

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

Einfluss der Proteinkinase B (AKT) auf die mitochondriale Funktion in Mäuseherzen

Dissertation

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

vorgelegt von

Tim Christian Stemmer

(2023)

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: PD Dr. Dr. med. André Heinen

Zweitgutachter: Prof. Dr. Dr. med. Ragnar Huhn-Wientgen

Zusammenfassung

Die Serin/Threonin-Kinase AKT ist ein bedeutender Regulator multipler zellulärer Prozesse und ist an der Steuerung von Wachstum, Proliferation, zellulärem Überleben unter Stress und dem Metabolismus im Myokard beteiligt. Es gibt deutliche Hinweise darauf, dass AKT die Expression und die Aktivität zahlreicher mitochondrialer Proteine reguliert. Im Myokard werden hauptsächlich die Isoformen AKT1 und AKT2 exprimiert. In dieser Arbeit wurde die Funktion isolierter kardialer Mitochondrien aus Mäusen mit kardiomyozytärem AKT1-KO (iCM-AKT1-KO), AKT2-KO (iCM-AKT2-KO) und AKT1/2 Doppel-KO (iCM-AKT1/2-DKO) untersucht. Da AKT ein wichtiger Second-Messenger stromabwärts des Insulin-Rezeptors ist und auf Insulinstimulation hin in die Mitochondrien transloziert, wurde zudem die Funktion der kardialen Mitochondrien der iCM-AKT1-KOs und der iCM-AKT2-KOs unter basalen Bedingungen (-Ins) sowie nach Insulinstimulation (+Ins) gemessen.

Die kardialen Mitochondrien wurden mittels Differentialzentrifugation aus Mäuse-Herzen isoliert. Die mitochondriale Funktion wurde mithilfe einer Sauerstoffelektrode vom Clark-Typ unter Oxidation verschiedener Substrate gemessen. Der mitochondriale Sauerstoffverbrauch wurde anhand der gemessenen Proteinkonzentration normalisiert. In der statistischen Auswertung wurden die respirometrischen Parameter der -Ins Gruppen der Einzel-KOs mit Wildtypen verglichen. Die -Ins Gruppen wurden mit den korrespondierenden +Ins Gruppen verglichen. Die iCM-AKT1/2-DKOs wurden mit Wildtypen verglichen.

Die iCM-AKT1-KOs und die iCM-AKT2-KOs zeigten einen Trend zu einer verminderten Effizienz der oxidativen Phosphorylierung und die iCM-AKT2-KOs wiesen zusätzlich eine Tendenz zu einer verringerten respiratorischen Kapazität auf. Der Verlust von beiden kardiomyozytär exprimierten AKT-Isoformen führte zu einer signifikanten und insbesondere unter Fettsäureoxidation drastisch verminderten respiratorischen Kapazität der kardialen Mitochondrien und zugleich zu einer verringerten Effizienz der oxidativen Phosphorylierung, was auf eine schwere mitochondriale Dysfunktion der iCM-AKT1/2-DKOs schließen lässt. Akute Insulinstimulation führte in den iCM-AKT1-KOs, den iCM-AKT2-KOs und den Wildtypen zu einem Trend zu einer gesteigerten respiratorischen Kapazität unter allen Substraten.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass beide kardiomyozytär exprimierten AKT-Isoformen an der Steuerung der myokardialen Bioenergetik beteiligt sind und die mitochondriale Funktion sowohl akut als auch konstitutiv regulieren.

Summary

The serine/threonine kinase AKT is a major regulator of multiple cellular processes and is involved in the control of growth, proliferation, cellular survival under stress and metabolism in the myocardium. There is a growing body of evidence that AKT can regulate the expression and activity of many mitochondrial proteins. AKT1 and AKT2 are the main AKT-isoforms expressed in cardiomyocytes. In the scope of this thesis, the performance of cardiac mitochondria isolated from mice with a cardiomyocyte-restricted AKT1-KO (iCM-AKT1-KO), AKT2-KO (iCM-AKT2-KO) and AKT1/2 Double-KO (iCM-AKT1/2-DKO) was examined. As AKT is an important second messenger downstream of the insulin receptor and, following acute insulin stimulation, translocates into the mitochondria, the performance of cardiac mitochondria from iCM-AKT1-KOs and iCM-AKT2-KOs was measured both under basal conditions (-Ins) and after acute insulin stimulation (+Ins).

The mitochondria were isolated from mice-hearts using differential centrifugation. With the help of a Clark-type oxygen electrode, mitochondrial respiration was measured during oxidation of different substrates. The mitochondrial oxygen consumption was normalized by the protein concentration. In the statistical evaluation, respirometric parameters of the -Ins groups of iCM-AKT1-KOs, iCM-AKT2-KOs and wildtypes were compared. The -Ins groups were compared with the corresponding +Ins groups. iCM-AKT1/2-DKOs were compared with wildtypes.

