Abbildung 43 zusammengefasst.

(-)

Uniprot ID	Gename	Phosphosite	Modifizierte Sequenz	Δ Akt1	Δ Akt2
Q8BMF4	Dlat	S470	_GKIS(ph)VNDFIK_	0,12*	0,15*
P54071	ldh2	S301	_SS(ph)GGFVWACK_	2,29*	2,42*
P35486	Pdha1	Y301	_YHGHSM(ox)S(ph)DPGVSY(ph)R_	0,6*	0,31*
Q9DB77	Uqcr2	S368	_AVAQGNLSS(ph)ADVQAAK_	0,42*	0,43*

(+)

Uniprot ID	Gename	Phosphosite	Modifizierte Sequenz	Δ Akt1	Δ Akt2
Q03265	Atp5a1	S53	_TGTAEMSS(ph)ILEER_	0,4	0,38
Q03265	Atp5a1	S52	_TGTAEMS(ph)SILEER_	0,54	0,48
Q9CWE0	Fam54b	S100	_NAS(ph)VPNLR_	0,45*	0,3*
Q9CWE0	Fam54b	S234	_AS(ph)SFADM(ox)M(ox)GILK_	---	0,38
Q9CWE0	Fam54b	S235	_ASS(ph)FADMM(ox)GILK_	---	0,4
D3YVN7	Gm9755/Tufm	S312	_S(ph)LERAEAGDNLGALVR_	0,29*	0,25*
AOA068BEQ2	Hsd17b8	S58	_LLGSPGS(ph)EDGAPR_	0,44*	0,57
P54071	ldh2	S423	_DLAGCIHGLS(ph)NVK_	1,65*	1,68*
Q8R3F5	Mcat	S40	_DS(ph)SVAEEGAQEAVAR_	0,52*	0,23*
Q9CQX8	Mrps36	S60	_GSTS(ph)PDLLM(ox)HQGPPDTAEIHK_	0,63*	0,42*
Q3UGC8	Pcca	S247	_FSSQEAS(ph)SFGDDR_	0,58	0,34*
Q3UGC8	Pcca	S248	_FSSQEAS(ph)FGDDR_	0,38*	0,2*
P35486	Pdha1	S232	_YGMGTS(ph)VER_	0,23*	0,16*
P67778	Phb	T141	_FDAGELIT(ph)QR_	0,43*	0,56*
P61014	Pln	S16	_RAS(ph)T(ph)IEMPQQAR_	0,36	---
P61014	Pln	T17	_RAS(ph)T(ph)IEMPQQAR_	0,44	---
P48962	Slc25a4	S149	_GS(ph)SQREFNGLGDCLTK_	1,67*	2,3*
P48962	Slc25a4	S150	_GSS(ph)QREFNGLGDCLTK_	1,6*	1,67*
Q60932	Vdac1	T32	_DVFT(ph)KGYGFGLIK_	0,19*	0,2*

Tabelle 8: Tabellarische Übersicht regulierter Phosphopeptide, die durch Phosphorylierung verändert werden, die der statistischen Auswertung zufolge eine signifikante Veränderung des Phosphorylierungsgrades aufzeigen. Die log₂-Werte sind in Fold-Change-Werte konvertiert worden. Anschließend wurde für jedes signifikant regulierte Phosphopeptid der Mittelwert der signifikant veränderten Peptidverhältnisse aus 4 Replikaten berechnet. Rot unterlegte Kästchen kennzeichnen eine signifikante Herunterregulation des Phosphorylierungsgrades, während

grün unterlegte Kästchen Phosphopeptide mit heraufregulierter Phosphorylierung beschreiben. Das korrespondierende Protein eines jeden Phosphopeptids liegt nach statistischer Auswertung innerhalb des Vertrauensintervalls, d.h. zeigt keine Veränderung in der Proteinexpression. „*“ kennzeichnet diejenigen Phosphopeptide, die statt in mind. 2 von 4, nur in 1 von 4 Replikaten als signifikant reguliert betrachtet wurden, entweder, weil 1) es sehr stark reguliert war (s. Vdac1) und die übrigen Replikate keine Regulationsrichtung gegensätzlicher Tendenz zeigten, oder weil 2) es signifikant reguliert war und die Phosphopeptide der übrigen Replikate nur knapp unterhalb des Signifikanzniveaus lagen. „___“ signalisiert keine signifikante Regulation.

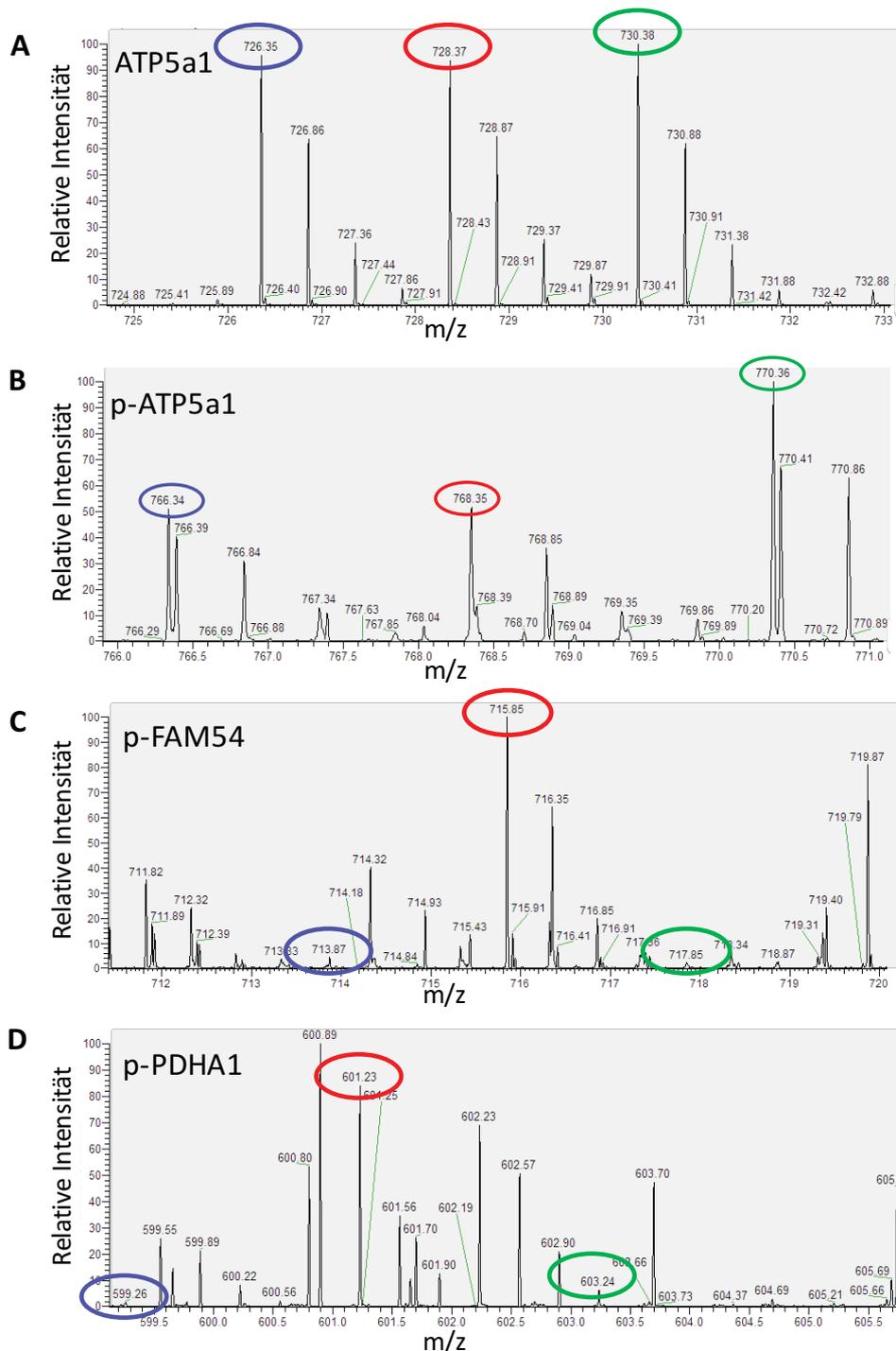


Abb. 43: MS-Spektren. A) Spektrum eines Phosphopeptids aus dem Proteom der ATP-Synthase Untereinheit $\alpha 1$ (ATP5a1), das keine Veränderung des Phosphorylierungsmusters aufzeigt. Ein 1:1:1- Verhältnis der Atp5a1 galt als interne Qualitätskontrolle dieser Arbeit, da die mitochondrialen Proteinmengen eines jeden Replikates mit Atp5a1 als Bezugsgröße aufeinander abgestimmt wurden. B) Spektrum eines Phosphopeptids aus dem Phosphoproteom (+) der ATP5a1, bei dem das Phosphopeptid der leichten Δ Akt1 und mittelschweren Δ Akt2 Probe herunterreguliert ist. C) Spektrum eines Phosphopeptids aus dem Phosphoproteom (+) der FAM54, bei dem das

Phosphopeptid der leichten Δ Akt2 und schweren Δ Akt1 Probe herunterreguliert ist. D) Spektrum eines Phosphopeptids aus dem Phosphoproteom (-) der PDHA1, bei dem das Phosphopeptid der leichten Δ Akt2 und schweren Δ Akt1 Probe herunterreguliert ist.

Veränderte Phosphopeptide, deren korrespondierende Proteine ein verändertes Proteinniveau aufweisen, wurden separat in Tabelle 9 zusammengefasst. Aufgrund oben beschriebener Problematik in der sachgerechten Interpretation dieser Regulationen wird auf diese nicht weiter eingegangen.

(-)

Uniprot ID	Gename	Phosphosite	Modifizierte Sequenz	Δ Akt1	Δ Akt2	Regulationsebene
E9Q4Z2	Acacb	S1332	_M(ox)AVPISVS(ph)NPDLLR_	0,44*	0,21*	PP
				0,48*	0,47*	P
O55003	Bnip3	S88	_NSTLS(ph)EEDYIER_	___	0,34	PP
				0,22	0,36	P
Q9CWE0	Fam54b	S234	_AS(ph)SFADM(ox)M(ox)GILK_	0,39	0,33	PP
				0,41*	0,39	P
Q9CWE0	Fam54b	S235	_ASS(ph)FADM(ox)M(ox)GILK_	0,4	0,32	PP
				0,41*	0,39	P
Q7TMQ1	Gja1	S314	_QASEQNWANYS(ph)AEQNR_	0,46	0,3	PP
				0,36	0,38	P
Q7TMQ1	Gja1	S328	_M(ox)GQAGST(ph)IS(ph)NS(ph)HAQPFDFPDDSQNAK_	0,34*	0,27	PP
				0,36	0,38	P
Q7TMQ1	Gja1	S330	_M(ox)GQAGST(ph)IS(ph)NS(ph)HAQPFDFPDDSQNAK_	0,32*	0,25	PP
				0,36	0,38	P
Q8BVZ1	Plin5	S163	_SM(ox)S(ph)QAM(ox)DM(ox)VLGK_	0,58	___	PP
				0,53*	___	P
P61014	Pln	S16	_RAS(ph)T(ph)IEMPQQAR_	0,26	0,15*	PP
				NaN	2,35*	P
P61014	Pln	T17	_RAS(ph)T(ph)IEMPQQAR_	0,26	0,15*	PP
				NaN	2,35*	P
Q80TT4	Tomm70a	S94	_AS(ph)PALGSGHHDGSGDSLEM(ox)SSLDR_	0,34*	0,25	PP
				0,44*	0,3	P
Q80TT4	Tomm70a	S99	_ASPALGS(ph)GHHDGSGDSLEM(ox)SSLDR_	0,34*	0,25	PP
				0,44*	0,3	P
Q80TL6	Trak1	S199	_NES(ph)SSSVQNYFHLDLQK_	___	0,3	PP
				___	0,4	P

(+)

Uniprot ID	Gename	Phosphosite	Modifizierte Sequenz	Δ Akt1	Δ Akt2	Regulationsebene
P07901	Hsp90aa1	S400	_GVVDELDLPLNIS(ph)R_	1,87*	1,66*	PP
				0,71*	0,45	P
B2RQQ1	Myh6/Myh7/Myh2	S1142	_SDLS(ph)RELEISER_	3,82*	9,46*	PP
				1,89	3,13	P
O55124	Myom2	S76	_RVS(ph)ASEEEEEVENENR_	1,63*	5,07*	PP
				1,46*	3,51*	P
O55124	Myom2	S78	_RVSAS(ph)EEEEVENENR_	1,63*	5,07*	PP
				1,46*	3,51*	P
P62908	Rps3	T221	_DEILPTT(ph)PISEQK_	___	0,57*	PP
				0,45*	0,65*	P

Tabelle 9: Tabellarische Übersicht identifizierter Phosphopeptide, die der statistischen Auswertung zufolge eine signifikante Veränderung des Phosphorylierungsgrades aufzeigen. Rot markierte Kästchen kennzeichnen eine signifikante Herunterregulation des Phosphorylierungsgrades, während grün markierte Kästchen erhöhte Phosphopeptidspiegel anzeigen. Das korrespondierende Protein eines jeden Phosphopeptids liegt nach statistischer Auswertung außerhalb des Vertrauensintervalls, d.h. zeigt eine Veränderung in der Proteinexpression. „PP“ kennzeichnet die Phosphorylierungsebene, während „P“ die Expressionsebene symbolisiert. „*“ kennzeichnet diejenigen Phosphopeptide, die statt in mind. 2 von 4, nur in 1 von 4 Replikaten als signifikant reguliert betrachtet wurden, entweder, weil 1) es sehr stark reguliert war und die übrigen Replikate keine Regulationsrichtung gegensätzlicher Tendenz zeigten, oder weil 2) es signifikant reguliert war und die Phosphopeptide der übrigen Replikate nur knapp unterhalb des Signifikanzniveaus lagen. „ ___ ” signalisiert Peptide ohne signifikante Regulation. NaN signalisiert, dass dieser Wert nicht gemessen worden ist.

3. 2. 3. 3 Proteinebene: Akt-isoformspezifische Regulationen

Veränderte Proteine, die mit hoher Wahrscheinlichkeit in ihrem Proteinspiegel reguliert werden, sind in Tabelle 10 zusammengefasst. In beiden Proteomen (-/+ Insulin) werden die Peptide mehrheitlich Akt-isoformspezifisch reguliert. Im Vergleich zum Basalzustand sind nach Insulinstimulation weder die Anzahl an signifikant regulierten Proteinen (26 bzw. 22) noch die Gesamtzahl an stattgefundenen Regulationen (29 bzw. 27) gesteigert. Es ist auffallend, dass die Mehrheit aller Regulationen- sowohl unter basalen als auch insulinstimulierten Bedingungen- eine Herunterregulation im Proteinexpressionsgrad zeigen. Die unten aufgeführten Tabellen sowie die Abbildung 44A zeigen deutliche Unterschiede in den Proteomen (-/+ Insulin). Angesichts der kurzen Zeitspanne des Insulineffekts muss dennoch kritisch hinterfragt werden, ob die Unterschiede tatsächlich auf der Insulinbehandlung beruhen.

(-)

Uniprot ID	Gename	Proteinname	Δ Akt1	Δ Akt2
E9Q4Z2	Acacb	Acetyl-CoA carboxylase 2	0,48*	0,47*
Q8R0N6	Adhfe1	Hydroxyacidoxoacidtranshydrogenase	2,98	0,39
Q8BGK2	Adprh1	[Protein ADP-ribosylarginine] hydrolase-like protein 1	0,34	—
O08715	Akap1	A-kinase anchor protein 1	0,39	0,19
Q9D5T0	Atad1	ATPase family AAA domain-containing protein 1	—	0,44
Q9JLZ3	Auh	Methylglutaconyl-CoA hydratase	—	0,46
P59017	Bcl2l13	Bcl-2-like protein 13	—	0,32
O55003	Bnip3	Adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3	0,22	0,36
Q8K1M6	Dnm1l	Dynamin-1-like protein	0,42	—
Q9CWE0	Fam54b	Mitochondrial fission regulator 1-like	0,41*	0,39
Q9CR98	Fam136a	Protein FAM136A	0,27	—
Q8BGY7	Fam210a	Protein FAM210A	2,06*	—
Q7TMQ1	Gja1	Gap junction protein	0,36	0,38
P16125	Ldhb	L-lactate dehydrogenase B chain	—	0,45
E9QJW0	Mgst1	Microsomal glutathione S-transferase 1	5*	—
Q3UW66	Mpst	Sulfurtransferase	2,22*	—
B2RXT3	Ogdhl	Oxoglutarate dehydrogenase-like	—	0,23
O70571	Pdk4	Pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 4	0,41	0,38
Q8BVZ1	Plin5	Perilipin-5	0,53*	—
P61014	Pln	Cardiac phospholamban	NaN	2,35*
Q3UM21	Slc25a32	Mitochondrial folate transporter	—	0,36
P42227	Stat3	Signal transducer and activator of transcription 3	0,42	—
Q5F285	Tmem256	Transmembrane protein 256	—	2,01
Q4KL41	Tomm20	Mitochondrial import receptor subunit TOM20 homolog	—	0,47
Q80TT4	Tomm70a	Mitochondrial import receptor subunit TOM70	—	0,3
Q80TL6	Trak1	Trafficking kinesin-binding protein 1	—	0,4

(+)

Uniprot ID	Gename	Proteinname	Δ Akt1	Δ Akt2
Q9CZS1	Aldh1b1	Aldehyde dehydrogenase X	2,47	—
E9Q4Z2	Acacb	Acetyl-CoA carboxylase 2	—	0,45
Q8BGK2	Adprh1	[Protein ADP-ribosylarginine] hydrolase-like protein 1	—	0,4
P59017	Bcl2l13	Bcl-2-like protein 13	—	0,45
Q3TQX5	Ddx3x	ATP-dependent RNA helicase DDX3X	—	0,51
Q8K1M6	Dnm1l	Dynamin-1-like protein	—	0,39
Q8R0F8	Fahd1	Acylpyruvase FAHD1	—	2,3
E9QAQ5	Gsk3b	Glycogen synthase kinase-3 beta	—	0,52
P17710	Hk1	Hexokinase-1	—	2,51
P11499	Hsp90ab1	Heat shock protein HSP 90-beta	0,71*	0,45
E9QB02	Mars	Methionine-tRNA ligase	—	2
Q3UW66	Mpst	Sulfurtransferase	2,2	—
B2RQQ1	Myh6	Myosin-6	1,89	3,13
O55124	Myom2	M-Protein	1,46*	3,51*
Q9CPU2	Ndufb2	ADH dehydrogenase 1 beta subcomplex subunit 2	0,57	—
O70571	Pdk4	Pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 4	0,33	0,23
Q8BVZ1	Plin5	Perilipin-5	0,47	0,34
J3QPG5	Psap	Prosaposin	—	0,5
P62908	Rps3	40S ribosomal protein S3	0,45*	0,65*
P19123	Tnnc1	Troponin C	—	3,33
Q80TT4	Tomm70a	Mitochondrial import receptor subunit TOM70	—	0,41
P63101	Ywhaz	Tyrosine 3-monooxygenase	0,53	—

Tabelle 10: Tabellarische Übersicht von Proteinen, die der statistischen Auswertung zufolge eine signifikante Veränderung der Proteinexpression aufzeigen (siehe hierzu 2.11.1 Statistische Analyse). Rot markierte Kästchen kennzeichnen eine signifikante Herunterregulation der Proteinexpression, während grün unterlegte Kästchen Proteine mit heraufregulierter Expression beschreiben. „*“ kennzeichnet diejenigen Proteine, die statt in mindestens 2 von 4, nur in 1 von 4 Replikaten als signifikant reguliert betrachtet wurden, entweder, weil 1) es sehr stark reguliert war und die übrigen Replikate keine Regulationsrichtung gegensätzlicher Tendenz zeigten, oder 2) es signifikant reguliert war und die Phosphopeptide der übrigen Replikate nur knapp unterhalb des Signifikanzniveaus lagen. „—“ kennzeichnet Proteine ohne signifikante Regulation.

3. 2. 3. 4 Funktionale Charakterisierung identifizierter regulierter Proteine

Im Vergleich der funktionalen Distribution regulierter Proteine fällt zunächst auf, dass im Proteom sowohl basal als auch nach Insulinstimulation (Abbildung 44A) nahezu sämtliche Funktionsklassen repräsentiert sind. Bezeichnenderweise wurden jedoch keine regulierten Proteine der oxidativen Phosphorylierung identifiziert. Darüber hinaus ist es augenscheinlich, dass der Hauptanteil aller regulierten Proteine (30 % in (- Insulin) bzw. 45 % in (+ Insulin) den Metabolismus betrifft. Es ist zudem bezeichnend, dass bei 20 % (- Insulin) bzw. 10 % (+ Insulin) der regulierten Proteine die Funktion noch nicht bekannt ist. Hieraus lässt sich die Annahme ableiten, dass ein Akt KO auf Proteomebene viele Funktionsklassen beeinflusst, insbesondere den Metabolismus. Ein Akt KO scheint jedoch keinen Effekt auf die Proteinmenge der Proteine des Oxidative-Phosphorylierung-Komplexes auszuüben.

Im Vergleich der funktionalen Verteilung regulierter Phosphoproteine (Abbildung 44B) ist besonders auffallend, dass im Phosphoproteom (- Insulin) nur zwei Funktionsklassen (oxidative Phosphorylierung, Metabolismus) vertreten sind, während im Phosphoproteom (+ Insulin) mit Ausnahme der Apoptose alle Funktionskategorien durch veränderte Phosphorylierung reguliert werden. Ähnlich wie auf

Proteomebene wird auch hier die Mehrheit der regulierten Phosphoproteine (50 % unter basalen Bedingungen und 30 % nach Insulinstimulation) dem Metabolismus zugeordnet. Interessanterweise können auf Phosphoproteomebene- im Gegensatz zur Proteomebene- einige Regulationen der oxidativen Phosphorylierung nachgewiesen werden. Dies erweckt den Eindruck, dass Akt-abhängige Phosphorylierungsmechanismen bedeutsam in der Orchestrierung von Metabolismus- und Energiestoffwechsel sind.

Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse kann man schlussfolgern, dass ein Akt KO sich sowohl auf Proteom- als auch Phosphoproteomebene schwerpunktmäßig auf den Metabolismus auswirkt. Ein Akt KO auf Phosphoproteomebene scheint zusätzlich einen Effekt auf die oxidative Phosphorylierung auszuüben. Die meisten Phosphoproteine, die einer insulinvermittelten Akt-abhängigen Regulation unterliegen, können dem Metabolismus und der Oxidativen Phosphorylierung zugeordnet werden. Diese Ergebnisse suggerieren, dass mitochondriales Akt über Phosphorylierungsmechanismen eine essentielle Rolle in der Koordination von Substrat- und Sauerstoffbedarf sowie Energieproduktion am Herzen spielt.

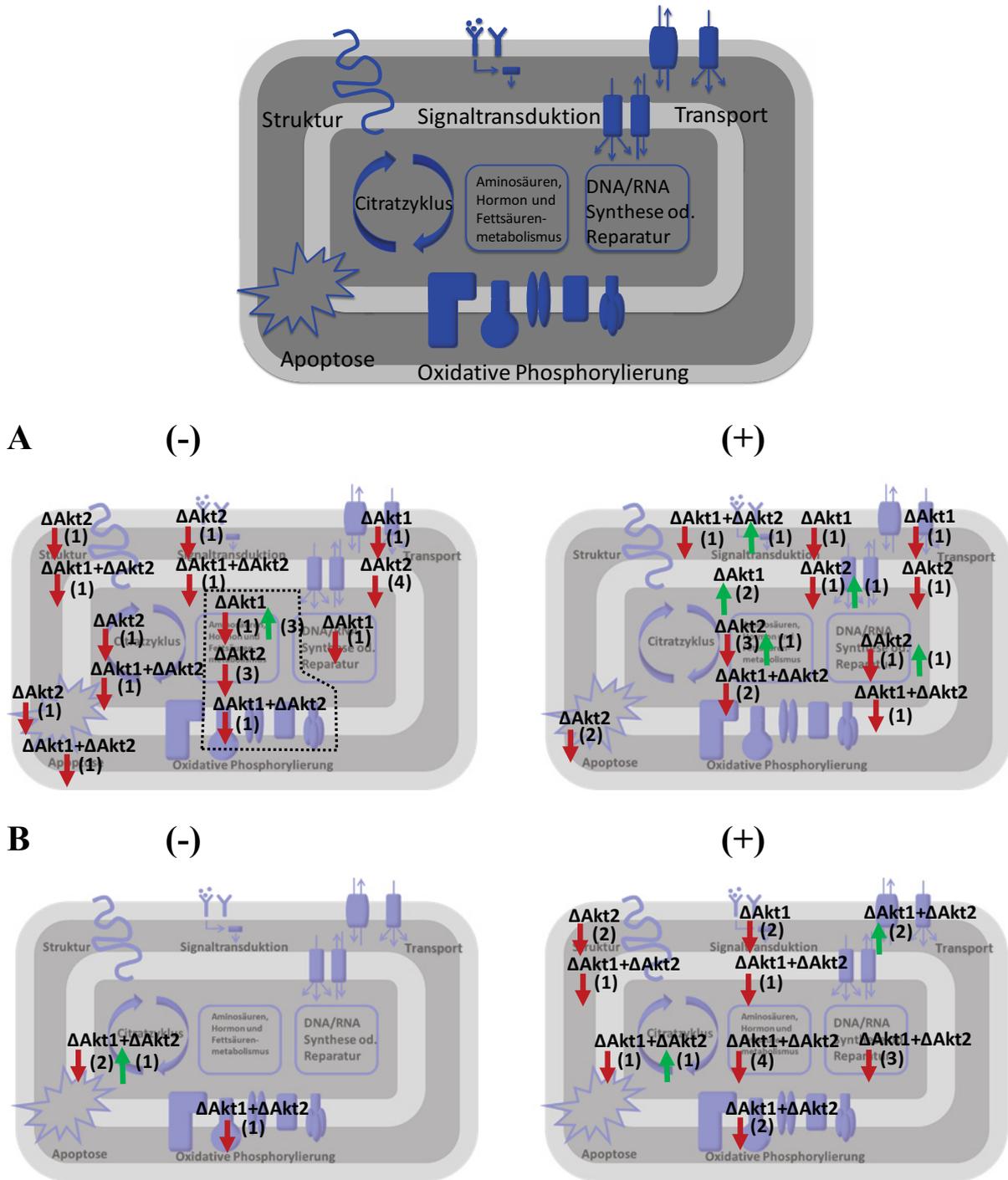


Abb. 44: Schematische Darstellung mitochondrialer Funktionsklassen. Veränderungen in mitochondrialen Signalwegen auf Proteomebene (A) ohne (-) und mit Insulinstimulation (+). Gestrichelte Linie in (A(-)) kennzeichnet Zugehörigkeit der umrandeten Regulationen zur Funktionsklasse „Aminosäuren-, Hormon- und Fettsäuremetabolismus“. Veränderungen auf Phosphoproteomebene (B) ohne (-) und mit Insulinstimulation (+). Rote Pfeile kennzeichnen eine signifikante Herunterregulation des Proteinexpressionsniveaus bzw. des relativen Phosphorylierungsgrades, während grüne Pfeile eine signifikante Heraufregulation des Proteinexpressionsniveaus bzw. des relativen Phosphorylierungsgrades symbolisieren. Die Zahlen in Klammern repräsentieren die Anzahl regulierter Proteine innerhalb einer mitochondrialen Funktionsklasse.

4 Diskussion

Die Serin/Threonin-Kinase Akt ist eine zentrale Proteinkinase auch im Herzen mit bedeutsamem Einfluss auf den kardialen Metabolismus, Wachstum, Hypertrophie, Zellüberleben und -apoptose. Im Herzen werden zwei verschiedene Isoformen, Akt1 und Akt2, exprimiert. Beide Isoformen modulieren zahlreiche Signaltransduktionswege und Regulationsmechanismen am Herzen. Mitochondrien sind die am stärksten angereicherten Organellen am Herzen und bilden bis zu 40 % des gesamten Zellvolumens einer Kardiomyozyte, sodass eine suffiziente ATP-Syntheserate zur Aufrechterhaltung von Kontraktion, Metabolismus und Ionenhomöostase sichergestellt werden kann. Die Funktion kardialer Mitochondrien wird durch vielfältige Signaltransduktions- und Regulationsmechanismen koordiniert. Mitochondriale Dysfunktion ist mit diversen kardialen Pathologien assoziiert, z.B. Arrhythmie, Kardiomyopathie und Myokardinfarkt. Akt wird durch den PI3K-Signalweg aktiviert. Die Akt-Aktivierung bewirkt deren Translokation in das Zytoplasma, den Nukleus und das Mitochondrion, in denen Akt zahlreiche Substrate phosphoryliert.

In dieser Arbeit wurden erstmalig die Akt-isoformspezifischen und -unspezifischen Effekte auf das kardiale mitochondriale Phosphoproteom analysiert. Die Untersuchungen wurden an einem Transgenen Mausmodell aus induzierbaren Kardiomyozyten-spezifischen Akt1 KO und Akt2 KO Mäusen und einer anschließenden umfangreichen Phosphoproteomanalyse durchgeführt.

Die wesentlichen Erkenntnisse dieser Arbeit sind im Folgenden zusammengefasst:

- Die Kombination eines Transgenen Mausmodells (iCMAkt1 KO bzw. iCMAkt2 KO) mit Quantitativer Phosphoproteomics ist eine erfolgreiche Strategie zur Identifizierung Akt-abhängiger Signaltransduktionen in murinen kardialen Mitochondrien.
- Phosphorylierung mitochondrialer Proteine ist ein weit verbreitetes Element, das an der Regulation mitochondrialer Prozesse beteiligt sein könnte. Es wurden Phosphoproteine in sämtlichen mitochondrialen Funktionsklassen und Kompartimenten detektiert.
- Insulin steigert wesentlich die Anzahl und Diversität an nichtredundanten Phosphopeptiden, distinkten Phosphoproteinen und Phosphorylierungsstellen.
- Es wurden neue, bisher unbekannte Phosphorylierungsstellen identifiziert.
- Einige mitochondriale Proteine werden in einem Akt-isoformspezifischen und -unspezifischen Mechanismus reguliert. Insulin reguliert mitochondriale Prozesse durch gesteigerte Phosphorylierung zusätzlicher und auch unterschiedlicher mitochondrialer Proteine.
- Die meisten Proteine, die einer insulinvermittelten Akt-abhängigen Regulation unterliegen, können dem Metabolismus und der oxidativen Phosphorylierung zugeordnet werden. Diese Ergebnisse suggerieren, dass mitochondriales Akt über Phosphorylierungsmechanismen eine essentielle Rolle in der Koordination von Substrat- und Sauerstoffbedarf sowie Energieproduktion am Herzen spielt.

- In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass auch die α -Untereinheit der ATP-Synthase nach Insulinstimulation einer Akt-abhängigen Phosphorylierung unterliegt. Außerdem wurden erstmalig neue Phosphorylierungsstellen der ATP-Synthase identifiziert.
- Die zahlreichen neuen Informationen zur Phosphorylierung mitochondrialer Proteine tragen zu einem besseren Gesamtverständnis des mitochondrialen Phosphoproteoms und Signalnetzwerkes am Herzen bei.

4.1 Mitochondrienisolationsprotokoll

Zur Untersuchung des kardialen mitochondrialen Phosphoproteoms ist die effektive Mitochondrienisolation eine wichtige Grundvoraussetzung. Unterschiedliche Isolationsmethoden sind auf der Grundlage verschiedener Parameter (Ausbeute, Kontaminationsrate und Zeitkonsum) miteinander verglichen worden.

Im Vergleich zu dem Dichtegradienten- und Differentialzentrifugationsprotokoll erwies sich das antikörperbasierte magnetische Auftrennverfahren als das beste Instrument zur Mitochondrienisolation, da es unter Einsatz geringen Startmaterials eine relativ hohe Proteinausbeute bei geringer Kontaminationsrate sowie überschaubarem Zeitaufwand ermöglicht. Außerdem handelt es sich hierbei um eine weitgehend reproduzierbare und teilweise automatisierte Technik, die die simultane Präparation multipler Replikate ermöglicht.

In Anbetracht der hohen kardialen Mitochondriendichte von bis zu 40 % sowie einem angeglichenen Herzgewicht von 100 mg erscheint die durchschnittliche Proteinausbeute mit 1,04 mg ($\sigma_x = 321,3$ mg) sehr gering. Durch eine Modifikation des initialen mechanisch-chemischen Aufschlusses, höhere Anzahl an MicroBeads und längere Inkubationszeiten konnte die Ausbeute mitochondrialen Proteins nicht bedeutend gesteigert werden, ebenso wenig konnte durch Einführung zusätzlicher Waschschriffe die Kontaminationsrate wesentlich reduziert werden. Zudem muss berücksichtigt werden, dass ein intensiverer mechanischer-chemischer Aufschluss die Integrität mitochondrialer Membranen gefährden und längere Inkubationszeiten sowie zusätzliche Waschschriffe die mitochondriale Funktionalität negativ beeinflussen können.

Bei Betrachtung der mitochondrialen Anreicherungsreihe fällt auf, dass ein variabel großer Proteinverlust nach der Niedrigzentrifugation im 2. Pellet sowie im Durchfluss zu verzeichnen ist. Dies lässt zum einen vermuten, dass die Mitochondrien durch einen insuffizienten mechanischen und enzymatischen Aufschluss zu Beginn nicht vollständig aus ihren subsarkolemmalen und interfibrillären Kompartimenten gelöst werden konnten. Eine effektive Separation der Mitochondrien von dem Sarkolemm und den Myofibrillen scheint möglicherweise aufgrund der engen räumlichen Nachbarschaftsbeziehung besonders diffizil zu sein, während die Isolation aus weichem Gewebe wie Niere und Gehirn einfacher ist und mit einer relativ höheren Ausbeute einhergeht (Fernández-Vizarra *et al.*, 2010; Franko *et al.*, 2013).

Interessant war die Beobachtung, dass in der Proteinausbeute zwischen Δ Akt2 und WT ein signifikanter Unterschied zu verzeichnen war. Die höhere Ausbeute bei den Δ Akt2 Herzen könnte durch eine höhere Mitochondriendichte begründet sein. Ein weiterer Erklärungsansatz wäre die Vorstellung, dass die Mitochondrien im Δ Akt2 aufgrund struktureller Veränderungen des kontraktiven Apparates leichter zu isolieren sind. In einer elektronenmikroskopischen Studie an murinen Herzen, in denen kein Insulinrezeptor exprimiert wird (MI²RKO), konnte gezeigt werden, dass die Mitochondrien sowohl in Zahl als auch in Volumen im Vergleich zur Kontrolle wesentlich grösser waren. Zum anderen zeigte sich in den MI²RKO-Mäusen ein abnormer struktureller Aufbau des kontraktiven Apparates, d.h. irreguläre und rupturierte Z- und M-Scheiben des Sarkomers (Laustsen *et al.*, 2007).

Die Reinheit der Mitochondrienfraktionen muss in diesem Verfahren ebenso kritisch betrachtet werden. Es zeigte sich, dass keine der getesteten Präparationen frei von nicht-mitochondrialen Proteinen war. Das beste Ergebnis im Hinblick auf Reinheit erbrachte sicher das aufwändige Dichtegradienten-Zentrifugationsverfahren. Dieses war aber auch durch lange Präparationszeiten und hohe Verluste gekennzeichnet. Im Hinblick auf die Untersuchung posttranslationaler Proteinmodifikationen wurde daher dem Antikörper-basierten Verfahren der Vorzug gegeben, da es bei kurzen Präparationszeiten eine hohe Ausbeute von Mitochondrien ermöglichte. Weiterhin ist zu bedenken, dass das Ausmaß der Kontaminationen eventuell überschätzt wurde. So findet man bei immer detaillierteren Untersuchungen Proteine in Mitochondrien, die dort ursprünglich nicht erwartet wurden (z.B. die Telomerase). Es könnte also sein, dass einige der als Kontaminanten gewerteten Proteine tatsächlich auch in den Mitochondrien lokalisiert waren.

Die EM-Aufnahme der mitochondrialen Fraktion visualisiert die limitierte Qualität der mitochondrialen Präparation (nicht gezeigt). In der Fraktion sind neben intakten Mitochondrien auch einige nicht-mitochondriale Strukturen vorhanden. Aus einer unabhängigen Forschungsgruppe, die ebenso dieses Protokoll einsetzte, gingen ähnliche Aufnahmen hervor (Franko *et al.*, 2013).

In den Western Blot Analysen konnte gezeigt werden, dass Kontaminanten im Verlauf der Mitochondrienisolation weitgehend eliminiert wurden, jedoch in aufsteigender Reihenfolge Bestandteile aus den Endosomen, der Plasmamembran, dem Nukleus und den Peroxisomen in den Proben nachweisbar mitangereichert worden sind. Die im Vergleich zur Differentialzentrifugation geringere und mit der Dichtegradientenzentrifugation vergleichbar hohe Kontaminationsrate wurde auch in anderen Forschungsgruppen, die das magnetische Auftrennverfahren anwandten, beobachtet (Bandiera *et al.*, 2011; Barrey *et al.*, 2011; Hornig-Do *et al.*, 2009).

In der Phosphoproteomanalyse konnten nur nahezu 50 % aller Phosphopeptide sowohl im Basalzustand als auch nach Insulingabe als mitochondrial identifiziert werden. Ähnliche Mitochondrienprotein-zu-Gesamtprotein-Verhältnisse wurden auch in anderen Proteomstudien registriert (Franko *et al.*, 2013; Mootha *et al.*, 2003).

Aus der funktionellen Muster-Analyse (DAVID Bioinformatics, s. Anhang) geht hervor, dass die meisten nichtmitochondrialen Proteine mehrheitlich dem kontraktiven Apparat sowie der membranösen

Fraktion entstammten, während Bestandteile des Nukleus und Endoplasmatischen Retikulums vergleichsweise gering angereichert waren. Angereicherte Kontaminanten der Lysosomen und Peroxisomen sind in der Gesamtprobe nur schwach repräsentiert.

Die in den mitochondrialen Fraktionen durchweg persistierende Kontaminationsrate lässt sich durch verschiedene Hypothesen rechtfertigen.

Nicht nur besteht, wie oben bereits erläutert, eine enge räumliche Kommunikation der Mitochondrien zum kontraktilem Apparat, sondern auch eine unmittelbare Assoziation zu Endosomen, Lysosomen, vesikulären und nukleären Strukturen. Eine physikalische Kommunikation zwischen den Mitochondrien und dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) wurde erstmals 1969 erforscht (Ruby *et al.*, 1969) und später als mitochondrienassoziierte Membran (MAM) identifiziert (Vance, 1990). Man geht davon aus, dass bis zu 20 % der äusseren Mitochondrienmembran mit dem ER räumlich assoziiert sind (Rizzuto *et al.*, 1998b). Diese MAM wird aus einer Komposition mitochondrialer und sog. nichmitochondrialer Proteine gebildet (Poston *et al.*, 2013). Die funktionelle Bedeutung dieser Verbindung liegt primär im Ca^{2+} -Austausch (Pinton *et al.*, 1998; Rizzuto *et al.*, 1993) sowie im Zusammenspiel beider Organellen während der Apoptose (Calore *et al.*, 2010; Szalai *et al.*, 1999). Insbesondere in der Herzmuskulatur spielt die Interaktion zwischen Mitochondrium und ER bzw. sarkoplasmatischem Retikulum (SR) eine bedeutende Rolle zur Ca^{2+} -Kommunikation und ATP-Produktion. Der Ryanodinrezeptor ist scheinbar essentiell in der SR-Mitochondrium-Kopplung (Yi *et al.*, 2012). Eine strikte Separation der Mitochondrien vom ER ist also unabhängig von der Effektivität des Isolationsprotokolls natürlich bedingt nicht möglich.