The iCM-AKT1-KOs and iCM-AKT2-KOs showed a trend towards a reduced efficiency of oxidative phosphorylation. The iCM-AKT2-KOs additionally exhibited a tendency to a reduced respiratory capacity. Loss of both AKT isoforms expressed in cardiomyocytes led to a significantly reduced respiratory capacity for each substrate, especially during fatty acid oxidation. Additionally, the iCM-AKT1/2-DKOs showed a significantly reduced efficiency of oxidative phosphorylation. These results suggest a severe mitochondrial dysfunction of the iCM-AKT1/2-DKOs. Acute insulin stimulation led to a trend towards an increased respiratory capacity in iCM-AKT1-KOs, iCM-AKT2-KOs and wildtypes for each substrate.

These results argue for a regulatory role of both AKT isoforms in the context of myocardial bioenergetics and suggest that AKT can control mitochondrial function both acutely and constitutively.

Abkürzungsverzeichnis

4E-BP1	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1</i>
Abb.	Abbildung
ACC	Acetyl-CoA-Carboxylase
ADP	Adenosindiphosphat
AGC	Aspartat-Glutamat-Carrier
AGC	Kinase-Familie, unter anderem aus PKA, PKG und PKC (AGC)
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-Kinase
ANT	Adeninnukleotid-Translokase
APPL1	<i>Adaptor protein, phosphotyrosine interacting with PH domain and leucine zipper 1</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ARE/EpRE	<i>Antioxidant/electrophile response element</i>
Arg	Arginin
ATP	Adenosintriphosphat
BAD	<i>Bcl-2-Antagonist of cell death</i>
BAX	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
Bzw.	Beziehungsweise
Ca²⁺	Ionisiertes Kalzium
CACT	Carnitin-Acylcarnitin-Translokase
CCCP	Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon
CIRKO	<i>Cardiomyocyte-selective insulin receptor knockout</i>
CME	<i>Clathrin-mediated endocytosis</i>
CO	<i>Cardiac output</i>
CoA	Coenzym A

CPT-1/2	Carnitin-Palmitoyltransferase-1/2
Cre	<i>Causes recombination</i>
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>
Cyt c	Cytochrom c
DIC	Dicarboxylat-Carrier
DKO	<i>Double knockout</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDV	Enddiastolisches Volumen
EF	Ejektionsfraktion
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
eIF4E	Eukaryotischer Initiationsfaktor 4E
ER	Endoplasmatisches Retikulum / <i>Estrogen receptor</i>
ETC	<i>Electron transport chain / Endothelial progenitor cell</i>
ETF	<i>Electron-transferring flavoprotein</i>
FABPpm	<i>Plasma membrane associated fatty acid binding protein</i>
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FAT/CD36	<i>Fatty acid translocase/cluster of differentiation 36</i>
FoxK1/2	Forkhead-Box-Protein K1/2
FoxO1/2/3/4	Forkhead-Box-Protein O1/2/3/4
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GAP	<i>GTPase activating protein</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GC	Glutamat-Carrier
GLUT1/4	Glucosetransporter Typ 1/4
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GSK3β	Glykogensynthase-Kinase 3 β
HBD	Hormonbindungsdomäne

HK-2	Hexokinase 2
HSP90	<i>Heat shock protein 90</i>
i.p.	intraperitoneal
iCM	<i>Inducible cardiomyocyte-restricted</i>
IGF1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>
IMM	<i>Inner mitochondrial membrane</i>
Ins	Insulin
IU	<i>International Units</i>
KD	<i>Knockdown</i>
KHK	Koronare Herzkrankheit
KO	<i>Knockout</i>
loxP	<i>Locus of crossing over</i>
MCF7-Zellen	<i>Michigan Cancer Foundation 7</i>
Mcl-1	<i>Induced myeloid leukemia cell differentiation protein 1</i>
MCU	Mitochondrialer Kalzium-Uniporter
MEF	<i>Mouse embryonic fibroblast</i>
Mer	<i>Mutated estrogen receptor</i>
α-MHC	<i>α-Myosin heavy chain</i>
MnTBAP	<i>Mn(III)tetrakis(4-benzoic acid)porphyrin</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MPC	Mitochondrialer Pyruvat-Carrier
mPTP	<i>Mitochondrial permeability transition pore</i>
mRNA	<i>Messenger-Ribonukleinsäure</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
mTORC1/2	<i>Mammalian target of rapamycin complex 1/2</i>
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NCX	<i>3Na⁺/Ca²⁺-Exchanger</i>
NHE	<i>Na⁺/H⁺-Exchanger</i>

Nrf2	<i>Nuclear respiratory factor 2</i>
OGC	Oxoglutarat-Carrier
OMM	<i>Outer mitochondrial membrane</i>
OSCP	<i>Oligomycin sensitivity conferral protein</i>
P/O-Ratio	<i>ATP/O-Ratio</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCM	Palmitoyl-l-carnitin/Malat
PDC	Pyruvat-Dehydrogenase-Complex
PDK	<i>Phosphoinositide-dependent kinase</i> oder Pyruvat Dehydrogenase Kinase
PDP	Pyruvat-Dehydrogenase-Phosphatase
PFK1	Phosphofruktokinase 1
PGM	Pyruvat/Glutamat/Malat
PH-Domäne	Pleckstrin-Homologie-Domäne
PHLPP	<i>PH domain and Leucine rich repeat Protein Phosphatases</i>
PI3,4P₂	Phosphoinositol-3,4-bisphosphat
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PI3P	Phosphoinositol-3-phosphat
PI4,5P₂	Phosphoinositol-4,5-bisphosphat
PI4P	Phosphoinositol-4-phosphat
PIP₃	Phosphoinositol-3,4,5-triphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B (=AKT)
PLN	Phospholamban
PMF	<i>Proton motive force</i>
PP2A	Proteinphosphatase 2
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>

Rab5/7	<i>Ras-related protein in brain 5/7</i>
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
RCR	<i>Respiratory control ratio</i>
Rheb	<i>Ras homolog enriched in brain</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RTK	Tyrosinkinase-Rezeptor
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyamid-Gelelektrophorese
S6K	<i>Ribosomal protein S6 kinase beta-1</i>
Ser	Serin
SERCA2a	<i>Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2a</i>
SHIP2	<i>SH2 Domain-containing Inositol Phosphatase 2</i>
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum / Succinat/Rotenon
STZ	Streptozotozin
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBST	<i>Tris-buffered saline + Tween</i>
TCC	Tricarboxylat-Carrier
Temed	Tetramethylethylendiamin
TFAM	Mitochondrialer Transkriptionsfaktor A
Thr	Threonin
TMPD	Tetramethylphenylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSC2	<i>Tuberous sclerosis complex 2</i>
UCP	<i>Uncoupling protein</i>
UQ	Ubichinon
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
YAP	<i>Yes-associated protein</i>

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	AKT Struktur und Isoformen.....	1
1.2	AKT Aktivierung, Aufrechterhaltung und Terminierung.....	3
1.3	Endosomen als Plattformen für AKT-Aktivität.....	6
1.4	Bedeutung von AKT für das Herz.....	7
1.4.1	Kardioprotektion durch AKT.....	8
1.4.2	Einfluss von AKT auf Wachstum und Kontraktilität.....	10
1.4.3	Myokardialer Metabolismus.....	11
1.4.4	AKT und die Mitochondrienfunktion.....	13
1.5	Fragestellung.....	16
2	Material und Methoden.....	17
2.1	Verwendete Geräte und Chemikalien.....	17
2.2	Tiere.....	19
2.3	Insulinstimulation.....	21
2.4	Mitochondrienisolation.....	21
2.5	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	22
2.5.1	Bradford-Assay.....	22
2.5.2	BCA-Assay.....	23
2.6	Messung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs.....	23
2.6.1	Funktionsweise der Sauerstoffelektrode.....	24
2.6.2	Substratkombinationen.....	25
2.6.3	Gemessene Parameter.....	30
2.6.4	Messprotokolle.....	32
2.7	Western Blot Analyse.....	32
2.7.1	Proteinauftrennung mittels SDS-PAGE.....	33
2.7.2	Proteintransfer mittels Western-Blot.....	33
2.7.3	Blockierung und Proteindetektion.....	33
2.8	Überprüfung der Knockout-Effizienz.....	34
2.9	Überprüfung der Insulin-Stimulation.....	34
2.10	Statistische Auswertung.....	35
3	Ergebnis.....	36
3.1	KO-Effizienz.....	36
3.2	Mitochondriale Respiration der Einzel-KOs.....	37
3.3	Mitochondriale Respiration nach Insulin-Stimulation.....	42
3.4	Doppel-KOs.....	49
4	Diskussion.....	59
4.1	Mitochondriale Respiration der Einzel- und Doppel-KOs.....	59
4.1.1	Respiratorische Kapazität.....	59

4.1.2	Effizienz der oxidativen Phosphorylierung	64
4.1.3	Mitochondriale Respiration nach Insulinstimulation	71
4.2	Mögliche pathologische Effekte durch das Cre-loxP-System	75
4.3	Schlussfolgerung	78
5	Literaturverzeichnis.....	79