Interessanterweise binden sowohl das ER als auch die Mitochondrien an Mikrotubuli bindende Proteine (MT) und Aktinfilamente, die als eine Art Grundgerüst angeblich die MAM stabilisieren (Stürmer *et al.*, 1995).

Auch zwischen Mitochondrien und Lysosomen ist neben unmittelbar zusammenhängenden Signalwegen eine direkte räumliche Interaktion identifiziert worden (Elbaz-Alon *et al.*, 2015; Raimundo, 2014). Die Interaktion wird insbesondere durch die selektive Autophagie von Mitochondrien, die sog. Mitophagie, begründet (Youle and Narendra, 2011), aber auch die Rolle von Lysosomen als Ca^{2+} -Speicher zur Regulation der Ca^{2+} -Homöostase wird diskutiert (Penny *et al.*, 2015). Die Einbettung der Mitochondrien ins Zytoskelett in enger Interaktion zu den umgebenden Organellen scheint auch regulatorische Funktionen für die Atmungskette zu erfüllen. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die ADP-Sensitivität in Mitochondrien *in situ* wesentlich niedriger ist als in isolierten Mitochondrien (Saks *et al.*, 2006). Eine niedrige ADP-Sensitivität ermöglicht eine feinregulatorische Kontrolle des Sauerstoffverbrauches durch die ATPasen. Zytoskelettale Proteine, wie z.B. Tubulin, das die Permeabilität von Porin herabsetzt, senken die ADP-Sensitivität und tragen damit zur Regulation des mitochondrialen Atmungsprozesses bei (Kay *et al.*, 1997; Rostovtseva *et al.*, 2008). Die Definition „Kontaminationsrate“ muss in diesem Zusammenhang also vorsichtig betrachtet werden. Besser wäre eine Unterscheidung in Kontaminationsproteine anderer Organellen,

Mitochondrienproteine und „Mitochondrien-assoziierte Proteine“. So können beispielsweise in dieser Arbeit identifizierte und laut offiziellen Datenbankrecherchen als nichtmitochondrial klassifizierte Proteine wie Ankyrin Protein 2, Phospholemman, Myosin-bindendes Protein C, Gluthathion-Peroxidase und Histon 4 in umfassenden mitochondrialen Proteomstudien des humanen Herzens wie der von Taylor, die diese Proteine ebenso in ihren Präparationen detektierte, der Kategorie „mitochondrienassoziiert“ zugeordnet werden (Taylor *et al.*, 2003). Auf der anderen Seite wiederum wurden in dieser Arbeit zur Analyse mitochondrialer Proteinphosphorylierungen teilweise Phosphoproteine berücksichtigt, die laut Datenbank mitochondrial sind (z.B. Phospholamban), deren Funktion und Lokalisierung jedoch eher im Zusammenhang mit anderen Organellen bekannt sind. Dieser Aspekt muss in der Interpretation mitochondrialer Phosphorylierungsereignisse sorgfältig berücksichtigt werden.

Zusammenfassend lässt sich also die Hypothese formulieren, dass eine gewisse Kontaminationsrate aufgrund der Koloalisation nichtmitochondrialer Proteine unvemeidbar ist. Zusätzlich liegt die Vermutung nahe, dass einige laut Datenbank als nichtmitochondrial definierten Proteine möglicherweise bisher noch nicht mitochondrial identifizierte Proteine repräsentieren. Die Forschung ist eine dynamische Wissenschaft und einige mitochondriale Proteine müssen möglicherweise noch im Katalog öffentlicher Datenbanken aufgegriffen werden.

Zusammenfassend ist das Antikörper-basierte Auftrennverfahren eine im Vergleich zur Differential- und Dichtegradientenzentrifugation bessere Strategie zur Isolation intakter und reiner Mitochondrienfraktionen, der jedoch natürlich bedingte Grenzen gesetzt sind.

4.2 Mitochondrialer Akt-Proteinimport

In dieser Arbeit konnte eine mitochondrienfraktionsassoziierte Akt-Anreicherung nachgewiesen werden, die nach Insulinstimulation deutlich verstärkt wurde.

In vergangenen Arbeiten wurde bereits postuliert, dass die aktivierte Akt sequentiell in alle Mitochondrienfraktionen transloziert. Die Akt-Isoformen werden jedoch unterschiedlich reguliert. Laut Literaturangaben transloziert nach Insulinstimulation vorwiegend die Akt1 in die Mitochondrien, während die Akt2-Isoform bei Fehlen von Akt1 kompensatorisch vermehrt transloziert. Zudem wurde die Hypothese mehrfach formuliert, dass die Akt1-Translokation im Δ Akt2 deutlich schwächer als im WT ist (Bijur and Jope, 2003; Deng *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2013). Diese Untersuchungen beruhen auf der Verwendung konstitutiver globaler KO Mäuse für die Akt Isoformen.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Akt in der mitochondrialen Fraktion nachweisbar war. Insulin steigerte die Signalintensität in WT, Δ Akt1 (induzierbare, kardiomyozyten-spezifische Akt1 KO Mäuse und Δ Akt2 (induzierbare, kardiomyozytenspezifische Akt2 KO Mäuse) Präparationen. Dabei schien die Insulin-induzierte Signalstärke in WT und Δ Akt2 Mäusen etwa vergleichbar und in Δ Akt1 Mäusen eher vermindert zu sein. Dies spricht für einen bevorzugten Import von Akt1 in die Mitochondrien, während Akt2 in geringerem Umfang in den Mitochondrien nachweisbar war. Auf jeden Fall zeigte sich

aber, dass Insulin nicht nur die Assoziation von Akt- Protein mit der Mitochondrienfraktion steigerte, sondern dass auch die Menge an phosphorylierter Akt, also aktivierter Kinase, zunahm.

4.3 Murines kardiales Phosphoproteom

Es konnten in dieser Arbeit im basalen und insulinstimulierten Phosphoproteom 156 Phosphorylierungsstellen in 94 distinkten Phosphoproteinen bzw. 228 Phosphorylierungsstellen in 121 distinkten Phosphoproteinen als mitochondrial nachgewiesen werden. Es konnte somit in diesem Ansatz im Vergleich zu anderen Phosphoproteomstudien (s. Tab. 11) eine relativ hohe bzw. vergleichbare Zahl an Phosphorylierungsstellen bzw. Phosphoproteinen gewonnen werden. Dieses Ergebnis ist auch im Zusammenhang mit geringen Probenmengen als Ausgangsmaterial zu betrachten. So wurden bei vergleichbarer Ausbeute an Phosphoproteinen bzw. Phosphorylierungsstellen in dieser Arbeit je Phosphoproteomstudie +/- Insulin jeweils 12 Mäuseherzen eingesetzt, während beispielsweise in der Arbeit von Deng (Deng *et al.*, 2011) 45 Mäuseherzen eingesetzt wurden.

Da i.d.R. die Kombination verschiedener Ansätze zur Phosphopeptidanreicherung die Detektionswahrscheinlichkeit weiterer Phosphorylierungsstellen erhöht (Zhao *et al.*, 2011), deutet die relativ hohe Detektionsrate in dieser Arbeit trotz nur einer einzigen Anreicherungsmethode auf die Effizienz dieser Methode hin. Dies spricht dafür, dass die Kombination aus Mitochondrienisolation, Phosphopeptidanreicherung sowie anschließender Nano-LC-ESI-MS/MS-Analyse eine durchaus effiziente Strategie zur Charakterisierung des mitochondrialen Phosphoproteoms darstellt.

In Anbetracht eines geschätzten mitochondrialen Proteoms aus 3000 Proteinen (Richly *et al.*, 2003; Westermann and Neupert, 2003) und eines geschätzten mitochondrialen Phosphoproteoms von etwa 1000 Phosphoproteinen (Hunter, 1995), ist die hier durchgeführte Charakterisierung des mitochondrialen Phosphoproteoms auf der Grundlage von nur 94 bzw. 121 Phosphoproteinen bisher sehr unvollständig. Obwohl die biologische Variabilität durch die Anwendung eines einheitlichen Arbeitsschemas und den Einsatz von Mäusen vergleichbaren Alters, Geschlechts und Gewichts weitgehend reduziert wurde, wurde in dieser Arbeit eine eingeschränkte Reproduzierbarkeit der Ergebnisse beobachtet. Nur knapp 15-20 % aller Phosphorylierungsstellen konnten im jeweiligen Phosphoproteom in allen vier Experimenten nachgewiesen werden. Selbst in der Literatur sehr gut charakterisierte und hochabundante Phosphorylierungsereignisse, beispielsweise die Phosphorylierung der Pyruvatdehydrogenase, konnten nicht in allen 4 Experimenten detektiert werden.

Diese geringe Reproduzierbarkeit deckt sich auch mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, wie der von Bak, in dessen Phosphoproteomstudie nur 12-15 % aller Phosphorylierungsstellen in 4 durchgeführten Experimenten nachgewiesen werden konnten (Bak *et al.*, 2013). Der Erfolg einer umfassenden Phosphoproteomic Studie ist v.a. durch drei Faktoren limitiert. Zum einen ist die kovalente Bindung zwischen dem Phosphoprotein und der Aminosäureseitenkette instabil, sodass diese oftmals während des Probenaufbereitungsprozesses bishin zur Ionisierung im Massenspektrometer nicht aufrechterhalten werden kann. Zum anderen sind Proteine oftmals nur vorübergehend phosphoryliert (Seo and Lee,

2004). Darüber hinaus besteht die Hypothese, dass ein Großteil der identifizierten Phosphoproteine nur aufgrund der hochsensitiven MS/MS und der geringen Spezifität der Kinasenaktivität detektiert werden, jedoch scheinbar weniger regulatorische und möglicherweise neutrale Phosphorylierungsstellen repräsentieren. Diese Phosphorylierungsstellen scheinen nämlich in Bezug auf die Enzymaktivität funktionell irrelevant zu sein (Covian and Balaban, 2012). Die funktionelle Bedeutsamkeit, die Molfraktion sowie das zugehörige Kinase/Phosphatase-System ist für eine Vielzahl von Phosphorylierungsstellen unbekannt, wodurch die Detektion von Phosphorylierungsstellen und ihre Interpretation erschwert sind.

Um also die dynamischen und reversiblen Modifikationen zu erfassen, wäre es sinnvoll, die Phosphoproteomstudie durch eine höhere Anzahl an Analysen zu erweitern. Da Phosphorylierungen ein Mechanismus zur Regulation diverser mitochondrialer Prozesse sind, könnte durch Variation der Parameter Gewicht, Alter, Belastung und Nahrungsexposition die Detektionsrate an unterschiedlichen Phosphoproteinen zusätzlich gesteigert werden.

Das hier erarbeitete Phosphoproteom repräsentiert somit nur eine kleine Fraktion aller antizipierten mitochondrialen Phosphoproteine.

Strategie	Spezies	Phosphoproteine und Phosphorylierungsstellen	Quelle
TiO2-HILIC-LC-MS/MS	Ratte	448 Phosphorylierungsstellen in 194 distinkten Phosphoproteinen	(Bak <i>et al.</i> , 2013)
SDS-PAGE-TiO2-LC-MS/MS	Maus	236 Phosphorylierungsstellen in 181 distinkten Phosphoproteinen	(Deng <i>et al.</i> , 2011)
iTRAQ labelling-SCX/HILIC/TiO2-LC-MS/MS-HCD	Schwein	56 Phosphorylierungsstellen in 38 distinkten Phosphoproteinen	(Boja <i>et al.</i> , 2009)
2D-BN-PAGE-phos—anti-Ser/Thr/Tyr Ab-MS SCX/IMAC-LC-MS/MS	Ratte	26 Phosphorylierungsstellen in 19 distinkten Phosphoproteinen	(Feng <i>et al.</i> , 2008)
32-P labelling/phos-tag 540 gel staining-2-DE-MS	Schwein	68 Phosphoproteine	(Aponte <i>et al.</i> , 2009)
2-DE-ProQ staining-MS	Rind	45 Phosphoproteine	(Hopper <i>et al.</i> , 2006)
2-DE-ProQ staining-MS or P32 labelling-2-DE-MS	Schwein	13 Phosphoproteine	(Schulenberg <i>et al.</i> , 2003)

Tabelle 11: Übersicht von mitochondrialen kardialen Phosphoproteomstudien

4.3.1 Effekt von Insulin auf das murine kardiale Phosphoproteom

Eine der hervorsteckenden Erkenntnisse dieser umfassenden Phosphoproteomstudie ist, dass Insulin in physiologischen Konzentrationen einen bedeutsamen Anstieg in der Zahl von identifizierten nichtredundanten, mitochondrialen Phosphopeptiden in isolierten Mitochondrien am Mauserzen

bewirkt. Darüber hinaus wurden im Phosphoproteom nach Insulinstimulation exklusiv viele weitere distinkte, differente Proteine und zusätzliche, differente Phosphorylierungsstellen detektiert. Im Vergleich zu basalen Bedingungen wurden nach Insulinstimulation 350 % mehr exklusive, bisher noch nicht beschriebene Phosphorylierungsstellen entdeckt. Die Ergebnisse sind kongruent mit der Phosphoproteomstudie von Zhao *et al.*, in der der Effekt von Insulin auf die Phosphorylierung mitochondrialer Proteine am humanen Skelettmuskel untersucht worden ist (Zhao *et al.*, 2014). Zudem konnte gezeigt werden, dass wesentlich mehr Phosphopeptide in einer Akt-isoformunspezifischen Weise nach Insulinstimulation signifikant reguliert werden.

Diese Ergebnisse indizieren, dass Insulin in physiologischer Konzentration mitochondriale Prozesse durch gesteigerte Phosphorylierung zusätzlicher und auch unterschiedlicher mitochondrialer Proteine reguliert.

Aus der Arbeit geht außerdem hervor, dass Insulin mitochondriale Proteine in allen mitochondrialen Subkompartimenten sowie sämtlicher Funktionsklassen durch phosphorylierungsabhängige Mechanismen beeinflusst. Die meisten Phosphoproteine, die im Phosphoproteom nach Insulinstimulation detektiert worden sind, lassen sich in absteigender Reihenfolge der oxidativen Phosphorylierung sowie dem Citratzyklus zuordnen. Die Phosphoproteine, die exklusiv unter Insulinstimulation und nicht unter basalen Bedingungen vertreten waren, sind primär in der oxidativen Phosphorylierung, im Citratzyklus und im Fettsäuremetabolismus involviert. Dies impliziert, dass insulininduzierte Veränderungen in der Phosphorylierung mitochondrialer Proteine die insulinvermittelte Stimulation der ATP-Synthese vermitteln (Stump *et al.*, 2003). Die meisten exklusiven Phosphorylierungsstellen sind in absteigender Reihenfolge in der oxidativen Phosphorylierung sowie der DNA/RNA Synthese und -Reparatur vertreten. Auch die erstmalig neu identifizierten Phosphorylierungsstellen sind insbesondere der oxidativen Phosphorylierung und der DNA/RNA Synthese- und Reparatur zuzuordnen. Die Beobachtungen suggerieren einerseits, dass Insulin vorwiegend die ATP-Synthese reguliert. Andererseits geben die Beobachtungen auch einen starken Hinweis darauf, dass Insulin sowohl unmittelbare Effekte auf Proteomebene durch posttranslationale Modifikationen als auch langfristige Effekte auf Expressionsebene durch Einflussnahme auf Transkription bzw. Translation im Mitochondrium ausübt.

Diese Erkenntnisse unterstützen bisherige Forschungsarbeiten, in denen in Kardiomyozyten eine insulinvermittelte Modulation mitochondrialer Gene, der Proteinexpression sowie der mitochondrialen Funktion aufgedeckt wurde: Ein Knock Out des Insulin-Rezeptor-Substrat (IRS) resultierte in einer deutlichen Abnahme der ATP-Synthese sowie einer signifikanten Herunterregulation der OXPHOS-Gene. Bei Deletion des myokardialen Insulinrezeptors (IR) und IGF-Rezeptors (IGFR1) wurde ebenso eine signifikante Herunterregulation sowohl der Gene der Elektronentransportkette und der mitochondrialen β -Oxidation des Fettsäureabbaus konstatiert (Laustsen *et al.*, 2007; Riehle and Abel, 2016). Dadurch, dass Insulin nicht nur die Phosphorylierung von Proteinen aus dem Citratzyklus und Fettsäuremetabolismus vermittelt, sondern auch Einfluss auf den Pyruvat-, Valin-/Leucin-/Isoleucin-,

und Propanoatstoffwechsel hat, ist Insulin ein wichtiger Mediator zur Sicherstellung des myokardialen metabolischen Phänotyps (Stanley *et al.*, 2005b). Dieser Phänotyp wird durch die Substratpräferenz unter gegebenen metabolischen und hämodynamischen Bedingungen definiert. Die Unfähigkeit zur Adaptation an wechselnde Substratbedingungen, eine sog. metabolische Inflexibilität, wurde beim Typ 2 Diabetes beobachtet (Cheng *et al.*, 2010). Zusammenfassend könnte die insulinvermittelte phosphorylierungsabhängige Regulation von Proteinen in der oxidativen Phosphorylierung, im Citratzyklus und Fettsäuremetabolismus eine wichtige Ursache von mitochondrialer Dysfunktion bei Insulinresistenz sein (Szendroedi *et al.*, 2011).

Die Verteilung von Ser, Thr und Tyr Phosphorylierungsstellen im Phosphoproteom unter basalen Bedingungen und nach Insulinstimulation spiegelt die Beteiligung unterschiedlicher Kinasen und Phosphatasen wider.

Insulin vermittelt Thr Phosphorylierungen, jedoch mehrheitlich Ser Phosphorylierungen. In beiden Phosphoproteomen zeigt sich hierbei ein ähnliches relatives Verteilungsmuster, in dem die höchste Fraktion mitochondrialer Proteine an Ser phosphoryliert wird. In Studien an isolierten Mitochondrien aus dem Herz- (Bak *et al.*, 2013) bzw. Skelettmuskel (Zhao *et al.*, 2011) wurde ein ähnliches Verteilungsmuster beobachtet. Scheinbar sind Serin-Phosphorylierungen der wichtigste Mechanismus in der Regulation mitochondrialer Prozesse. Interessanterweise wurden in einer umfassenden Phosphoproteomstudie zur Charakterisierung von neun verschiedenen Mausgeweben (Huttlin *et al.*, 2010) hauptsächlich Ser Phosphorylierungen, gefolgt von Thr und Tyr beobachtet und mit ähnlichen Studien (Olsen *et al.*, 2006) in Einklang gebracht. Am Herzgewebe wurden insgesamt ca. 2 % Tyr Phosphorylierungen beobachtet. Dass in isolierten Mitochondrien der Anteil von Tyr Phosphorylierungen um einen vielfachen Faktor höher beobachtet worden ist, gibt einen starken Hinweis darauf, dass Tyr Phosphorylierungen ein wichtiges Instrument zur Vermittlung mitochondrialer Signalwege sind (Zhao *et al.*, 2011).