1 Einleitung

1.1 AKT Struktur und Isoformen

AKT ist eine Serin-Threonin Kinase, gehört zur Familie der AGC Kinasen und ist ein wichtiger Regulator verschiedener zellulärer Prozesse (Abeyrathna and Su, 2015). Als bedeutender Knotenpunkt stromabwärts der Lipidkinase PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase) nimmt AKT Einfluss auf Zellwachstum, Proliferation, Metabolismus und Apoptose (Santi et al., 2010). AKT besitzt N-terminal eine etwa 110 Aminosäuren umfassende PH-Domäne (*pleckstrin homology*), die über eine Linker-Region mit der etwa 260 Aminosäuren umfassenden Kinase-Domäne verbunden ist. Am C-terminalen Ende des Proteins befindet sich zudem eine aus 70 Aminosäuren aufgebaute regulatorische Domäne (Abeyrathna and Su, 2015). In Säugetierzellen wurden bislang drei AKT Isoformen identifiziert: AKT1, AKT2 und AKT3 (Manning and Toker, 2017). In Abbildung 1 sind AKT1, AKT2 und AKT3 schematisch dargestellt. Diese drei Isoformen weisen einen hohen Grad an Sequenzhomologie und eine überlappende Substratspezifität auf (Yudushkin, 2019). Die PH-Domäne der 3 Isoformen ist zu 80% homolog, die Kinase-Domäne zu 90% und die C-terminale Domäne zu 70% (Santi et al., 2010). AKT1 wird in Säugetierzellen ubiquitär exprimiert, während sich bei AKT2 eine gehäufte Expression in Insulinresponsivem Gewebe (Leber, Skelettmuskulatur, Fett) feststellen lässt. AKT3 wird ebenfalls ubiquitär exprimiert, weist aber in Leber und Skelettmuskulatur nur eine geringgradige Expression auf (Bellacosa et al., 2004).

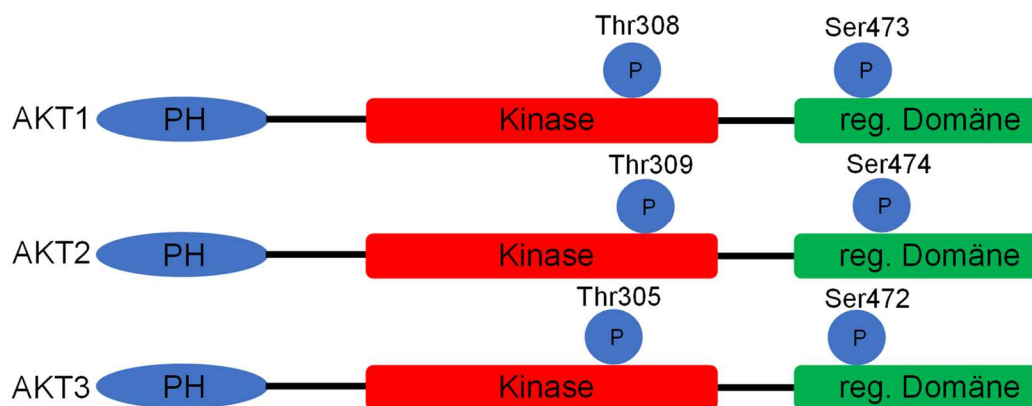


Abb. 1: Schematische Darstellung der Grundstruktur der drei in Säugetierzellen exprimierten AKT-Isoformen. Dargestellt sind außerdem die für die AKT-Aktivierung relevantesten Phosphorylierungsstellen: Eine Serin-Seitenkette im hydrophoben Motiv der C-terminalen regulatorischen Domäne und eine Threonin-Seitenkette innerhalb des T-Loops der Kinase-Domäne. Modifiziert nach Abeyrathna and Su, 2015.

Alle drei AKT Isoformen unterstützen Wachstum, zelluläres Überleben sowie Proliferation und greifen zudem in den zellulären Metabolismus ein (Manning and Toker, 2017). Trotz des hohen Grades an Sequenzhomologie und der überlappenden Substratspezifität weist jede AKT

Isoform auch isoformspezifische Funktionen auf, was anhand von isoformspezifischen AKT-Einzel- und Doppel-*Knockouts* in Mäusen untersucht wurde (Santi et al., 2010).

Mäuse mit *AKT1-Knockout* sind lebensfähig, weisen aber eine deutlich geringere Größe als Wildtyp-Mäuse auf. Auch eine erhöhte spontane Apoptoserate in Thymus und Hoden wurde bei diesen Mäusen beobachtet (Chen, 2001). MEF-Zellen (*mouse embryonic fibroblast*) mit AKT1-KO zeigten zudem eine erhöhte Anfälligkeit für Apoptose auf Stimulation mit Tumornekrosefaktor sowie Exposition gegenüber Ultraviolettstrahlung hin (Chen, 2001). In einer anderen Studie zeigten AKT1-KOs eine gestörte Ischämie- und VEGF-induzierte (*vascular endothelial growth factor*) Angiogenese sowie eine gestörte Mobilisation von ETCs (*endothelial progenitor cells*) nach Ischämie und wiesen eine verringerte Migration von Endothelzellen und Fibroblasten sowie eine verringerte NO-Sekretion auf (Ackah et al., 2005). Stimulation des Körperwachstums, postnatale Angiogenese sowie das Überleben bestimmter Zelltypen scheinen also Funktionen von AKT1 zu sein, die bei AKT1-Depletion nicht durch die beiden anderen Isoformen kompensiert werden können.