Es fällt außerdem auf, dass Tyr Phosphorylierungen sämtliche Funktionen (oxidative Phosphorylierung, Metabolismus, DNA/RNA- Synthese und Reparatur, Signaltransduktion, Transport) beeinflussen, insbesondere den mitochondrialen Transport. Im Vergleich zwischen dem Phosphoproteom basal und nach Insulinstimulation ist zudem bezeichnend, dass die relative Verteilung von Ser, Thr und Tyr Phosphorylierungsstellen nahezu gleich ist, jedoch werden nach Insulinstimulation vermehrt Proteine des Metabolismus und der oxidativen Phosphorylierung Tyr phosphoryliert. Dies deutet auf einen Zusammenhang zwischen insulinvermittelten Tyr Phosphorylierungen und dem mitochondrialen Energiemetabolismus hin. Die scheinbare Schlüsselrolle von Tyr Phosphorylierungen im Energiemetabolismus konnte auch in unabhängigen massenspektrometrischen Untersuchungen, z.B. von Mitochondrien aus Rattenhirn, bestätigt werden (Lewandrowski *et al.*, 2008). Auch der signifikante Anstieg von Tyrosinphosphorylierungen als Reaktion auf spezifische Stimuli, z.B. Redoxsignale, ist bekannt (Chiarugi and Cirri, 2003; Monteiro and Stern, 1996).

Thr Phosphorylierungen beeinflussen ebenso sämtliche Funktionen, insbesondere Proteine der oxidativen Phosphorylierung, Signaltransduktion, DNA/RNA-Synthese und -Reparatur sowie des Metabolismus. Nach Insulinstimulation werden vermehrt Proteine des Transports Thr phosphoryliert, was auf eine mögliche Funktion von insulinvermittelten Thr Phosphorylierungen im Transport hinweist. Ser Phosphorylierungen haben ebenso einen Effekt auf sämtliche mitochondriale Funktionen, insbesondere auf die oxidative Phosphorylierung und den Metabolismus. Nach Insulinstimulation ist die mitochondriale funktionelle Verteilung der Ser vermittelten Phosphorylierungen nicht wesentlich verändert.

Zusammenfassend scheint Insulin sämtliche mitochondriale Funktionen aller vier mitochondrialer Kompartimente über phosphorylierungsabhängige Mechanismen zu regulieren, wobei möglicherweise der Tyr-Phosphorylierung mitochondrialer Proteine eine Schlüsselrolle in insulinvermittelten mitochondrialen Signalwegen zukommt.

4.3.2 Akt-isoformspezifische Regulationen

Die quantitative Phosphoproteomanalyse ermöglichte die Untersuchung von Akt-isoformspezifischen Regulationen. Diese Methode führte erfolgreich zur Identifizierung von insgesamt 204 Phosphopeptiden im Phosphoproteom (-) und 302 Phosphopeptiden im Phosphoproteom (+). Die Mehrheit der Phosphopeptide war quantitativ nicht verändert. Dies kann auf zwei verschiedenen Erklärungsansätzen beruhen: entweder handelt es sich um Proteine, die nicht durch Akt phosphoryliert wurden, oder aber um Proteine, deren Phosphorylierungsgrad bei Δ Akt1 bzw. Δ Akt2 durch die jeweils nichtmodifizierte Isoform kompensiert wurde. Um dieser Frage weiter nachzugehen, wäre ein weiteres Versuchsmodell mit einem Knock Out beider Isoformen sinnvoll.

Insgesamt wurde die Mehrheit der Phosphoproteine isoformunspezifisch, d.h. sowohl durch Akt1 als auch durch Akt2 reguliert. Auch dieses Phänomen kann auf zwei verschiedenen Erklärungsansätzen beruhen: entweder handelt es sich um Proteine, die tatsächlich durch beide Isoformen phosphoryliert werden, oder aber um Proteine, deren Phosphorylierungsgrad bei Δ Akt1 bzw. Δ Akt2 durch die jeweils nichtmodifizierte Isoform kompensatorisch reguliert wurde. Auch zur Beantwortung dieser Fragestellung wäre ein Versuchsmodell mit Knock Out beider Isoformen sinnvoll.

Unter den identifizierten Proteinen befanden sich wenige bereits bekannte Akt1-Substrate. Dazu zählen u.a. *Breast Cancer 1* (Brca1) (Altiok *et al.*, 1999), *Glykogen synthase kinase 3 beta* (GSK3 β) (Salas *et al.*, 2003) sowie *Ribosomal Protein 3* (Rps3) (Lee *et al.*, 2010), *DnaJ homolog subfamily C member 5* (Dnajc5) (Evans *et al.*, 2006) und *Prohibitin* (Phb) (Jiang *et al.*, 2015). Akt2-Substrate wurden im Phosphoproteom unter beiden Bedingungen nicht identifiziert.

Insgesamt wurden 4 distinkte Kandidaten- Proteine im Phosphoproteom (-) und 13 distinkte Kandidaten- Proteine im Phosphoproteom (+) durch den Akt-Isoform-KO signifikant verändert, d.h. sie zeigten eine starke Abweichung im Phosphorylierungsgrad im Vergleich zum Wildtyp. Bei den meisten Kandidaten-Proteinen ist keine unmittelbare Verbindung mit Akt bzw. mit dem PI3K-Signalweg

bekannt. Vier der insgesamt 17 Kandidaten- *ATP synthase subunit alpha* (ATP5a1), *Pyruvate Dehydrogenase 1* (Pdha1), *Prohibitin* (Phb) und *Voltage-dependent anion-selective channel protein 1* (Vdac1)- weisen jedoch direkte Verbindungen zu Akt auf. Dies erlaubt den Rückschluss, dass die Veränderungen im Phosphorylierungsmuster hochwahrscheinlich Ursache des Isoform KO sind. Interessanterweise sind diese Kandidaten mit Ausnahme von Prohibitin bisher nicht als Akt-Substrat identifiziert worden.

Einer dieser vier Kandidaten ist die Atp5a1. Dieses Protein war nach Insulinstimulation einer reduzierten Phosphorylierung sowohl in Δ Akt1 als auch in Δ Akt2 unterlegen, das wiederum eine direkte Phosphorylierung durch Akt1 und Akt2 nahelegt.

Die ATP-Synthase ist ein Transmembranprotein der inneren Mitochondrienmembran, das sich aus zwei strukturellen Domänen zusammensetzt: die hydrophile F_1 -Domäne, die in die Matrix reicht, sowie die hydrophobe, transmembranäre F_0 -Domäne. F_1 besteht aus fünf verschiedenen Untereinheiten. Jeweils drei Kopien der Untereinheiten α und β , sowie die einfachen Untereinheiten γ , δ und ϵ . Die F_0 -Domäne wird aus einem c-Ring sowie einer Kopie der Untereinheiten a, b, d, F_6 und oligomycin-sensitiv-confering-protein (OSCP) gebildet. Funktionell kann die ATP-Synthase in einen Rotor (c-Ring, γ , δ und ϵ), und einen Stator ($\alpha_3 \beta_3$ Hexamer, a, b, d, F_6 , OSCP) unterteilt werden. Dabei bildet das $\alpha_3 \beta_3$ Hexamer des Stators das Reaktionszentrum der ATP-Synthase (Jonckheere *et al.*, 2012).

Im Institut der Herz-Kreislaufphysiologie konnte erstmalig eine direkte Interaktion der Enzyme Akt und ATP-Synthase nachgewiesen werden. In den TAP (Tandem Affinity Purification)/MS- und PLA (Proximity Ligation Assay)- Analysen konnten sowohl in HEK239T-Zellen als auch in isolierten adulten Maus-Kardiomyozyten die ATP-Synthase als Interaktionspartner von Akt1 bestätigt werden (Blasberg, 2015). In anderen Studien konnte ein funktioneller Zusammenhang zwischen den beiden Kinasen erarbeitet werden. So zeigte Dengs Forschungsgruppe, dass mitochondriales Akt1 die ATP-Synthase durch verstärkte Glukoseaufnahme und gesteigerte Effizienz der mitochondrialen Atmungskette in Kardiomyozyten positiv reguliert, während der Sauerstoffverbrauch sowie die ROS-Produktion reduziert werden (Deng *et al.*, 2014). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass mitochondriales Akt1 nicht nur unter Insulinstimulation (Deng *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2009), sondern auch unter basalen Bedingungen die oxidative Phosphorylierung bzw. ATP-Synthase stimuliert, wobei der Effekt unter Insulinstimulation wesentlich grösser war. Dies lässt darauf schließen, dass Insulin über Akt1 auf die Energieproduktion Einfluss nimmt. Interessanterweise zeigte sich kein Unterschied in der ATP-Synthase-Aktivität zwischen Akt1 KO- und Wildtyp-Mäusen, was auf eine kompensatorische Translokation von Akt2 in die Mitochondrien hinweisen könnte.

Es gibt deutliche Hinweise in Studien am diabetischen Herzen, dass der dysregulierte Insulin-Akt-Signalweg den mitochondrialen Energiemetabolismus deutlich beeinträchtigt. Umgekehrt fördert ein beeinträchtigter Energiemetabolismus die Entwicklung einer diabetischen Kardiomyopathie (Stanley *et al.*, 1997). Das profunde Verständnis der Insulin-Signalwege und Akt-Targets im Mitochondrium einschließlich der ATP-Synthase sind also essentiell zum Verständnis pathophysiologischer

Zusammenhänge über diabetische Kardiomyopathie bei insulinresistenten bzw. insulindefizitären Patienten und zur Entwicklung neuer Therapiestrategien.

In bisherigen Arbeiten im Bereich der kardialen Forschung ist bisher lediglich die β -Untereinheit der ATP-Synthase als hochwahrscheinliches Substrat der Akt beschrieben worden (Bijur and Jope, 2003). In MS- und Immuno-PAS-Versuchen wurde nachgewiesen, dass nach Insulinstimulation die Phosphorylierungsrate der β -Untereinheit der ATP-Synthase deutlich höher war als im Basalzustand. In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass auch die α -Untereinheit der ATP-Synthase nach Insulinstimulation einer Akt-abhängigen Phosphorylierung unterliegt. In Zusammenschau mit Blasbergs Ergebnissen kann die Hypothese formuliert werden, dass die α -Untereinheit der ATP-Synthase durch Akt1 direkt phosphoryliert wird.

Weitere Untersuchungen, um eine möglicherweise direkte oder indirekte Interaktion zwischen Akt2 und phosphorylierter Atp5a1 aufzuschlüsseln, sind in diesem Zusammenhang erforderlich.

Darüber hinaus wurden in dieser Arbeit im basalen Phosphoproteom eine neue Phosphorylierungsstelle (Atpc1, pT144) und nach Insulinstimulation drei neue Phosphorylierungsstellen (Atpc1 pT144; Atp5d pS139; Atpo pS180) der ATP-Synthase erstmalig identifiziert (s. Abb. 35). Daraus kann postuliert werden, dass Insulin durch weitere, Akt-unabhängige Mechanismen die ATP-Synthase durch Phosphorylierung multipler Angriffspunkte reguliert. Dieses Postulat würde Yangs Beobachtung eines synergistischen Effektes von Insulin und Akt auf die ATP-Synthase unterstützen.

Ein weiterer Kandidat mit verändertem Phosphorylierungsmuster ist die Pdha1. Das Protein zeigte sowohl basal und verstärkt nach Insulinstimulation im Δ Akt1 und Δ Akt2 einen reduzierten Phosphorylierungsgrad. Dies erlaubt die Vermutung, dass die Phosphorylierung der Pdha1 durch beide Akt-Isoformen vermittelt wird. Es handelt sich bei der Pyruvatdehydrogenase um einen Multienzymkomplex (Pyruvatdehydrogenasekomplex, *PDC*) in der mitochondrialen Matrix, der sich aus drei unterschiedlichen Enzymen zusammensetzt: Pyruvatdehydrogenase (E1), Dihydroliponamid-Acetyltransferase (E2) sowie Dihydroliponamid-Dehydrogenase (E3). Der PDC ist ein regulatorisches Enzym, der die Reaktion von Pyruvat zu Acetyl-CoA katalysiert, und damit die Glykolyse an den Citratzyklus anschließt. Der PDC ist somit ein essentielles Element in der glykolytischen oxidativen Phosphorylierung und spielt eine bedeutende Rolle in der Regulation des mitochondrialen Metabolismus.

Deng und Mitarbeiter konnten in Koimmunopräzipitationsversuchen bereits zeigen, dass in Kardiomyozyten alle Untereinheiten, vorzugsweise E1 und das E3-bindende Protein (PDHX) des PDC mit der Akt1 direkt interagieren. Nach Insulinstimulation wurde dieser Effekt verstärkt und die ATP-Produktion signifikant gesteigert. Der Insulineffekt wurde jedoch interessanterweise nicht durch ein stärker angereichertes mitochondriales Akt1-Signal vermittelt. Andererseits konnte in weiteren Experimenten durchaus demonstriert werden, dass mitochondriales Akt1 die Glukoseaufnahme und PDC-Aktivität deutlich steigert. Dies lässt darauf schließen, dass Insulin über Akt1-abhängige und –unabhängige Mechanismen positiven Einfluss auf die PDC-Aktivität und damit auf die ATP-Produktion

ausübt. Darüber hinaus übt Akt über die Inhibition der Gsk3 β , die die PDH phosphoryliert und dadurch inhibiert (Hoshi *et al.*, 1996), auch einen indirekt positiv regulierenden Einfluss auf die PDH aus.

Eine Inhibition des PDC führt zu einer metabolischen Schwerpunktverlagerung von der Glykolyse zur Fettsäureoxidation- ein metabolischer Zustand, der einem insulinresistenten Metabolismus ähnelt (Huss and Kelly, 2005). Ein KO der Pdha1 vermittelte Herzhypertrophie und plötzlichen Herztod (Sidhu *et al.*, 2008). In einer onkologischen Studie konnte bereits ein Link zwischen dem Akt/PI3K-Signalweg und der Pdha1-Phosphorylierung gezeigt werden (Cerniglia *et al.*, 2015). In dieser Arbeit konnte erstmalig am Herzen *in vivo* ein Link zwischen dem Insulin-Akt/PI3K-Signalweg und der Pdha1-Phosphorylierung gezeigt werden. Auch bei diesem Kandidaten-Protein sind weitere Untersuchungen erforderlich, um eine möglicherweise direkte oder indirekte Interaktion zwischen Akt2 und phosphorylierter Pdha1 aufzuschlüsseln,.

Trotz eindeutiger Hinweise auf eine direkte Interaktion zwischen Akt1 und Atp5a1 sowie Akt1 und Pdha1, zeigen weder die Atp5a1 noch die Pdha1 das Akt- Konsensusmotiv (R-X-R-X-X-X-S/T) (s. 3. 2. 2. 6). Dies wirft die berechnete Frage auf, inwiefern die Suche von Konsensusmotiven eine zuverlässige Methode zur Identifizierung von Akt-Substraten ist. Manning deckt zu diesem Sachverhalt in einer Literaturstudie auf, dass nur annäherungsweise 25 % aller bisher identifizierten Akt-Substrate die Konsensussequenz tragen. Möglicherweise bestehen unbekannte Sequenzen oder makromolekulare Interaktionen, die eine Akt-abhängige Phosphorylierung des Substrates vermitteln (Manning and Cantley, 2007). Bona Fide Kriterium zur Bestimmung eines Akt-Substrates sollte daher nicht eine einzige Methode- wie z.B. eine Konsensusmotivsuche- sein, sondern die Kombination verschiedener, valider Methoden, vorzugsweise durch Akt-Verlust- und Akt-Zunahme-Versuche. In diesem Kontext können unter Heranziehung der Ergebnisse verschiedener Methoden sowohl die ATP5a1 als auch die Pdha1 mit hoher Wahrscheinlichkeit als Akt1-Substrat angenommen werden.

Die funktionelle Relevanz der Interaktion von Akt1 mit Atp5a1 und Pdha1 könnte darin liegen, dass die insulininduzierte Translokation von Akt1 in Mitochondrien die Energieproduktion über verschiedene mitochondriale Targets im Citratzyklus und der oxidativen Phosphorylierung koordiniert, um eine für das Herz essentielle ATP-Menge unter verschiedenen metabolischen und hämodynamischen Bedingungen zu gewährleisten.

In der hier vorliegenden Phosphoproteom-Analyse konnte außerdem gezeigt werden, dass der Phosphorylierungsgrad von Prohibitin (Phb) nach Insulinstimulation im Δ Akt1 und Δ Akt2 signifikant reduziert war, was eine direkte Regulation von Phb durch beide Isoformen suggeriert. Prohibitin ist ein Protein der inneren Mitochondrienmembran mit diversen Funktionen, u.a. zur Aufrechterhaltung der mitochondrialen Integrität, zur Förderung der mitochondrialen Biogenese, zum Schutz vor Zellalterung sowie in der Funktion als Chaperon (Artal-Sanz *et al.*, 2003; Coates *et al.*, 1997; Nijtmans *et al.*, 2002; Piper *et al.*, 2002).

In onkologischen Studien konnte die Arbeitsgruppe von Han *in vitro* und *in vivo* zeigen, dass Prohibitin durch Akt phosphoryliert wird (Han *et al.*, 2008). Es wird spekuliert, dass eine Akt-abhängige

Phosphorylierung von Prohibitin möglicherweise die Proteinstabilität von Prohibitin sowie die transkriptionale Regulation von E2F beeinflusst (Mishra *et al.*, 2006, 2005). Auch ein aktivierender Einfluss auf den Ras-Raf-Signalweg (Rajalingam and Rudel, 2005) durch phosphoryliertes Prohibitin wird diskutiert, wodurch Zellzyklusregulation, Apoptose und Entzündungsreaktionen günstig beeinflusst werden (Chowdhury *et al.*, 2014; Sánchez-Quiles *et al.*, 2012). Im Bereich der kardialen Forschung konstatierte die Arbeitsgruppe von Dong einen protektiven Effekt des Akt/Phb-Signalweges bei diabetischer Kardiomyopathie (Dong *et al.*, 2016). Spannenderweise ist Prohibitin nicht nur ein Substrat von Akt, sondern scheint diese ebenso zu phosphorylieren, was sich wiederum auf eine verbesserte Insulinresistenz und reduzierte Apoptoserate in Kardiomyozyten auszuwirken scheint (Han *et al.*, 2007; Luo *et al.*, 2005). Es handelt sich also bei der Phosphorylierung von Phb möglicherweise um einen intrinsischen *Feedback*-Mechanismus, über den die Akt die eigene Aktivierung reguliert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit untermauern die bisherigen Erkenntnisse zum Insulin-Akt-Phb-Signalweg. Darüber hinaus konnte durch diese Phosphoproteomanalyse erstmalig eine neue Phosphorylierungsstelle (pT141) von Phb identifiziert werden, die zugleich Target der Akt-abhängigen Phosphorylierung ist. Für die Entwicklung von Therapiestrategien bei diabetischer Kardiomyopathie mag dieses neu bekannte Target ein potentielles Interventionsziel sein.

Über die Phosphorylierung von Vdac1 ist in der Literatur bisher wenig bekannt. Vdac1 ist ein Protein der äusseren Mitochondrienmembran, das zahlreiche Funktionen ausübt, u.a. die Aufrechterhaltung der zellulären Ca^{2+} -Homöostase, die Regulation des Energiemetabolismus sowie die der Zellapoptose (Shoshan-Barmatz and Ben-Hail, 2012). In Endothelzellen konnte gezeigt werden, dass die Plasminogen Kringle 5 (K5) induzierte Apoptose in Endothelzellen über einen *Feedback-loop* Vdac1-Akt-Gsk3 β -Vdac1 vermittelt wird (Li *et al.*, 2014): K5 steigert die Phosphorylierung von Vdac1 über den Akt-Gsk3 β -Signalweg, wobei die Phosphorylierung von Vdac1 dieses Protein zu stabilisieren scheint. Der Akt-Gsk3 β -Signalweg potenziert dessen Phosphorylierung (Yuan *et al.*, 2008). Es gibt starke Hinweise, dass die Interaktion zwischen Vdac1 und Akt eine kritische Rolle insbesondere im Zusammenhang mit Ischämie/Reperfusion-Verletzungen und Kardioprotektion spielt (Camara *et al.*, 2017) (s. Details hierzu in 1. 2. 2 Bedeutung der Akt in kardialen Mitochondrien). In *in vitro* Studien konnte hierbei gezeigt werden, dass Vdac1 sowohl durch Gsk3 β als auch durch Akt phosphoryliert werden kann (Fiol *et al.*, 1987). Eine direkte Vdac1-Akt-Interaktion *in vivo* am Herzen ist bisher nicht nachgewiesen worden. Die Ergebnisse aus dieser Arbeit zeigen, dass der Phosphorylierungsgrad von Vdac1 nach Insulinstimulation im Δ Akt1 und Δ Akt2 signifikant reduziert war, was eine Akt-abhängige Regulation von Vdac1 impliziert und die in der Literatur postulierten kardioprotektiven Regulationsmechanismen bekräftigen. In dieser Arbeit wurde auch eine bisher noch nicht bekannte Phosphorylierungsstelle von Vdac1 (pT271) identifiziert. Die Identifizierung weiterer potentieller Phosphorylierungsstellen und deren Charakterisierung sind eine sinnvolle Strategie zukünftiger Analysen, um das Zusammenspiel von Akt und Vdac1 besser zu verstehen.

Die anderen Akt-abhängig regulierten Kandidaten weisen keine bisher bekannte direkte Verbindung zu Akt oder dem PI3K-Signalweg auf. Durch die Identifizierung neuer Akt-abhängiger Regulationsmechanismen konnten also neue Akt-Signaltransduktionspartner in Kardiomyozyten identifiziert werden, die auf weitere, bisher noch nicht beschriebene Funktionen von Akt hinweisen. Ein sehr eindrücklicher Befund in dieser Studie war, dass die meisten Proteine, die einer Akt-abhängigen Regulation unterliegen, dem Metabolismus zuzuordnen sind. Dies galt sowohl für die Proteine im Proteom als auch für die im Phosphoproteom unter basalen Bedingungen und nach Insulinstimulation. Faszinierend war auch die Beobachtung, dass nur auf Phosphoproteomebene Regulationen der OXPHOS identifiziert wurden. Diese Ergebnisse suggerieren, dass mitochondriales Akt über Phosphorylierungsmechanismen eine bedeutende Rolle in der Synchronisierung von Substrat- und Sauerstoffbedarf und Energieproduktion am Herzen spielt. Mitochondrien am Herzen sind ständigen Fluktuationen im Energiebedarf ausgesetzt. Eine schnelle und reversible Anpassungsfähigkeit der mitochondrialen Funktion durch Proteinphosphorylierungen ist also ein essentieller Mechanismus, um eine suffiziente Energieproduktion zu gewährleisten.

4.4 Schlussfolgerung

Zusammenfassend belegen die bisherigen Ergebnisse, dass die Arbeitstrategie- die Kombination eines Transgenen Mausmodells mit Quantitativer Phosphoproteomics- ein erfolgreiches Instrument zur Identifizierung Akt-abhängiger Signaltransduktionen in murinen kardialen Mitochondrien darstellt. Die qualitativen und quantitativen Daten ermöglichen somit ein besseres Verständnis über Akt-vermittelte phosphorylierungsabhängige Mechanismen zur Regulation mitochondrialer Prozesse und geben Hinweise auf multiple neue Akt-Ziele, deren pathophysiologischer Zusammenhang in folgenden funktionalen Analysen weiter untersucht werden muss. Um die hochinteressante Erkenntnis über die regulatorische Funktion von Akt1 und Akt2 auf die Atp5a1 auf die Relevanz in der mitochondrialen Atmungskette zu überprüfen, wurde damit begonnen, im Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie mittels Respirometrie die Atmungskettenfunktion isolierter Herzmitochondrien zu messen. Die hieraus gewonnenen funktionalen Daten ermöglichen eine weitergehende Analyse Akt-isoformspezifischer und -unspezifischer Effekte auf die mitochondriale Atmungskette, insbesondere der ATP-Synthase.

5. Literaturverzeichnis

- Adams, J.W., Pagel, A.L., Means, C.K., Oksenberg, D., Armstrong, R.C., Brown, J.H., 2000. Cardiomyocyte apoptosis induced by Galphaq signaling is mediated by permeability transition pore formation and activation of the mitochondrial death pathway. *Circ. Res.* 87, 1180–1187.
- Alessi, D.R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., Hemmings, B.A., 1996. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.* 15, 6541–6551.
- Alessi, D.R., Cohen, P., 1998. Mechanism of activation and function of protein kinase B. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8, 55–62.
- Alessi, D.R., James, S.R., Downes, C.P., Holmes, A.B., Gaffney, P.R., Reese, C.B., Cohen, P., 1997. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr. Biol. CB* 7, 261–269.
- Altiok, S., Batt, D., Altiok, N., Papautsky, A., Downward, J., Roberts, T.M., Avraham, H., 1999. Heregulin induces phosphorylation of BRCA1 through phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 274, 32274–32278.
- Andjelković, M., Alessi, D.R., Meier, R., Fernandez, A., Lamb, N.J., Frech, M., Cron, P., Cohen, P., Lucocq, J.M., Hemmings, B.A., 1997. Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J. Biol. Chem.* 272, 31515–31524.
- Andjelković, M., Maira, S.M., Cron, P., Parker, P.J., Hemmings, B.A., 1999. Domain swapping used to investigate the mechanism of protein kinase B regulation by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 and Ser473 kinase. *Mol. Cell. Biol.* 19, 5061–5072.
- Andres, A.M., Stotland, A., Queliconi, B.B., Gottlieb, R.A., 2015. A time to reap, a time to sow: Mitophagy and biogenesis in cardiac pathophysiology. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 78C, 62–72. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.10.003>
- Andrienko, T., Kuznetsov, A.V., Kaambre, T., Usson, Y., Orosco, A., Appaix, F., Tiivel, T., Sikk, P., Vendelin, M., Margreiter, R., Saks, V.A., 2003. Metabolic consequences of functional complexes of mitochondria, myofibrils and sarcoplasmic reticulum in muscle cells. *J. Exp. Biol.* 206, 2059–2072.
- Arnott, D., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., 1993. Mass spectrometry of proteins and peptides: sensitive and accurate mass measurement and sequence analysis. *Clin. Chem.* 39, 2005–2010.
- Artal-Sanz, M., Tsang, W.Y., Willems, E.M., Grivell, L.A., Lemire, B.D., van der Spek, H., Nijtmans, L.G.J., Sanz, M.A., 2003. The mitochondrial prohibitin complex is essential for embryonic viability and germline function in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* 278, 32091–32099. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304877200>
- Bae, S.S., Cho, H., Mu, J., Birnbaum, M.J., 2003. Isoform-specific regulation of insulin-dependent glucose uptake by Akt/protein kinase B. *J. Biol. Chem.* 278, 49530–49536. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306782200>
- Bak, S., León, I.R., Jensen, O.N., Højlund, K., 2013. Tissue specific phosphorylation of mitochondrial proteins isolated from rat liver, heart muscle, and skeletal muscle. *J. Proteome Res.* 12, 4327–4339. <https://doi.org/10.1021/pr400281r>
- Balaban, R.S., 2002. Cardiac energy metabolism homeostasis: role of cytosolic calcium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 34, 1259–1271.

- Balaban, R.S., 1990. Regulation of oxidative phosphorylation in the mammalian cell. *Am. J. Physiol.* 258, C377-389.
- Balaban, R.S., Kantor, H.L., Katz, L.A., Briggs, R.W., 1986. Relation between work and phosphate metabolite in the in vivo paced mammalian heart. *Science* 232, 1121–1123.
- Baldwin, M.A., 2005. Mass spectrometers for the analysis of biomolecules. *Methods Enzymol.* 402, 3–48. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)02001-X](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)02001-X)
- Balendran, A., Casamayor, A., Deak, M., Paterson, A., Gaffney, P., Currie, R., Downes, C.P., Alessi, D.R., 1999. PDK1 acquires PDK2 activity in the presence of a synthetic peptide derived from the carboxyl terminus of PRK2. *Curr. Biol. CB* 9, 393–404.
- Bandiera, S., Rüberg, S., Girard, M., Cagnard, N., Hanein, S., Chrétien, D., Munnich, A., Lyonnet, S., Henrion-Caude, A., 2011. Nuclear outsourcing of RNA interference components to human mitochondria. *PLoS One* 6, e20746. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020746>
- Barlow, C., Hirotsune, S., Paylor, R., Liyanage, M., Eckhaus, M., Collins, F., Shiloh, Y., Crawley, J.N., Ried, T., Tagle, D., Wynshaw-Boris, A., 1996. Atm-deficient mice: a paradigm of ataxia telangiectasia. *Cell* 86, 159–171.
- Barrey, E., Saint-Auret, G., Bonnamy, B., Damas, D., Boyer, O., Gidrol, X., 2011. Pre-microRNA and mature microRNA in human mitochondria. *PLoS One* 6, e20220. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020220>
- Beer, M., Seyfarth, T., Sandstede, J., Landschütz, W., Lipke, C., Köstler, H., von Kienlin, M., Harre, K., Hahn, D., Neubauer, S., 2002. Absolute concentrations of high-energy phosphate metabolites in normal, hypertrophied, and failing human myocardium measured noninvasively with $(^{31}\text{P})\text{-SLOOP}$ magnetic resonance spectroscopy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 40, 1267–1274.
- Bellacosa, A., Franke, T.F., Gonzalez-Portal, M.E., Datta, K., Taguchi, T., Gardner, J., Cheng, J.Q., Testa, J.R., Tsichlis, P.N., 1993. Structure, expression and chromosomal mapping of c-akt: relationship to v-akt and its implications. *Oncogene* 8, 745–754.
- Bellacosa, A., Testa, J.R., Staal, S.P., Tsichlis, P.N., 1991. A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science* 254, 274–277.
- Bentzinger, C.F., Romanino, K., Cloëtta, D., Lin, S., Mascarenhas, J.B., Oliveri, F., Xia, J., Casanova, E., Costa, C.F., Brink, M., Zorzato, F., Hall, M.N., Rüegg, M.A., 2008. Skeletal muscle-specific ablation of raptor, but not of rictor, causes metabolic changes and results in muscle dystrophy. *Cell Metab.* 8, 411–424. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.10.002>
- Bernardi, P., 1999. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol. Rev.* 79, 1127–1155.
- Berridge, M.J., Bootman, M.D., Roderick, H.L., 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 517–529. <https://doi.org/10.1038/nrm1155>
- Biemann, K., 1988. Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* 16, 99–111.
- Bijur, G.N., Jope, R.S., 2003. Rapid accumulation of Akt in mitochondria following phosphatidylinositol 3-kinase activation. *J. Neurochem.* 87, 1427–1435.

- Blasberg, N. (2014). Identifizierung Akt-spezifischer Funktionen im Herzen. Dissertation Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
- Boengler, K., Dodoni, G., Rodriguez-Sinovas, A., Cabestrero, A., Ruiz-Meana, M., Gres, P., Konietzka, I., Lopez-Iglesias, C., Garcia-Dorado, D., Di Lisa, F., Heusch, G., Schulz, R., 2005. Connexin 43 in cardiomyocyte mitochondria and its increase by ischemic preconditioning. *Cardiovasc. Res.* 67, 234–244. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.04.014>
- Boersema, P.J., Aye, T.T., van Veen, T.A.B., Heck, A.J.R., Mohammed, S., 2008. Triplex protein quantification based on stable isotope labeling by peptide dimethylation applied to cell and tissue lysates. *Proteomics* 8, 4624–4632. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800297>
- Boersema, P.J., Raijmakers, R., Lemeer, S., Mohammed, S., Heck, A.J.R., 2009. Multiplex peptide stable isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics. *Nat. Protoc.* 4, 484–494. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.21>
- Borgatti, P., Martelli, A.M., Bellacosa, A., Casto, R., Massari, L., Capitani, S., Neri, L.M., 2000. Translocation of Akt/PKB to the nucleus of osteoblast-like MC3T3-E1 cells exposed to proliferative growth factors. *FEBS Lett.* 477, 27–32.
- Bozusic, L., Surucu, B., Hynx, D., Hemmings, B.A., 2008. PKBalpha/Akt1 acts downstream of DNA-PK in the DNA double-strand break response and promotes survival. *Mol. Cell* 30, 203–213. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.02.024>
- Brami-Cherrier, K., Valjent, E., Garcia, M., Pagès, C., Hipskind, R.A., Caboche, J., 2002. Dopamine induces a PI3-kinase-independent activation of Akt in striatal neurons: a new route to cAMP response element-binding protein phosphorylation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 8911–8921.
- Brazil, D.P., Hemmings, B.A., 2001. Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends Biochem. Sci.* 26, 657–664.
- Brewis, I.A., Brennan, P., 2010. Proteomics technologies for the global identification and quantification of proteins. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* 80, 1–44. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381264-3.00001-1>
- Brocheriou, V., Hagège, A.A., Oubenaïssa, A., Lambert, M., Mallet, V.O., Duriez, M., Wassef, M., Kahn, A., Menasché, P., Gilgenkrantz, H., 2000. Cardiac functional improvement by a human Bcl-2 transgene in a mouse model of ischemia/reperfusion injury. *J. Gene Med.* 2, 326–333. [https://doi.org/10.1002/1521-2254\(200009/10\)2:5<326::AID-JGM133>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/1521-2254(200009/10)2:5<326::AID-JGM133>3.0.CO;2-1)
- Brodbeck, D., Hill, M.M., Hemmings, B.A., 2001. Two splice variants of protein kinase B gamma have different regulatory capacity depending on the presence or absence of the regulatory phosphorylation site serine 472 in the carboxyl-terminal hydrophobic domain. *J. Biol. Chem.* 276, 29550–29558. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104633200>
- Brookes, P.S., Yoon, Y., Robotham, J.L., Anders, M.W., Sheu, S.-S., 2004. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 287, C817–833. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00139.2004>
- Bruckheimer, E.M., Cho, S.H., Sarkiss, M., Herrmann, J., McDonnell, T.J., 1998. The Bcl-2 gene family and apoptosis. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 62, 75–105.
- Calleja, V., Alcor, D., Laguerre, M., Park, J., Vojnovic, B., Hemmings, B.A., Downward, J., Parker, P.J., Larijani, B., 2007. Intramolecular and intermolecular interactions of protein kinase B define its activation in vivo. *PLoS Biol.* 5, e95. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050095>

- Calleja, V., Ameer-Beg, S.M., Vojnovic, B., Woscholski, R., Downward, J., Larijani, B., 2003. Monitoring conformational changes of proteins in cells by fluorescence lifetime imaging microscopy. *Biochem. J.* 372, 33–40. <https://doi.org/10.1042/BJ20030358>
- Calore, F., Genisset, C., Casellato, A., Rossato, M., Codolo, G., Esposti, M.D., Scorrano, L., de Bernard, M., 2010. Endosome-mitochondria juxtaposition during apoptosis induced by *H. pylori* VacA. *Cell Death Differ.* 17, 1707–1716. <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.42>
- Camara, A.K.S., Zhou, Y., Wen, P.-C., Tajkhorshid, E., Kwok, W.-M., 2017. Mitochondrial VDAC1: A Key Gatekeeper as Potential Therapeutic Target. *Front. Physiol.* 8, 460. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00460>
- Carel, K., Kummer, J.L., Schubert, C., Leitner, W., Heidenreich, K.A., Draznin, B., 1996. Insulin stimulates mitogen-activated protein kinase by a Ras-independent pathway in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 271, 30625–30630.
- Cavalier-Smith, T., 1987. The simultaneous symbiotic origin of mitochondria, chloroplasts, and microbodies. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 503, 55–71.
- Cerniglia, G.J., Dey, S., Gallagher-Colombo, S.M., Daurio, N.A., Tuttle, S., Busch, T.M., Lin, A., Sun, R., Esipova, T.V., Vinogradov, S.A., Denko, N., Koumenis, C., Maity, A., 2015. The PI3K/Akt Pathway Regulates Oxygen Metabolism via Pyruvate Dehydrogenase (PDH)-E1 α Phosphorylation. *Mol. Cancer Ther.* 14, 1928–1938. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-14-0888>
- Chandel, N.S., Schumacker, P.T., 2000. Cellular oxygen sensing by mitochondria: old questions, new insight. *J. Appl. Physiol.* Bethesda Md 1985 88, 1880–1889.
- Chen, W.S., Xu, P.Z., Gottlob, K., Chen, M.L., Sokol, K., Shiyanova, T., Roninson, I., Weng, W., Suzuki, R., Tobe, K., Kadowaki, T., Hay, N., 2001. Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene. *Genes Dev.* 15, 2203–2208. <https://doi.org/10.1101/gad.913901>
- Chen, Z., Chua, C.C., Ho, Y.S., Hamdy, R.C., Chua, B.H., 2001. Overexpression of Bcl-2 attenuates apoptosis and protects against myocardial I/R injury in transgenic mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 280, H2313-2320.
- Cheng, Z., Tseng, Y., White, M.F., 2010. Insulin signaling meets mitochondria in metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* TEM 21, 589–598. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2010.06.005>
- Chiara, F., Castellaro, D., Marin, O., Petronilli, V., Brusilow, W.S., Juhaszova, M., Sollott, S.J., Forte, M., Bernardi, P., Rasola, A., 2008. Hexokinase II detachment from mitochondria triggers apoptosis through the permeability transition pore independent of voltage-dependent anion channels. *PloS One* 3, e1852. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001852>
- Chiarugi, P., Cirri, P., 2003. Redox regulation of protein tyrosine phosphatases during receptor tyrosine kinase signal transduction. *Trends Biochem. Sci.* 28, 509–514. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(03\)00174-9](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(03)00174-9)
- Cho, H., Mu, J., Kim, J.K., Thorvaldsen, J.L., Chu, Q., Crenshaw, E.B., Kaestner, K.H., Bartolomei, M.S., Shulman, G.I., Birnbaum, M.J., 2001a. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science* 292, 1728–1731. <https://doi.org/10.1126/science.292.5522.1728>

- Cho, H., Thorvaldsen, J.L., Chu, Q., Feng, F., Birnbaum, M.J., 2001b. Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *J. Biol. Chem.* 276, 38349–38352. <https://doi.org/10.1074/jbc.C100462200>
- Chowdhury, I., Thompson, W.E., Thomas, K., 2014. Prohibitins role in cellular survival through Ras-Raf-MEK-ERK pathway. *J. Cell. Physiol.* 229, 998–1004. <https://doi.org/10.1002/jcp.24531>
- Coates, P.J., Jamieson, D.J., Smart, K., Prescott, A.R., Hall, P.A., 1997. The prohibitin family of mitochondrial proteins regulate replicative lifespan. *Curr. Biol. CB* 7, 607–610.
- Coffer, P.J., Woodgett, J.R., 1991. Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families. *Eur. J. Biochem. FEBS* 201, 475–481.
- Condorelli, G., Morisco, C., Stassi, G., Notte, A., Farina, F., Sgaramella, G., de Rienzo, A., Roncarati, R., Trimarco, B., Lembo, G., 1999. Increased cardiomyocyte apoptosis and changes in proapoptotic and antiapoptotic genes bax and bcl-2 during left ventricular adaptations to chronic pressure overload in the rat. *Circulation* 99, 3071–3078.
- Conrad, M., Jakupoglu, C., Moreno, S.G., Lippl, S., Banjac, A., Schneider, M., Beck, H., Hatzopoulos, A.K., Just, U., Sinowatz, F., Schmahl, W., Chien, K.R., Wurst, W., Bornkamm, G.W., Brielmeier, M., 2004. Essential role for mitochondrial thioredoxin reductase in hematopoiesis, heart development, and heart function. *Mol. Cell. Biol.* 24, 9414–9423. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.21.9414-9423.2004>
- Covian, R., Balaban, R.S., 2012. Cardiac mitochondrial matrix and respiratory complex protein phosphorylation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 303, H940-966. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00077.2012>
- Cox, J., Mann, M., 2008. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat. Biotechnol.* 26, 1367–1372. <https://doi.org/10.1038/nbt.1511>
- Das, S., Wong, R., Rajapakse, N., Murphy, E., Steenbergen, C., 2008. Glycogen synthase kinase 3 inhibition slows mitochondrial adenine nucleotide transport and regulates voltage-dependent anion channel phosphorylation. *Circ. Res.* 103, 983–991. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.178970>
- Das, T.P., Suman, S., Papu John, A.M.S., Pal, D., Edwards, A., Alatassi, H., Ankem, M.K., Damodaran, C., 2016. Activation of AKT negatively regulates the pro-apoptotic function of death-associated protein kinase 3 (DAPK3) in prostate cancer. *Cancer Lett.* 377, 134–139. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.04.028>
- Deng, N., Zhang, J., Zong, C., Wang, Yueju, Lu, H., Yang, P., Wang, W., Young, G.W., Wang, Yibin, Korge, P., Lotz, C., Doran, P., Liem, D.A., Apweiler, R., Weiss, J.N., Duan, H., Ping, P., 2011. Phosphoproteome analysis reveals regulatory sites in major pathways of cardiac mitochondria. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 10, M110.000117. <https://doi.org/10.1074/mcp.M110.000117>
- Deng, W., Leu, H.-B., Chen, Y., Chen, Y.-H., Epperson, C.M., Juang, C., Wang, P.H., 2014. Protein kinase B (PKB/AKT1) formed signaling complexes with mitochondrial proteins and prevented glycolytic energy dysfunction in cultured cardiomyocytes during ischemia-reperfusion injury. *Endocrinology* 155, 1618–1628. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1817>
- Denton, R.M., Richards, D.A., Chin, J.G., 1978. Calcium ions and the regulation of NAD⁺-linked isocitrate dehydrogenase from the mitochondria of rat heart and other tissues. *Biochem. J.* 176, 899–906.