AKT2-KO-Mäuse weisen eine gestörte Glucosetoleranz auf und entwickeln eine periphere Insulinresistenz, eine gesteigerte Gluconeogenese in der Leber sowie Hyperinsulinämie (Cho et al., 2001). Eine zweite Arbeitsgruppe beobachtete in AKT2-KOs neben Hyperglykämie, Hyperinsulinämie, Glucoseintoleranz und gestörter Glucose-Aufnahme in die Muskeln zudem eine Wachstumsretardierung (Garofalo et al., 2003). Da AKT2-KO-Mäuse einen Diabetes mellitus Typ 2-ähnlichen Phänotyp entwickeln, scheint AKT2 eine wichtige Rolle für den Glucose-Metabolismus zu spielen. Diese isoformspezifische Funktion passt zu der gehäuften Expression von AKT2 in Insulin-responsivem Gewebe (siehe oben).

AKT3-KO-Mäuse weisen eine um etwa 20% reduzierte Gehirngröße auf. Während AKT1-KOs eine proportionale Größenretardierung zeigen, die alle Organe in etwa gleichem Maße betrifft, ist die Größenretardierung bei den AKT3-KOs auf das Gehirn beschränkt (Easton et al., 2005). Interessanterweise ergibt sich die Größenreduktion des Gehirns bei AKT1-KOs durch eine verringerte Zellzahl, während bei den AKT3-KOs nicht nur die Zellzahl, sondern auch die Zellgröße reduziert ist (Easton et al., 2005). Zudem war in dieser Studie die Aktivität des mTORC1-Signalwegs (*mammalian target of rapamycin complex 1*) im Zentralnervensystem in AKT3-KO-Mäusen im Gegensatz zu AKT1-KO-Mäusen reduziert, was die verringerte Zellgröße in den Gehirnen der AKT3-KO-Mäuse erklären könnte (Easton et al., 2005).

AKT1/2-DKO-Mäuse sterben kurz nach der Geburt und zeigen eine verringerte Größe, Muskelatrophie, abnormale Knochenstruktur sowie eine PPAR γ -vermittelte (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) gestörte Adipogenese (Peng, 2003). AKT1/3-DKOs starben in einer Studie an Tag 11 und Tag 12 der Embryonalentwicklung und weisen schwere Defekte an Herz und Nervensystem auf (Yang et al., 2005). AKT2/3-DKO-Mäuse sind lebensfähig, zeigen jedoch einen diabetischen Phänotyp, eine 25 prozentige Reduktion des Körpergewichts

sowie eine Verringerung von Gewicht und relativer Größe des Gehirns und der Hoden (Dummler et al., 2006).

Diese Daten verdeutlichen, dass jede AKT-Isoform spezifische Funktionen aufweist, die nicht oder nicht vollständig von den anderen Isoformen kompensiert werden können, sodass sich bereits der Verlust einer Isoform phänotypisch auswirkt.

1.2 AKT Aktivierung, Aufrechterhaltung und Terminierung

Die Proteinkinase AKT ist ein bedeutender Regulator multipler zellulärer Prozesse und katalysiert stromabwärts von Rezeptoren der Plasmamembran, welche zur Aktivierung der Lipid-Kinase PI3K führen, die Phosphorylierung hunderter Substrate (Yudushkin, 2019). Der kanonische Weg der AKT-Aktivierung beginnt mit der Stimulation von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs) oder G-Protein-koppelnden Rezeptoren (GPCRs), was jeweils zur Rekrutierung der Klasse 1 PI3K an die Plasmamembran führt (Manning and Toker, 2017). Klasse 1 PI3Ks phosphorylieren nach ihrer Rekrutierung an die Plasmamembran $PI4,5P_2$ zu PIP_3 (siehe Abb. 2A) (Manning and Toker, 2017). Neben Klasse 1 PI3Ks gibt es auch Klasse 2 PI3Ks, die $PI3,4P_2$ ausgehend von $PI4P$ sowie $PI3P$ ausgehend von PI synthetisieren (Sugiyama et al., 2019).

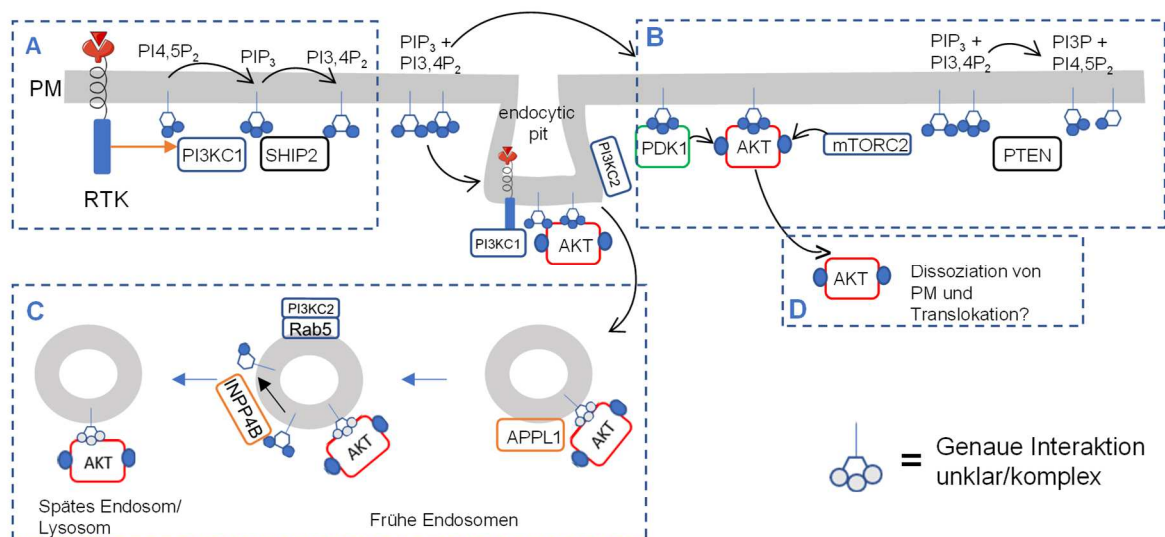


Abb. 2: Schematische Darstellung des PI3K-abhängigen AKT-Signaling auf RTK-Stimulation hin. **A:** RTK aktiviert Klasse 1 PI3K und in der Plasmamembran wird PIP_3 angereichert. SHIP2 produziert $PI3,4P_2$. **B:** An PIP_3 und $PI3,4P_2$ findet die AKT-Aktivierung statt (Phosphorylierung durch PDK1 und mTORC2). PIP_3 und $PI3,4P_2$ werden durch PTEN dephosphoryliert. Termination kann zudem durch direkte Dephosphorylierung von AKT erfolgen (nicht gezeigt, siehe Text unter 1.2). **C:** Durch Endozytose und endosomale Rekrutierung von PI3-Kinasen gelangen Phosphoinositide zu Endosomen, von denen ebenfalls AKT-Signaling ausgehen kann. Endosomales AKT-Signaling kann durch INPP4B terminiert werden (Details im Text unter 1.3). **D:** Aktiviertes AKT könnte von der Membran dissoziieren und ohne Lipid-Bindung in einem aktiven Zustand verbleiben. Modifiziert nach Sugiyama et al., 2019. RTK-Bildelement entnommen aus Servier Medical Art und modifiziert; lizenziert unter Creative Commons Attribution 3.0 Unported License. <http://smart.servier.com>

Mittels einer Interaktion zwischen $PI3,4P_2$ oder PIP_3 einerseits und der PH-Domäne von AKT andererseits wird zytosolisch inaktives AKT an die Plasmamembran rekrutiert und anschließend an den Stellen Thr308 und Ser473 phosphoryliert (siehe Abb. 2B) (Manning and Toker, 2017). Thr308 befindet sich innerhalb der Kinase-Domäne und Ser473 innerhalb eines

hydrophoben Motivs der C-terminalen Domäne (Yudushkin, 2019). Die Phosphorylierung an Thr308 verändert die Konformation innerhalb des aktiven Zentrums der Kinase-Domäne und ist für die Aktivität von AKT absolut notwendig, während die Phosphorylierung an Ser473 die Aktivität von AKT zusätzlich steigert (Yudushkin, 2019). Die Phosphorylierung an Thr308 wird durch die PDK1 (*phosphoinositide-dependent kinase 1*) katalysiert, welche ebenfalls über eine PH-Domäne verfügt und mittels dieser wie auch AKT an PIP_3 rekrutiert wird (Sugiyama et al., 2019). Ser473 wird im Rahmen der klassischen Aktivierung von AKT an der Plasmamembran von mTORC2 phosphoryliert (Manning and Toker, 2017). In der inaktiven Form unterliegt AKT einer intramolekularen Autoinhibition, die durch die PH-Domäne vermittelt wird. In dieser Konformation interagiert die PH-Domäne so mit der Kinase-Domäne, dass die Phosphorylierung von Thr308 durch PDK1 nicht möglich ist. Diese autoinhibitorische Konformation bezeichnet man als *PH-in*-Konformation (Calleja et al., 2007; Manning and Toker, 2017). Durch die Bindung der PH-Domäne an die Phosphoinositide der Plasmamembran kommt es zu einer Konformationsänderung, durch die Thr308 für die PDK1 zugänglich wird. Diese Konformation wird als *PH-out* bezeichnet (Calleja et al., 2007; Manning and Toker, 2017).