- Di Maira, G., Salvi, M., Arrigoni, G., Marin, O., Sarno, S., Brustolon, F., Pinna, L.A., Ruzzene, M., 2005. Protein kinase CK2 phosphorylates and upregulates Akt/PKB. *Cell Death Differ.* 12, 668–677. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401604>
- Dong, W., Chao, M., Lu, Q., Chai, W., Zhang, W., Chen, X., Liang, E., Wang, L., Tian, H., Chen, Y., Zhang, M., 2016. Prohibitin overexpression improves myocardial function in diabetic cardiomyopathy. *Oncotarget* 7, 66–80. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6384>
- Du, K., Herzig, S., Kulkarni, R.N., Montminy, M., 2003. TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver. *Science* 300, 1574–1577. <https://doi.org/10.1126/science.1079817>
- Dummler, B., Hemmings, B.A., 2007. Physiological roles of PKB/Akt isoforms in development and disease. *Biochem. Soc. Trans.* 35, 231–235. <https://doi.org/10.1042/BST0350231>
- Easton, R.M., Cho, H., Roovers, K., Shineman, D.W., Mizrahi, M., Forman, M.S., Lee, V.M.-Y., Szabolcs, M., de Jong, R., Oltersdorf, T., Ludwig, T., Efstratiadis, A., Birnbaum, M.J., 2005. Role for Akt3/protein kinase Bgamma in attainment of normal brain size. *Mol. Cell. Biol.* 25, 1869–1878. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.5.1869-1878.2005>
- Elbaz-Alon, Y., Eisenberg-Bord, M., Shinder, V., Stiller, S.B., Shimoni, E., Wiedemann, N., Geiger, T., Schuldiner, M., 2015. Lam6 Regulates the Extent of Contacts between Organelles. *Cell Rep.* 12, 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.06.022>
- Eliuk, S., Makarov, A., 2015. Evolution of Orbitrap Mass Spectrometry Instrumentation. *Annu. Rev. Anal. Chem. Palo Alto Calif* 8, 61–80. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-071114-040325>
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., von Heijne, G., 2000. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J. Mol. Biol.* 300, 1005–1016. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3903>
- Embi, N., Rylatt, D.B., Cohen, P., 1980. Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *Eur. J. Biochem. FEBS* 107, 519–527.
- Evans, G.J.O., Barclay, J.W., Prescott, G.R., Jo, S.-R., Burgoyne, R.D., Birnbaum, M.J., Morgan, A., 2006. Protein kinase B/Akt is a novel cysteine string protein kinase that regulates exocytosis release kinetics and quantal size. *J. Biol. Chem.* 281, 1564–1572. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503628200>
- Facchinetti, V., Ouyang, W., Wei, H., Soto, N., Lazorchak, A., Gould, C., Lowry, C., Newton, A.C., Mao, Y., Miao, R.Q., Sessa, W.C., Qin, J., Zhang, P., Su, B., Jacinto, E., 2008. The mammalian target of rapamycin complex 2 controls folding and stability of Akt and protein kinase C. *EMBO J.* 27, 1932–1943. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.120>
- Fantel, A.G., Person, R.E., 2002. Involvement of mitochondria and other free radical sources in normal and abnormal fetal development. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 959, 424–433.
- Feng, J., Park, J., Cron, P., Hess, D., Hemmings, B.A., 2004. Identification of a PKB/Akt hydrophobic motif Ser-473 kinase as DNA-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 279, 41189–41196. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406731200>
- Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F., Whitehouse, C.M., 1989a. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 246, 64–71.
- Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F., Whitehouse, C.M., 1989b. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 246, 64–71.

- Fernández-Vizarra, E., Ferrín, G., Pérez-Martos, A., Fernández-Silva, P., Zeviani, M., Enriquez, J.A., 2010. Isolation of mitochondria for biogenetical studies: An update. *Mitochondrion* 10, 253–262. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2009.12.148>
- Fiol, C.J., Mahrenholz, A.M., Wang, Y., Roeske, R.W., Roach, P.J., 1987. Formation of protein kinase recognition sites by covalent modification of the substrate. Molecular mechanism for the synergistic action of casein kinase II and glycogen synthase kinase 3. *J. Biol. Chem.* 262, 14042–14048.
- Forner, F., Foster, L.J., Campanaro, S., Valle, G., Mann, M., 2006. Quantitative proteomic comparison of rat mitochondria from muscle, heart, and liver. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 5, 608–619. <https://doi.org/10.1074/mcp.M500298-MCP200>
- Foster, F.M., Traer, C.J., Abraham, S.M., Fry, M.J., 2003. The phosphoinositide (PI) 3-kinase family. *J. Cell Sci.* 116, 3037–3040. <https://doi.org/10.1242/jcs.00609>
- Franke, T.F., Kaplan, D.R., Cantley, L.C., Toker, A., 1997. Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science* 275, 665–668.
- Franke, A., Baris, O.R., Bergschneider, E., von Toerne, C., Hauck, S.M., Aichler, M., Walch, A.K., Wurst, W., Wiesner, R.J., Johnston, I.C.D., de Angelis, M.H., 2013. Efficient isolation of pure and functional mitochondria from mouse tissues using automated tissue disruption and enrichment with anti-TOM22 magnetic beads. *PloS One* 8, e82392. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082392>
- Frech, M., Andjelkovic, M., Ingley, E., Reddy, K.K., Falck, J.R., Hemmings, B.A., 1997. High affinity binding of inositol phosphates and phosphoinositides to the pleckstrin homology domain of RAC/protein kinase B and their influence on kinase activity. *J. Biol. Chem.* 272, 8474–8481.
- Frias, M.A., Thoreen, C.C., Jaffe, J.D., Schroder, W., Sculley, T., Carr, S.A., Sabatini, D.M., 2006. mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s. *Curr. Biol. CB* 16, 1865–1870. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.08.001>
- Gao, T., Furnari, F., Newton, A.C., 2005. PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Mol. Cell* 18, 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.03.008>
- García-Rivas, G. de J., Carvajal, K., Correa, F., Zazueta, C., 2006. Ru360, a specific mitochondrial calcium uptake inhibitor, improves cardiac post-ischæmic functional recovery in rats in vivo. *Br. J. Pharmacol.* 149, 829–837. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706932>
- 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., McNeish, J.D., Coleman, K.G., 2003. Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta. *J. Clin. Invest.* 112, 197–208. <https://doi.org/10.1172/JCI16885>
- Gibbs, C.L., 1978. Cardiac energetics. *Physiol. Rev.* 58, 174–254.
- Gomez, L., Paillard, M., Thibault, H., Derumeaux, G., Ovize, M., 2008. Inhibition of GSK3beta by postconditioning is required to prevent opening of the mitochondrial permeability transition pore during reperfusion. *Circulation* 117, 2761–2768. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.755066>
- Gonzalez, E., McGraw, T.E., 2009. The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell Cycle Georget. Tex* 8, 2502–2508.
- Gottlieb, R.A., Gustafsson, A.B., 2011. Mitochondrial turnover in the heart. *Biochim. Biophys. Acta* 1813, 1295–1301. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.11.017>

- Gray, M.W., 1992. The endosymbiont hypothesis revisited. *Int. Rev. Cytol.* 141, 233–357.
- Guertin, D.A., Stevens, D.M., Thoreen, C.C., Burds, A.A., Kalaany, N.Y., Moffat, J., Brown, M., Fitzgerald, K.J., Sabatini, D.M., 2006. Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1. *Dev. Cell* 11, 859–871. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.10.007>
- Gustafsson, A.B., Gottlieb, R.A., 2008. Heart mitochondria: gates of life and death. *Cardiovasc. Res.* 77, 334–343. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvm005>
- Gustafsson, A.B., Gottlieb, R.A., 2007. Bcl-2 family members and apoptosis, taken to heart. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 292, C45–51. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00229.2006>
- Gustafsson, A.B., Tsai, J.G., Logue, S.E., Crow, M.T., Gottlieb, R.A., 2004. Apoptosis repressor with caspase recruitment domain protects against cell death by interfering with Bax activation. *J. Biol. Chem.* 279, 21233–21238. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400695200>
- Halaby, M.-J., Hibma, J.C., He, J., Yang, D.-Q., 2008. ATM protein kinase mediates full activation of Akt and regulates glucose transporter 4 translocation by insulin in muscle cells. *Cell. Signal.* 20, 1555–1563. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2008.04.011>
- Hamacher-Brady, A., Brady, N.R., Logue, S.E., Sayen, M.R., Jinno, M., Kirshenbaum, L.A., Gottlieb, R.A., Gustafsson, A.B., 2007. Response to myocardial ischemia/reperfusion injury involves Bnip3 and autophagy. *Cell Death Differ.* 14, 146–157. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401936>
- Han, E.K.-H., Levenson, J.D., McGonigal, T., Shah, O.J., Woods, K.W., Hunter, T., Giranda, V.L., Luo, Y., 2007. Akt inhibitor A-443654 induces rapid Akt Ser-473 phosphorylation independent of mTORC1 inhibition. *Oncogene* 26, 5655–5661. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210343>
- Han, E.K.-H., McGonigal, T., Butler, C., Giranda, V.L., Luo, Y., 2008. Characterization of Akt overexpression in MiaPaCa-2 cells: prohibitin is an Akt substrate both in vitro and in cells. *Anticancer Res.* 28, 957–963.
- Hanada, M., Feng, J., Hemmings, B.A., 2004. Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target. *Biochim. Biophys. Acta* 1697, 3–16. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2003.11.009>
- Hayashi, H., Tsuchiya, Y., Nakayama, K., Satoh, T., Nishida, E., 2008. Down-regulation of the PI3-kinase/Akt pathway by ERK MAP kinase in growth factor signaling. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* 13, 941–947. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2008.01218.x>
- Heineman, F.W., Balaban, R.S., 1990. Control of mitochondrial respiration in the heart in vivo. *Annu. Rev. Physiol.* 52, 523–542. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.52.030190.002515>
- Hirota, S., Zhai, P., Tomita, H., Galeotti, J., Marquez, J.P., Gao, S., Hong, C., Yatani, A., Avila, J., Sadoshima, J., 2007. Inhibition of glycogen synthase kinase 3beta during heart failure is protective. *Circ. Res.* 101, 1164–1174. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.160614>
- Hochhauser, E., Kivity, S., Offen, D., Maulik, N., Otani, H., Barhum, Y., Pannet, H., Shneyvays, V., Shainberg, A., Goldshtaub, V., Tobar, A., Vidne, B.A., 2003. Bax ablation protects against myocardial ischemia-reperfusion injury in transgenic mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 284, H2351–2359. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00783.2002>
- Hoess, R.H., Ziese, M., Sternberg, N., 1982. P1 site-specific recombination: nucleotide sequence of the recombining sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 3398–3402.
- Holmuhamedov, E.L., Ozcan, C., Jahangir, A., Terzic, A., 2001. Restoration of Ca²⁺-inhibited

- oxidative phosphorylation in cardiac mitochondria by mitochondrial Ca²⁺ unloading. *Mol. Cell. Biochem.* 220, 135–140.
- Hornig-Do, H.-T., Günther, G., Bust, M., Lehnartz, P., Bosio, A., Wiesner, R.J., 2009. Isolation of functional pure mitochondria by superparamagnetic microbeads. *Anal. Biochem.* 389, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.02.040>
- Hoshi, M., Takashima, A., Noguchi, K., Murayama, M., Sato, M., Kondo, S., Saitoh, Y., Ishiguro, K., Hoshino, T., Imahori, K., 1996. Regulation of mitochondrial pyruvate dehydrogenase activity by tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3 β in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 2719–2723.
- Hresko, R.C., Mueckler, M., 2005. mTOR.RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/protein kinase B in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 280, 40406–40416. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508361200>
- Huang, J.-P., Huang, S.-S., Deng, J.-Y., 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. *J. Biomed. Sci.* 16, 77. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-16-77>
- Huber, M., Helgason, C.D., Damen, J.E., Scheid, M., Duronio, V., Liu, L., Ware, M.D., Humphries, R.K., Krystal, G., 1999. The role of SHIP in growth factor induced signalling. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 71, 423–434.
- Hunter, T., 1995. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 80, 225–236.
- Huss, J.M., Kelly, D.P., 2005. Mitochondrial energy metabolism in heart failure: a question of balance. *J. Clin. Invest.* 115, 547–555. <https://doi.org/10.1172/JCI24405>
- Huttlin, E.L., Jedrychowski, M.P., Elias, J.E., Goswami, T., Rad, R., Beausoleil, S.A., Villén, J., Haas, W., Sowa, M.E., Gygi, S.P., 2010. A tissue-specific atlas of mouse protein phosphorylation and expression. *Cell* 143, 1174–1189. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.12.001>
- Ikeda, Y., Shirakabe, A., Brady, C., Zablocki, D., Ohishi, M., Sadoshima, J., 2015. Molecular mechanisms mediating mitochondrial dynamics and mitophagy and their functional roles in the cardiovascular system. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 78C, 116–122. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.09.019>
- Illario, M., Monaco, S., Cavallo, A.L., Esposito, I., Formisano, P., D'Andrea, L., Cipolletta, E., Trimarco, B., Fenzi, G., Rossi, G., Vitale, M., 2009. Calcium-calmodulin-dependent kinase II (CaMKII) mediates insulin-stimulated proliferation and glucose uptake. *Cell. Signal.* 21, 786–792. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2009.01.022>
- Imahashi, K., Schneider, M.D., Steenbergen, C., Murphy, E., 2004. Transgenic expression of Bcl-2 modulates energy metabolism, prevents cytosolic acidification during ischemia, and reduces ischemia/reperfusion injury. *Circ. Res.* 95, 734–741. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000143898.67182.4c>
- Jacinto, E., Facchinetti, V., Liu, D., Soto, N., Wei, S., Jung, S.Y., Huang, Q., Qin, J., Su, B., 2006. SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell* 127, 125–137. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.08.033>
- Jacobson, J., Duchon, M.R., 2004. Interplay between mitochondria and cellular calcium signalling. *Mol. Cell. Biochem.* 256–257, 209–218.

- Jahn, T., Seipel, P., Urschel, S., Peschel, C., Duyster, J., 2002. Role for the adaptor protein Grb10 in the activation of Akt. *Mol. Cell. Biol.* 22, 979–991.
- James, S.R., Downes, C.P., Gigg, R., Grove, S.J., Holmes, A.B., Alessi, D.R., 1996. Specific binding of the Akt-1 protein kinase to phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate without subsequent activation. *Biochem. J.* 315 (Pt 3), 709–713.
- Jiang, L., Dong, P., Zhang, Z., Li, C., Li, Y., Liao, Y., Li, X., Wu, Z., Guo, S., Mai, S., Xie, D., Liu, Z., Zhou, F., 2015. Akt phosphorylates Prohibitin 1 to mediate its mitochondrial localization and promote proliferation of bladder cancer cells. *Cell Death Dis.* 6, e1660. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.40>
- Jiang, Z.Y., Zhou, Q.L., Coleman, K.A., Chouinard, M., Boese, Q., Czech, M.P., 2003. Insulin signaling through Akt/protein kinase B analyzed by small interfering RNA-mediated gene silencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 7569–7574. <https://doi.org/10.1073/pnas.1332633100>
- Jonckheere, A.I., Smeitink, J.A.M., Rodenburg, R.J.T., 2012. Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. *J. Inherit. Metab. Dis.* 35, 211–225. <https://doi.org/10.1007/s10545-011-9382-9>
- Jones, P.F., Jakubowicz, T., Pitossi, F.J., Maurer, F., Hemmings, B.A., 1991. Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 4171–4175.
- Jouaville, L.S., Pinton, P., Bastianutto, C., Rutter, G.A., Rizzuto, R., 1999. Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: evidence for a long-term metabolic priming. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 13807–13812.
- Juhaszova, M., Zorov, D.B., Kim, S.-H., Pepe, S., Fu, Q., Fishbein, K.W., Ziman, B.D., Wang, S., Ytrehus, K., Antos, C.L., Olson, E.N., Sollott, S.J., 2004. Glycogen synthase kinase-3 β mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *J. Clin. Invest.* 113, 1535–1549. <https://doi.org/10.1172/JCI19906>
- Juraschek, R., Dülcks, T., Karas, M., 1999. Nanoelectrospray--more than just a minimized-flow electrospray ionization source. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 10, 300–308. [https://doi.org/10.1016/S1044-0305\(98\)00157-3](https://doi.org/10.1016/S1044-0305(98)00157-3)
- Kawakami, Y., Nishimoto, H., Kitaura, J., Maeda-Yamamoto, M., Kato, R.M., Littman, D.R., Leitges, M., Rawlings, D.J., Kawakami, T., 2004. Protein kinase C β II regulates Akt phosphorylation on Ser-473 in a cell type- and stimulus-specific fashion. *J. Biol. Chem.* 279, 47720–47725. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408797200>
- Kay, L., Li, Z., Mericskay, M., Olivares, J., Tranqui, L., Fontaine, E., Tiivel, T., Sikk, P., Kaambre, T., Samuel, J.L., Rappaport, L., Usson, Y., Leverve, X., Paulin, D., Saks, V.A., 1997. Study of regulation of mitochondrial respiration in vivo. An analysis of influence of ADP diffusion and possible role of cytoskeleton. *Biochim. Biophys. Acta* 1322, 41–59.
- Keranen, L.M., Dutil, E.M., Newton, A.C., 1995. Protein kinase C is regulated in vivo by three functionally distinct phosphorylations. *Curr. Biol.* CB 5, 1394–1403.
- Kimura, K.D., Tissenbaum, H.A., Liu, Y., Ruvkun, G., 1997. *daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 277, 942–946.
- Knighton, D.R., Zheng, J.H., Ten Eyck, L.F., Ashford, V.A., Xuong, N.H., Taylor, S.S., Sowadski, J.M., 1991. Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* 253, 407–414.