Es existieren derzeit unterschiedliche und teils widersprüchliche Modelle für die Aufrechterhaltung der Aktivität von AKT im Anschluss an die Aktivierung an der Plasmamembran durch mTORC2 und PDK1. Mittels FRET-basierten Verfahren (Förster-Resonanzenergietransfer) ist beobachtet worden, dass die AKT-Aktivität an der Plasmamembran der im Zytoplasma vorausgeht (Kunkel et al., 2005; Sugiyama et al., 2019). Calleja und Kollegen beobachteten in FRET-basierten Experimenten, dass inaktives AKT im Zytoplasma in einem Komplex mit PDK1 vorliegt und dass die Phosphorylierung an Thr308 durch eine intramolekulare Interaktion zwischen PH-Domäne und Kinase-Domäne verhindert wird. Erst die Bindung an PIP_3 führte zu einer Konformationsänderung von *PH-in* zu *PH-out* und nachfolgender Phosphorylierung an Thr308 durch PDK1. Im Anschluss an die Phosphorylierung an Thr308 und Ser473 dissoziierte AKT von der Membran und verteilte sich im Zytosol und Nucleus (Calleja et al., 2007). Die Akkumulation von AKT an der Plasmamembran nach Wachstumsfaktorstimulation hat eine Halbwertszeit von 2-5 Minuten und nach 15 Minuten lässt sich kaum noch AKT an der Plasmamembran nachweisen (Yudushkin, 2019). Nach Stimulation mit Insulin oder IGF1 (*insulin-like growth factor 1*) lässt sich intrazellulär jedoch für 1-2 Stunden sowohl phosphoryliertes AKT als auch die Phosphorylierung von AKT-Substraten nachweisen, was darauf hinweist, dass AKT auch nach Verlassen der Plasmamembran aktiv bleibt (Manning and Toker, 2017; Yudushkin, 2019). Basierend auf diesen Ergebnissen vermutete man, dass AKT nach dessen Aktivierung nicht mehr auf die Bindung an Membranlipide angewiesen ist, um in einer aktiven Konformation zu verbleiben (siehe Abb. 2D) (Antal and Newton, 2013; Manning and Toker, 2017).

Dieses Modell wurde allerdings durch eine andere Studie infrage gestellt, die zeigte, dass AKT durch die Bindung an PIP_3 allosterisch aktiviert wird und dass Dissoziation von PIP_3 der limitierende Faktor für Dephosphorylierung und Inaktivierung von AKT ist (Ebner et al., 2017). Der allosterische Regulationsmechanismus durch die Bindung von PI3,4P_2 bzw. PIP_3 an die PH-Domäne hob die PH-vermittelte Autoinhibition von AKT auf und erhöhte die Affinität zu Substraten etwa 40-fach. Dieser Regulationsmechanismus schien auch in doppelt phosphoryliertem AKT wirksam zu sein (Ebner et al., 2017; Yudushkin, 2019), was darauf hindeutet, dass die Phosphorylierung von AKT an Thr308 und Ser473 zwar notwendig, aber nicht hinreichend für volle und anhaltende AKT-Aktivität ist (Ebner et al., 2017; Yudushkin, 2019). Das von Ebner und Kollegen vorgeschlagene Modell impliziert, dass verlängerte AKT-Aktivität nur möglich ist, solange AKT an PI3,4P_2 - bzw. PIP_3 -haltige Membranen gebunden ist. Tatsächlich gibt es zahlreiche Hinweise darauf, dass Endosomen und Lysosomen als Plattformen für AKT-Aktivität dienen und es wurden verschiedene Mechanismen beschrieben, wie Endosomen mit PI3K-Lipidprodukten angereichert werden könnten (siehe Abb. 2C und Kapitel 1.3).

Dennoch ist das Modell von Ebner und Kollegen bislang nicht hinreichend etabliert und wurde bereits infrage gestellt: Es gibt Evidenz, die deutlich auf eine AKT-Aktivität im Nucleus (Sugiyama et al., 2019) sowie in den Mitochondrien (Bijur and Jope, 2003; Santi et al., 2010; Yang et al., 2013) hinweist und es ist unklar, wie und ob PI3K-Lipidprodukte in diesen Kompartimenten angereichert werden könnten (Sugiyama et al., 2019). Eine weitere Studie, in welcher die Aktivität von AKT in Abhängigkeit von der Bindung an PIP_3 untersucht wurde, kam außerdem zu dem Ergebnis, dass PIP_3 -Bindung die Aktivität von C-terminal-unphosphoryliertem AKT nicht erhöht und die Autoren dieser Studie schlussfolgerten, dass die Rolle von PIP_3 in der AKT-Aktivierung eher darin besteht, AKT an die Membran zu rekrutieren, wo es dann phosphoryliert wird (Chu et al., 2018). Interessanterweise beobachteten Chu und Kollegen ebenfalls, dass eine C-terminale Phosphorylierung an Ser473 dazu führt, dass Ser473 mit Arg144, welches sich innerhalb des Linkers befindet, interagiert, wodurch die PH-vermittelte Autoinhibition aufgehoben und die AKT-Aktivität gesteigert wird (Chu et al., 2018).