- Konishi, H., Kuroda, S., Tanaka, M., Matsuzaki, H., Ono, Y., Kameyama, K., Haga, T., Kikkawa, U., 1995. Molecular cloning and characterization of a new member of the RAC protein kinase family: association of the pleckstrin homology domain of three types of RAC protein kinase with protein kinase C subspecies and beta gamma subunits of G proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 216, 526–534.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., Sonnhammer, E.L., 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* 305, 567–580. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4315>
- Kulisz, A., Chen, N., Chandel, N.S., Shao, Z., Schumacker, P.T., 2002. Mitochondrial ROS initiate phosphorylation of p38 MAP kinase during hypoxia in cardiomyocytes. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 282, L1324–L1329. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00326.2001>
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lai, H.-C., Liu, T.-J., Ting, C.-T., Sharma, P.M., Wang, P.H., 2003. Insulin-like growth factor-1 prevents loss of electrochemical gradient in cardiac muscle mitochondria via activation of PI 3 kinase/Akt pathway. *Mol. Cell. Endocrinol.* 205, 99–106.
- Laine, J., Künstle, G., Obata, T., Sha, M., Noguchi, M., 2000. The protooncogene TCL1 is an Akt kinase coactivator. *Mol. Cell* 6, 395–407.
- Lamb, H.J., Beyerbacht, H.P., van der Laarse, A., Stoel, B.C., Doornbos, J., van der Wall, E.E., de Roos, A., 1999. Diastolic dysfunction in hypertensive heart disease is associated with altered myocardial metabolism. *Circulation* 99, 2261–2267.
- Laustsen, P.G., Russell, S.J., Cui, L., Entingh-Pearsall, A., Holzenberger, M., Liao, R., Kahn, C.R., 2007. Essential role of insulin and insulin-like growth factor 1 receptor signaling in cardiac development and function. *Mol. Cell. Biol.* 27, 1649–1664. <https://doi.org/10.1128/MCB.01110-06>
- Lee, S.B., Kwon, I.-S., Park, J., Lee, K.-H., Ahn, Y., Lee, C., Kim, J., Choi, S.Y., Cho, S.-W., Ahn, J.-Y., 2010. Ribosomal protein S3, a new substrate of Akt, serves as a signal mediator between neuronal apoptosis and DNA repair. *J. Biol. Chem.* 285, 29457–29468. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.131367>
- Lewandrowski, U., Sickmann, A., Cesaro, L., Brunati, A.M., Toninello, A., Salvi, M., 2008. Identification of new tyrosine phosphorylated proteins in rat brain mitochondria. *FEBS Lett.* 582, 1104–1110. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.02.077>
- Li, L., Yao, Y.-C., Gu, X.-Q., Che, D., Ma, C.-Q., Dai, Z.-Y., Li, C., Zhou, T., Cai, W.-B., Yang, Z.-H., Yang, X., Gao, G.-Q., 2014. Plasminogen kringle 5 induces endothelial cell apoptosis by triggering a voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1) positive feedback loop. *J. Biol. Chem.* 289, 32628–32638. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.567792>
- Linding, R., Jensen, L.J., Ostheimer, G.J., van Vugt, M.A.T.M., Jørgensen, C., Miron, I.M., Diella, F., Colwill, K., Taylor, L., Elder, K., Metalnikov, P., Nguyen, V., Pasculescu, A., Jin, J., Park, J.G.,
- Samson, L.D., Woodgett, J.R., Russell, R.B., Bork, P., Yaffe, M.B., Pawson, T., 2007. Systematic discovery of in vivo phosphorylation networks. *Cell* 129, 1415–1426. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.052>

- Ling, H.-Y., Ou, H.-S., Feng, S.-D., Zhang, X.-Y., Tuo, Q.-H., Chen, L.-X., Zhu, B.-Y., Gao, Z.-P., Tang, C.-K., Yin, W.-D., Zhang, L., Liao, D.-F., 2009. CHANGES IN microRNA (miR) profile and effects of miR-320 in insulin-resistant 3T3-L1 adipocytes. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 36, e32-39. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2009.05207.x>
- Littlewood, T.D., Hancock, D.C., Danielian, P.S., Parker, M.G., Evan, G.I., 1995. A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins. *Nucleic Acids Res.* 23, 1686–1690.
- Luo, Y., Shoemaker, A.R., Liu, X., Woods, K.W., Thomas, S.A., de Jong, R., Han, E.K., Li, T., Stoll, V.S., Powlas, J.A., Oleksijew, A., Mitten, M.J., Shi, Y., Guan, R., McGonigal, T.P., Klinghofer, V., Johnson, E.F., Levenson, J.D., Bouska, J.J., Mamo, M., Smith, R.A., Gramling-Evans, E.E., Zinker, B.A., Mika, A.K., Nguyen, P.T., Oltersdorf, T., Rosenberg, S.H., Li, Q., Giranda, V.L., 2005. Potent and selective inhibitors of Akt kinases slow the progress of tumors in vivo. *Mol. Cancer Ther.* 4, 977–986. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-05-0005>
- Mackenzie, L., Roderick, H.L., Berridge, M.J., Conway, S.J., Bootman, M.D., 2004. The spatial pattern of atrial cardiomyocyte calcium signalling modulates contraction. *J. Cell Sci.* 117, 6327–6337. <https://doi.org/10.1242/jcs.01559>
- Maira, S.M., Galetic, I., Brazil, D.P., Kaech, S., Ingley, E., Thelen, M., Hemmings, B.A., 2001. Carboxyl-terminal modulator protein (CTMP), a negative regulator of PKB/Akt and v-Akt at the plasma membrane. *Science* 294, 374–380. <https://doi.org/10.1126/science.1062030>
- Makarov, null, 2000. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. *Anal. Chem.* 72, 1156–1162.
- Makarov, A., Denisov, E., Kholomeev, A., Balschun, W., Lange, O., Strupat, K., Horning, S., 2006. Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer. *Anal. Chem.* 78, 2113–2120. <https://doi.org/10.1021/ac0518811>
- Manning, B.D., Cantley, L.C., 2007. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129, 1261–1274. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.009>
- Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T., Sudarsanam, S., 2002. The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298, 1912–1934. <https://doi.org/10.1126/science.1075762>
- Marín-García, J., Goldenthal, M.J., 2004. Heart mitochondria signaling pathways: appraisal of an emerging field. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 82, 565–578. <https://doi.org/10.1007/s00109-004-0567-7>
- Marín-García, J., Goldenthal, M.J., 2002. Understanding the impact of mitochondrial defects in cardiovascular disease: a review. *J. Card. Fail.* 8, 347–361.
- McBride, H.M., Neuspiel, M., Wasiak, S., 2006. Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr. Biol.* 16, R551-560. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.06.054>
- McCormack, J.G., Halestrap, A.P., Denton, R.M., 1990. Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. *Physiol. Rev.* 70, 391–425.
- Meier, R., Alessi, D.R., Cron, P., Andjelković, M., Hemmings, B.A., 1997. Mitogenic activation, phosphorylation, and nuclear translocation of protein kinase B β . *J. Biol. Chem.* 272, 30491–30497.
- Milburn, C.C., Deak, M., Kelly, S.M., Price, N.C., Alessi, D.R., Van Aalten, D.M.F., 2003. Binding of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate to the pleckstrin homology domain of protein kinase B induces a conformational change. *Biochem. J.* 375, 531–538. <https://doi.org/10.1042/BJ20031229>

- Mishra, S., Murphy, L.C., Murphy, L.J., 2006. The Prohibitins: emerging roles in diverse functions. *J. Cell. Mol. Med.* 10, 353–363.
- Mishra, S., Murphy, L.C., Nyomba, B.L.G., Murphy, L.J., 2005. Prohibitin: a potential target for new therapeutics. *Trends Mol. Med.* 11, 192–197. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2005.02.004>
- Miyamoto, S., Howes, A.L., Adams, J.W., Dorn, G.W., Brown, J.H., 2005. Ca²⁺ dysregulation induces mitochondrial depolarization and apoptosis: role of Na⁺/Ca²⁺ exchanger and AKT. *J. Biol. Chem.* 280, 38505–38512. <https://doi.org/10.1074/jbc.M505223200>
- Miyamoto, S., Murphy, A.N., Brown, J.H., 2009a. Akt mediated mitochondrial protection in the heart: metabolic and survival pathways to the rescue. *J. Bioenerg. Biomembr.* 41, 169–180. <https://doi.org/10.1007/s10863-009-9205-y>
- Miyamoto, S., Murphy, A.N., Brown, J.H., 2008. Akt mediates mitochondrial protection in cardiomyocytes through phosphorylation of mitochondrial hexokinase-II. *Cell Death Differ.* 15, 521–529. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402285>
- Miyamoto, S., Rubio, M., Sussman, M.A., 2009b. Nuclear and mitochondrial signalling Akt in cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.* 82, 272–285. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp087>
- Molkentin, J.D., Robbins, J., 2009. With great power comes great responsibility: using mouse genetics to study cardiac hypertrophy and failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 46, 130–136. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2008.09.002>
- Monteiro, H.P., Stern, A., 1996. Redox modulation of tyrosine phosphorylation-dependent signal transduction pathways. *Free Radic. Biol. Med.* 21, 323–333.
- Mootha, V.K., Bunkenborg, J., Olsen, J.V., Hjerrild, M., Wisniewski, J.R., Stahl, E., Bolouri, M.S., Ray, H.N., Sihag, S., Kamal, M., Patterson, N., Lander, E.S., Mann, M., 2003. Integrated analysis of protein composition, tissue diversity, and gene regulation in mouse mitochondria. *Cell* 115, 629–640.
- Nascimben, L., Ingwall, J.S., Pauletto, P., Friedrich, J., Gwathmey, J.K., Saks, V., Pessina, A.C., Allen, P.D., 1996. Creatine kinase system in failing and nonfailing human myocardium. *Circulation* 94, 1894–1901.
- Neely, J.R., Rovetto, M.J., Oram, J.F., 1972. Myocardial utilization of carbohydrate and lipids. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 15, 289–329.
- Nelson, A.C., Lyons, T.R., Young, C.D., Hansen, K.C., Anderson, S.M., Holt, J.T., 2010. AKT regulates BRCA1 stability in response to hormone signaling. *Mol. Cell. Endocrinol.* 319, 129–142. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.01.019>
- Neubauer, S., 2007. The failing heart--an engine out of fuel. *N. Engl. J. Med.* 356, 1140–1151. <https://doi.org/10.1056/NEJMra063052>
- Neubauer, S., Horn, M., Pabst, T., Gödde, M., Lübke, D., Jilling, B., Hahn, D., Ertl, G., 1995. Contributions of ³¹P-magnetic resonance spectroscopy to the understanding of dilated heart muscle disease. *Eur. Heart J.* 16 Suppl O, 115–118.
- Nguyen, S., Fenn, J.B., 2007. Gas-phase ions of solute species from charged droplets of solutions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 1111–1117. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609969104>

Nijtmans, L.G.J., Artal, S.M., Grivell, L.A., Coates, P.J., 2002. The mitochondrial PHB complex: roles in mitochondrial respiratory complex assembly, ageing and degenerative disease. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 59, 143–155.

Ohsakaya, S., Fujikawa, M., Hisabori, T., Yoshida, M., 2011. Knockdown of DAPIT (diabetes-associated protein in insulin-sensitive tissue) results in loss of ATP synthase in mitochondria. *J. Biol. Chem.* 286, 20292–20296. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.198523>

Olivetti, G., Abbi, R., Quaini, F., Kajstura, J., Cheng, W., Nitahara, J.A., Quaini, E., Di Loreto, C., Beltrami, C.A., Krajewski, S., Reed, J.C., Anversa, P., 1997. Apoptosis in the failing human heart. *N. Engl. J. Med.* 336, 1131–1141. <https://doi.org/10.1056/NEJM199704173361603>

Olsen, J.V., Blagoev, B., Gnäd, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P., Mann, M., 2006. Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* 127, 635–648. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.026>

Olsen, J.V., de Godoy, L.M.F., Li, G., Macek, B., Mortensen, P., Pesch, R., Makarov, A., Lange, O., Horning, S., Mann, M., 2005. Parts per million mass accuracy on an Orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 4, 2010–2021. <https://doi.org/10.1074/mcp.T500030-MCP200>

Ong, S.-E., Mann, M., 2005. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. *Nat. Chem. Biol.* 1, 252–262. <https://doi.org/10.1038/nchembio736>

Page, E., McCallister, L.P., 1973. Quantitative electron microscopic description of heart muscle cells. Application to normal, hypertrophied and thyroxin-stimulated hearts. *Am. J. Cardiol.* 31, 172–181.

Paramio, J.M., Segrelles, C., Ruiz, S., Jorcano, J.L., 2001. Inhibition of protein kinase B (PKB) and PKC ζ mediates keratin K10-induced cell cycle arrest. *Mol. Cell. Biol.* 21, 7449–7459. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.21.7449-7459.2001>

Parrella, E., Longo, V.D., 2010. Insulin/IGF-I and related signaling pathways regulate aging in nondividing cells: from yeast to the mammalian brain. *ScientificWorldJournal* 10, 161–177. <https://doi.org/10.1100/tsw.2010.8>

Pearson, R.B., Dennis, P.B., Han, J.W., Williamson, N.A., Kozma, S.C., Wettenhall, R.E., Thomas, G., 1995. The principal target of rapamycin-induced p70s6k inactivation is a novel phosphorylation site within a conserved hydrophobic domain. *EMBO J.* 14, 5279–5287.

Pekarsky, Y., Koval, A., Hallas, C., Bichi, R., Tresini, M., Malstrom, S., Russo, G., Tsihchlis, P., Croce, C.M., 2000. Tc11 enhances Akt kinase activity and mediates its nuclear translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 3028–3033. <https://doi.org/10.1073/pnas.040557697>

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., Hay, N., 2003. Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2. *Genes Dev.* 17, 1352–1365. <https://doi.org/10.1101/gad.1089403>

Penny, C.J., Kilpatrick, B.S., Eden, E.R., Patel, S., 2015. Coupling acidic organelles with the ER through Ca²⁺ microdomains at membrane contact sites. *Cell Calcium* 58, 387–396. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2015.03.006>

Perry, R.H., Cooks, R.G., Noll, R.J., 2008. Orbitrap mass spectrometry: instrumentation, ion motion and applications. *Mass Spectrom. Rev.* 27, 661–699. <https://doi.org/10.1002/mas.20186>

- Persad, S., Attwell, S., Gray, V., Delcommenne, M., Troussard, A., Sanghera, J., Dedhar, S., 2000. Inhibition of integrin-linked kinase (ILK) suppresses activation of protein kinase B/Akt and induces cell cycle arrest and apoptosis of PTEN-mutant prostate cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 3207–3212. <https://doi.org/10.1073/pnas.060579697>
- Peterson, R.T., Schreiber, S.L., 1999. Kinase phosphorylation: Keeping it all in the family. *Curr. Biol.* CB 9, R521-524.
- Pierce, G.N., Dhalla, N.S., 1985. Heart mitochondrial function in chronic experimental diabetes in rats. *Can. J. Cardiol.* 1, 48–54.
- Pinton, P., Brini, M., Bastianutto, C., Tuft, R.A., Pozzan, T., Rizzuto, R., 1998. New light on mitochondrial calcium. *BioFactors Oxf. Engl.* 8, 243–253.
- Piper, P.W., Jones, G.W., Bringloe, D., Harris, N., MacLean, M., Mollapour, M., 2002. The shortened replicative life span of prohibitin mutants of yeast appears to be due to defective mitochondrial segregation in old mother cells. *Aging Cell* 1, 149–157.
- Plas, D.R., Talapatra, S., Edinger, A.L., Rathmell, J.C., Thompson, C.B., 2001. Akt and Bcl-xL promote growth factor-independent survival through distinct effects on mitochondrial physiology. *J. Biol. Chem.* 276, 12041–12048. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010551200>
- Poston, C.N., Krishnan, S.C., Bazemore-Walker, C.R., 2013. In-depth proteomic analysis of mammalian mitochondria-associated membranes (MAM). *J. Proteomics* 79, 219–230. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.12.018>
PubMed entry, n.d.
- Qian, W.-J., Liu, T., Monroe, M.E., Strittmatter, E.F., Jacobs, J.M., Kangas, L.J., Petritis, K., Camp, D.G., Smith, R.D., 2005. Probability-based evaluation of peptide and protein identifications from tandem mass spectrometry and SEQUEST analysis: the human proteome. *J. Proteome Res.* 4, 53–62. <https://doi.org/10.1021/pr0498638>
- Raimundo, N., 2014. Mitochondrial pathology: stress signals from the energy factory. *Trends Mol. Med.* 20, 282–292. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.01.005>
- Rajalingam, K., Rudel, T., 2005. Ras-Raf signaling needs prohibitin. *Cell Cycle Georget. Tex* 4, 1503–1505. <https://doi.org/10.4161/cc.4.11.2142>
- Rane, M.J., Pan, Y., Singh, S., Powell, D.W., Wu, R., Cummins, T., Chen, Q., McLeish, K.R., Klein, J.B., 2003. Heat shock protein 27 controls apoptosis by regulating Akt activation. *J. Biol. Chem.* 278, 27828–27835. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303417200>
- Reinartz, M., Raupach, A., Kaisers, W., Gödecke, A., 2014a. AKT1 and AKT2 induce distinct phosphorylation patterns in HL-1 cardiac myocytes. *J. Proteome Res.* 13, 4232–4245. <https://doi.org/10.1021/pr500131g>
- Reinartz, M., Raupach, A., Kaisers, W., Gödecke, A., 2014b. AKT1 and AKT2 induce distinct phosphorylation patterns in HL-1 cardiac myocytes. *J. Proteome Res.* 13, 4232–4245. <https://doi.org/10.1021/pr500131g>
- Richly, E., Chinnery, P.F., Leister, D., 2003. Evolutionary diversification of mitochondrial proteomes: implications for human disease. *Trends Genet. TIG* 19, 356–362. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(03\)00137-9](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(03)00137-9)
- Riehle, C., Abel, E.D., 2016. Insulin Signaling and Heart Failure. *Circ. Res.* 118, 1151–1169. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.306206>

Rizzuto, R., Bernardi, P., Pozzan, T., 2000. Mitochondria as all-round players of the calcium game. *J. Physiol.* 529 Pt 1, 37–47.

Rizzuto, R., Brini, M., Murgia, M., Pozzan, T., 1993. Microdomains with high Ca^{2+} close to IP₃-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science* 262, 744–747.

Rizzuto, R., Pinton, P., Carrington, W., Fay, F.S., Fogarty, K.E., Lifshitz, L.M., Tuft, R.A., Pozzan, T., 1998a. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca^{2+} responses. *Science* 280, 1763–1766.

Roepstorff, P., Fohlman, J., 1984. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed. Mass Spectrom.* 11, 601. <https://doi.org/10.1002/bms.1200111109>

Rosca, M.G., Hoppel, C.L., 2010. Mitochondria in heart failure. *Cardiovasc. Res.* 88, 40–50. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq240>

Rostovtseva, T.K., Sheldon, K.L., Hassanzadeh, E., Monge, C., Saks, V., Bezrukov, S.M., Sackett, D.L., 2008. Tubulin binding blocks mitochondrial voltage-dependent anion channel and regulates respiration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 18746–18751.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0806303105>

Rubler, S., Dlugash, J., Yuceoglu, Y.Z., Kumral, T., Branwood, A.W., Grishman, A., 1972. New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis. *Am. J. Cardiol.* 30, 595–602.

Ruby, J.R., Dyer, R.F., Skalko, R.G., 1969. Continuities between mitochondria and endoplasmic reticulum in the mammalian ovary. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. Vienna Austria* 1948 97, 30–37.

Saks, V., Dzeja, P., Schlattner, U., Vendelin, M., Terzic, A., Wallimann, T., 2006. Cardiac system bioenergetics: metabolic basis of the Frank-Starling law. *J. Physiol.* 571, 253–273.

<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.101444>

Salas, T.R., Reddy, S.A., Clifford, J.L., Davis, R.J., Kikuchi, A., Lippman, S.M., Menter, D.G., 2003. Alleviating the suppression of glycogen synthase kinase-3 β by Akt leads to the phosphorylation of cAMP-response element-binding protein and its transactivation in intact cell nuclei. *J. Biol. Chem.* 278, 41338–41346. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302972200>

Sánchez-Quiles, V., Segura, V., Bigaud, E., He, B., O'Malley, B.W., Santamaría, E., Prieto, J., Corrales, F.J., 2012. Prohibitin-1 deficiency promotes inflammation and increases sensitivity to liver injury. *J. Proteomics* 75, 5783–5792. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.08.009>

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

<https://doi.org/10.1126/science.1106148>

Sato, S., Fujita, N., Tsuruo, T., 2000. Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 10832–10837. <https://doi.org/10.1073/pnas.170276797>

Scherl, A., Shaffer, S.A., Taylor, G.K., Hernandez, P., Appel, R.D., Binz, P.-A., Goodlett, D.R., 2008. On the benefits of acquiring peptide fragment ions at high measured mass accuracy. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 19, 891–901. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2008.02.005>

Scheuermann-Freestone, M., Madsen, P.L., Manners, D., Blamire, A.M., Buckingham, R.E., Styles, P., Radda, G.K., Neubauer, S., Clarke, K., 2003. Abnormal cardiac and skeletal muscle energy metabolism in patients with type 2 diabetes. *Circulation* 107, 3040–3046.

<https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000072789.89096.10>

- Schultze, S.M., Jensen, J., Hemmings, B.A., Tschopp, O., Niessen, M., 2011. Promiscuous affairs of PKB/AKT isoforms in metabolism. *Arch. Physiol. Biochem.* 117, 70–77. <https://doi.org/10.3109/13813455.2010.539236>
- Schwarz, K., Siddiqi, N., Singh, S., Neil, C.J., Dawson, D.K., Frenneaux, M.P., 2014. The breathing heart - mitochondrial respiratory chain dysfunction in cardiac disease. *Int. J. Cardiol.* 171, 134–143. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2013.12.014>
- Scigelova, M., Makarov, A., 2006. Orbitrap mass analyzer--overview and applications in proteomics. *Proteomics* 6 Suppl 2, 16–21. <https://doi.org/10.1002/pmic.200600528>
- Seo, J., Lee, K.-J., 2004. Post-translational modifications and their biological functions: proteomic analysis and systematic approaches. *J. Biochem. Mol. Biol.* 37, 35–44.
- Shen, W., Asai, K., Uechi, M., Mathier, M.A., Shannon, R.P., Vatner, S.F., Ingwall, J.S., 1999. Progressive loss of myocardial ATP due to a loss of total purines during the development of heart failure in dogs: a compensatory role for the parallel loss of creatine. *Circulation* 100, 2113–2118.
- Shiota, C., Woo, J.-T., Lindner, J., Shelton, K.D., Magnuson, M.A., 2006. Multiallelic disruption of the rictor gene in mice reveals that mTOR complex 2 is essential for fetal growth and viability. *Dev. Cell* 11, 583–589. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.08.013>
- Shoshan-Barmatz, V., Ben-Hail, D., 2012. VDAC, a multi-functional mitochondrial protein as a pharmacological target. *Mitochondrion* 12, 24–34. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2011.04.001>
- Sidhu, S., Gangasani, A., Korotchkina, L.G., Suzuki, G., Fallavollita, J.A., Canty, J.M., Patel, M.S., 2008. Tissue-specific pyruvate dehydrogenase complex deficiency causes cardiac hypertrophy and sudden death of weaned male mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 295, H946–H952. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00363.2008>
- Skommer, J., Wlodkowic, D., Deptala, A., 2007. Larger than life: Mitochondria and the Bcl-2 family. *Leuk. Res.* 31, 277–286. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2006.06.027>
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76–85.
- Snabaitis, A.K., Cuello, F., Avkiran, M., 2008. Protein kinase B/Akt phosphorylates and inhibits the cardiac Na⁺/H⁺ exchanger NHE1. *Circ. Res.* 103, 881–890. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.175877>
- Sohal, D.S., Nghiem, M., Crackower, M.A., Witt, S.A., Kimball, T.R., Tymitz, K.M., Penninger, J.M., Molkentin, J.D., 2001. Temporally regulated and tissue-specific gene manipulations in the adult and embryonic heart using a tamoxifen-inducible Cre protein. *Circ. Res.* 89, 20–25.
- Sommercorn, J., Mulligan, J.A., Lozeman, F.J., Krebs, E.G., 1987. Activation of casein kinase II in response to insulin and to epidermal growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 8834–8838.
- Staal, S.P., Hartley, J.W., Rowe, W.P., 1977. Isolation of transforming murine leukemia viruses from mice with a high incidence of spontaneous lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 3065–3067.
- Stambolic, V., Suzuki, A., de la Pompa, J.L., Brothers, G.M., Mirtsos, C., Sasaki, T., Ruland, J., Penninger, J.M., Siderovski, D.P., Mak, T.W., 1998. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* 95, 29–39.

- Stanley, W.C., Lopaschuk, G.D., McCormack, J.G., 1997. Regulation of energy substrate metabolism in the diabetic heart. *Cardiovasc. Res.* 34, 25–33.
- Stanley, W.C., Recchia, F.A., Lopaschuk, G.D., 2005a. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol. Rev.* 85, 1093–1129. <https://doi.org/10.1152/physrev.00006.2004>
- Stanley, W.C., Recchia, F.A., Lopaschuk, G.D., 2005b. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol. Rev.* 85, 1093–1129. <https://doi.org/10.1152/physrev.00006.2004>
- Steen, H., Mann, M., 2004. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 699–711. <https://doi.org/10.1038/nrm1468>
- Stephens, L., Anderson, K., Stokoe, D., Erdjument-Bromage, H., Painter, G.F., Holmes, A.B., Gaffney, P.R., Reese, C.B., McCormick, F., Tempst, P., Coadwell, J., Hawkins, P.T., 1998. Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science* 279, 710–714.
- Stump, C.S., Short, K.R., Bigelow, M.L., Schimke, J.M., Nair, K.S., 2003. Effect of insulin on human skeletal muscle mitochondrial ATP production, protein synthesis, and mRNA transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 7996–8001. <https://doi.org/10.1073/pnas.1332551100>
- Stürmer, K., Baumann, O., Walz, B., 1995. Actin-dependent light-induced translocation of mitochondria and ER cisternae in the photoreceptor cells of the locust *Schistocerca gregaria*. *J. Cell Sci.* 108 (Pt 6), 2273–2283.
- Suga, H., 1990. Ventricular energetics. *Physiol. Rev.* 70, 247–277.
- Sussman, M.A., 2009. Mitochondrial integrity: preservation through Akt/Pim-1 kinase signaling in the cardiomyocyte. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* 7, 929–938. <https://doi.org/10.1586/erc.09.48>
- Szalai, G., Krishnamurthy, R., Hajnóczky, G., 1999. Apoptosis driven by IP(3)-linked mitochondrial calcium signals. *EMBO J.* 18, 6349–6361. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.22.6349>
- Szendroedi, J., Phielix, E., Roden, M., 2011. The role of mitochondria in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Nat. Rev. Endocrinol.* 8, 92–103. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2011.138>
- Taegtmeyer, H., Wilson, C.R., Razeghi, P., Sharma, S., 2005. Metabolic energetics and genetics in the heart. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1047, 208–218. <https://doi.org/10.1196/annals.1341.019>
- Taylor, S.W., Fahy, E., Zhang, B., Glenn, G.M., Warnock, D.E., Wiley, S., Murphy, A.N., Gaucher, S.P., Capaldi, R.A., Gibson, B.W., Ghosh, S.S., 2003. Characterization of the human heart mitochondrial proteome. *Nat. Biotechnol.* 21, 281–286. <https://doi.org/10.1038/nbt793>
- Thirone, A.C.P., JeBailey, L., Bilan, P.J., Klip, A., 2006. Opposite effect of JAK2 on insulin-dependent activation of mitogen-activated protein kinases and Akt in muscle cells: possible target to ameliorate insulin resistance. *Diabetes* 55, 942–951.
- Thomas, R.L., Gustafsson, A.B., 2013. Mitochondrial autophagy--an essential quality control mechanism for myocardial homeostasis. *Circ. J. Off. J. Jpn. Circ. Soc.* 77, 2449–2454.
- Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Wigler, M., 1988. SCH9, a gene of *Saccharomyces cerevisiae* that encodes a protein distinct from, but functionally and structurally related to, cAMP-dependent protein kinase catalytic subunits. *Genes Dev.* 2, 517–527.
- Toker, A., Newton, A.C., 2000. Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site. *J. Biol. Chem.* 275, 8271–8274.

- Tong, H., Chen, W., Steenbergen, C., Murphy, E., 2000. Ischemic preconditioning activates phosphatidylinositol-3-kinase upstream of protein kinase C. *Circ. Res.* 87, 309–315.
- Toth, A., Jeffers, J.R., Nickson, P., Min, J.-Y., Morgan, J.P., Zambetti, G.P., Erhardt, P., 2006. Targeted deletion of Puma attenuates cardiomyocyte death and improves cardiac function during ischemia-reperfusion. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 291, H52-60. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01046.2005>
- Tschopp, O., Yang, Z.-Z., Brodbeck, D., Dummler, B.A., Hemmings-Mieszczak, M., Watanabe, T., Michaelis, T., Frahm, J., Hemmings, B.A., 2005. Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis. *Dev. Camb. Engl.* 132, 2943–2954. <https://doi.org/10.1242/dev.01864>
- Tyers, M., Rachubinski, R.A., Stewart, M.I., Varrichio, A.M., Shorr, R.G., Haslam, R.J., Harley, C.B., 1988. Molecular cloning and expression of the major protein kinase C substrate of platelets. *Nature* 333, 470–473. <https://doi.org/10.1038/333470a0>
- Valaskovic, G.A., Kelleher, N.L., Little, D.P., Aaserud, D.J., McLafferty, F.W., 1995. Attomole-sensitivity electrospray source for large-molecule mass spectrometry. *Anal. Chem.* 67, 3802–3805.
- Valen, G., 2003. The basic biology of apoptosis and its implications for cardiac function and viability. *Ann. Thorac. Surg.* 75, S656-660.
- Vance, J.E., 1990. Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria. *J. Biol. Chem.* 265, 7248–7256.
- Vanhaesebroeck, B., Alessi, D.R., 2000. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem. J.* 346 Pt 3, 561–576.
- Viniegra, J.G., Martínez, N., Modirassari, P., Hernández Losa, J., Parada Cobo, C., Sánchez-Arévalo Lobo, V.J., Aceves Luquero, C.I., Alvarez-Vallina, L., Ramón y Cajal, S., Rojas, J.M., Sánchez-Prieto, R., 2005. Full activation of PKB/Akt in response to insulin or ionizing radiation is mediated through ATM. *J. Biol. Chem.* 280, 4029–4036. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410344200>
- Westermann, B., Neupert, W., 2003. “Omics” of the mitochondrion. *Nat. Biotechnol.* 21, 239–240. <https://doi.org/10.1038/nbt0303-239>
- Williams, M.R., Arthur, J.S., Balendran, A., van der Kaay, J., Poli, V., Cohen, P., Alessi, D.R., 2000. The role of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 in activating AGC kinases defined in embryonic stem cells. *Curr. Biol. CB* 10, 439–448.
- Wilm, M., Shevchenko, A., Houthaave, T., Breit, S., Schweigerer, L., Fotsis, T., Mann, M., 1996. Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry. *Nature* 379, 466–469. <https://doi.org/10.1038/379466a0>
- Wilson, J.E., 2003. Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. *J. Exp. Biol.* 206, 2049–2057.
- Wittig, I., Schägger, H., 2008. Structural organization of mitochondrial ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta* 1777, 592–598. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.04.027>
- Wymann, M.P., Zvelebil, M., Laffargue, M., 2003. Phosphoinositide 3-kinase signalling--which way to target? *Trends Pharmacol. Sci.* 24, 366–376. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(03\)00163-9](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(03)00163-9)

- Yang, J., Cron, P., Good, V.M., Thompson, V., Hemmings, B.A., Barford, D., 2002a. Crystal structure of an activated Akt/protein kinase B ternary complex with GSK3-peptide and AMP-PNP. *Nat. Struct. Biol.* 9, 940–944. <https://doi.org/10.1038/nsb870>
- Yang, J., Cron, P., Thompson, V., Good, V.M., Hess, D., Hemmings, B.A., Barford, D., 2002b. Molecular mechanism for the regulation of protein kinase B/Akt by hydrophobic motif phosphorylation. *Mol. Cell* 9, 1227–1240.
- Yang, J.-Y., Deng, W., Chen, Y., Fan, W., Baldwin, K.M., Jope, R.S., Wallace, D.C., Wang, P.H., 2013. Impaired translocation and activation of mitochondrial Akt1 mitigated mitochondrial oxidative phosphorylation Complex V activity in diabetic myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 59, 167–175. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.02.016>
- Yang, J.-Y., Yeh, H.-Y., Lin, K., Wang, P.H., 2009. Insulin stimulates Akt translocation to mitochondria: implications on dysregulation of mitochondrial oxidative phosphorylation in diabetic myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 46, 919–926. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.02.015>
- Yang, Z.-Z., Tschopp, O., Baudry, A., Dümmler, B., Hynx, D., Hemmings, B.A., 2004. Physiological functions of protein kinase B/Akt. *Biochem. Soc. Trans.* 32, 350–354. <https://doi.org/10.1042/>
- Yang, Z.-Z., Tschopp, O., Di-Poi, N., Bruder, E., Baudry, A., Dümmler, B., Wahli, W., Hemmings, B.A., 2005. Dosage-dependent effects of Akt1/protein kinase Balpha (PKBalpha) and Akt3/PKBgamma on thymus, skin, and cardiovascular and nervous system development in mice. *Mol. Cell. Biol.* 25, 10407–10418. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.23.10407-10418.2005>
- Yi, M., Weaver, D., Eisner, V., Várnai, P., Hunyady, L., Ma, J., Csordás, G., Hajnóczky, G., 2012. Switch from ER-mitochondrial to SR-mitochondrial calcium coupling during muscle differentiation. *Cell Calcium* 52, 355–365. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2012.05.012>
- Youle, R.J., Narendra, D.P., 2011. Mechanisms of mitophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 9–14. <https://doi.org/10.1038/nrm3028>
- Youle, R.J., van der Bliek, A.M., 2012. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science* 337, 1062–1065. <https://doi.org/10.1126/science.1219855>
- Yuan, S., Fu, Y., Wang, X., Shi, H., Huang, Y., Song, X., Li, L., Song, N., Luo, Y., 2008. Voltage-dependent anion channel 1 is involved in endostatin-induced endothelial cell apoptosis. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 22, 2809–2820. <https://doi.org/10.1096/fj.08-107417>
- Yussman, M.G., Toyokawa, T., Odley, A., Lynch, R.A., Wu, G., Colbert, M.C., Aronow, B.J., Lorenz, J.N., Dorn, G.W., 2002. Mitochondrial death protein Nix is induced in cardiac hypertrophy and triggers apoptotic cardiomyopathy. *Nat. Med.* 8, 725–730. <https://doi.org/10.1038/nm719>
- Zhang, J., Li, X., Mueller, M., Wang, Y., Zong, C., Deng, N., Vondriska, T.M., Liem, D.A., Yang, J.-I., Korge, P., Honda, H., Weiss, J.N., Apweiler, R., Ping, P., 2008. Systematic characterization of the murine mitochondrial proteome using functionally validated cardiac mitochondria. *Proteomics* 8, 1564–1575. <https://doi.org/10.1002/pmic.200700851>
- Zhang, S.-Z., Gao, Q., Cao, C.-M., Bruce, I.C., Xia, Q., 2006. Involvement of the mitochondrial calcium uniporter in cardioprotection by ischemic preconditioning. *Life Sci.* 78, 738–745. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.05.076>
- Zhao, X., Bak, S., Pedersen, A.J.T., Jensen, O.N., Højlund, K., 2014. Insulin increases phosphorylation of mitochondrial proteins in human skeletal muscle in vivo. *J. Proteome Res.* 13, 2359–2369. <https://doi.org/10.1021/pr401163t>

Zhao, X., León, I.R., Bak, S., Mogensen, M., Wrzesinski, K., Højlund, K., Jensen, O.N., 2011. Phosphoproteome analysis of functional mitochondria isolated from resting human muscle reveals extensive phosphorylation of inner membrane protein complexes and enzymes. *Mol. Cell. Proteomics* MCP 10, M110.000299. <https://doi.org/10.1074/mcp.M110.000299>

Zhu, L., Yu, Y., Chua, B.H., Ho, Y.S., Kuo, T.H., 2001. Regulation of sodium-calcium exchange and mitochondrial energetics by Bcl-2 in the heart of transgenic mice. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 33, 2135–2144. <https://doi.org/10.1006/jmcc.2001.1476>

Zorov, D.B., Juhaszova, M., Sollott, S.J., 2014. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol. Rev.* 94, 909–950. <https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2013>

6. Danksagung

Als Doktorandin des Instituts für Herz- und Kreislaufphysiologie Düsseldorf sowie Mitglied des IRTG 1902 danke ich Herrn Professor Axel Gödecke für die exzellente wissenschaftliche Ausbildung sowie die Ermöglichung meiner Promotionsarbeit. Unter seiner Supervision und seinem Mentorship habe ich Forschung als eine verantwortungsvolle, intellektuell herausfordernde und dynamische Wissenschaft schätzen gelernt. Ich bin Herrn Professor Axel Gödecke für seine Unterstützung und intensive Förderung ausgesprochen dankbar.

Ich möchte mich auch bei Frau Professorin Judith Haendeler für ihre Zeit und Unterstützung in der Begutachtung meiner Doktorarbeit bedanken.

Ein weiterer Dank gilt dem Team der Herz- und Kreislaufphysiologie. Ich habe die freundschaftliche, loyale und supportive Arbeitsatmosphäre sehr geschätzt. Insbesondere möchte ich mich bei Julia Albrecht, Doktor Stefanie Gödecke, Susanne Küsters sowie Doktor Michael Reinartz für die theoretische und praktische Unterstützung bedanken. Der Erfahrungsschatz und das Wissen im Team der Herz- und Kreislaufphysiologie sind eine beeindruckende synergistische Kraft.

Ebenso möchte ich mich bei der International Research Training Group (IRTG 1902) bedanken, deren ambitioniertes transatlantisches Trainingsprogramm im Bereich der kardiovaskulären Forschung eine einzigartige Möglichkeit war, wissenschaftliche Interessen zu verfolgen, zu vertiefen und mit anderen Kollegen auszutauschen. Ich habe durch das Programm viele Talente und Genies mit mitreissendem Enthusiasmus für die Wissenschaft und Forschung kennen gelernt.

Besonders möchte ich mich bei Herrn Professor Axel Gödecke für die Aufnahme in das Programm und dessen Leitung bedanken. Ein besonderer Dank gilt auch Frau Doktor Sandra Berger und Frau Doktor Lucia Leitner, deren Unterstützung im Graduiertenkolleg ich sehr schätze.

Der „Medical Research School Düsseldorf“ (MedRSD) verdanke ich die Einbindung in ein Curriculum, das mir gute Impulse zur wissenschaftlichen Praxis und den Austausch mit Kollegen anderer Forschungsgruppen vermittelt hat. Insbesondere Frau Doktor Ursula Kessen danke ich für die organisatorische Begleitung und Unterstützung meiner Doktorarbeit.

Meine tiefste Bewunderung und Dankbarkeit gelten meiner liebevollen Familie- Doktor Rolf Lachmann, Vera Lachmann, Doktor Vera Lachmann und Doktor Mark Lachmann. In Liebe und Dankbarkeit widme ich meinem Vater diese Arbeit.