Die derzeitigen Modelle für die Aktivierung von AKT auf RTK- oder GPCR-Stimulation hin gehen insgesamt von einer AKT-Rekrutierung an die Membran und einer dortigen Phosphorylierung durch PDK1 und mTORC2 aus. Ob AKT im Anschluss daran weiterhin auf eine Bindung an PI3K-Lipidprodukte angewiesen ist, um aktiv zu bleiben, ist nicht abschließend geklärt.

Terminierung des PI3K-AKT Signalwegs wird hauptsächlich durch die Lipid-Phosphatase PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) erreicht, die PIP_3 zu PI4,5P_2 dephosphoryliert (siehe Abb. 2B) (Manning and Toker, 2017). PTEN kann ebenfalls PI3,4P_2 dephosphorylieren und ist ein wichtiger Tumorsuppressor, bei dessen Ausfall Tumorwachstum und -progression begünstigt werden (Sugiyama et al., 2019). SHIP2 (*SH2 domain-containing inositol 5'-phosphatase 2*) ist eine weitere Lipid-Phosphatase, die PIP_3 zu PI3,4P_2 dephosphoryliert und damit zum PIP_3 -

Abbau beiträgt (Sugiyama et al., 2019). SHIP2 ist allerdings kein ausschließlich negativer Regulator der PI3K-AKT-Achse, da AKT2 selektiv an Membranen, welche PI3,4P₂ enthalten, aktiviert werden kann (Liu et al., 2018). Neben der Unterbrechung des PI3K-AKT Signalwegs durch Lipid-Phosphatasen kann aktives AKT durch die Protein-Phosphatasen PP2A (*protein phosphatase 2a*) und PHLPP (*PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase*) jeweils an T308 und S473 dephosphoryliert und somit inaktiviert werden (Manning and Toker, 2017).

1.3 Endosomen als Plattformen für AKT-Aktivität

Aktives AKT phosphoryliert eine Vielzahl von Substraten, die in unterschiedlichen zellulären Kompartimenten lokalisiert sind (Manning and Toker, 2017). Die drei in Säugetierzellen exprimierten AKT-Isoformen sind zu etwa 80% homolog zueinander und überlappen funktionell (Walz et al., 2010). Wie bereits beschrieben weist jede der drei AKT Isoformen aber auch isoformspezifische physiologische Effekte auf. Wie diese Substratspezifität gewährleistet wird, ist weitgehend unbekannt (Walz et al., 2010; Yudushkin, 2019).

Es gibt Evidenz für eine von Endosomen ausgehende AKT-Aktivität (Manning and Toker, 2017), die zu einer isoformspezifischen Aktivierung und Translokation von AKT beitragen könnte (Sugiyama et al., 2019). Durch Clathrin-vermittelte Endozytose (CME) können Wachstumsfaktorrezeptoren internalisiert werden, was es der Zelle ermöglicht, sowohl die Signaltransduktion an der Zelloberfläche zu regulieren als auch Signalkomplexe (beispielsweise aktivierte RTKs) von der Plasmamembran zu bestimmten Endomembranen zu transportieren oder diese lysosomal abzubauen (Sugiyama et al., 2019). Nach der Endozytose durchlaufen die Endosomen mehrere Stadien vom frühen, Rab5-positiven (*Ras-related protein in brain 5*) Endosom über das späte, Rab7-positive Endosom bis zum Lysosom und es gibt Hinweise darauf, dass von jeder dieser Zwischenstufen AKT-Aktivität ausgehen kann (Sugiyama et al., 2019). APPL1 (*adaptor protein, phosphotyrosine interacting with PH domain and leucine zipper 1*)- und Rab5-positive frühe Endosomen dienen als Plattform für internalisierte Signalkomplexe und unterstützen die intrazelluläre AKT-Aktivität (Zoncu et al., 2009). APPL1 bindet an Rab5, die Lipidmembran sowie an den zytosolischen Teil internalisierter Rezeptoren wie EGFR (*epidermal growth factor receptor*) (Zoncu et al., 2009), kann direkt an AKT binden (siehe Abb. 2C) und wird unter anderem für die Aktivierung von AKT auf Insulinstimulation hin benötigt (Masters et al., 2017). Es wurde gezeigt, dass Insulinstimulation in Lebergewebe zu einer Translokation von PI3K-C2 γ zu Rab5-positiven frühen Endosomen mit anschließender PI3,4P₂ Akkumulation in diesen Endosomen führt, was wichtig für die verlängerte AKT2-Aktivität nach Insulinstimulation zu sein scheint (Braccini et al., 2015). So zeigte PI3K-C2 γ -defizientes Lebergewebe nach Insulinstimulation eine deutlich verkürzte AKT2-Aktivierung, einen verringerten endosomal PI3,4P₂-Pool, verringerte GSK3 β -Phosphorylierung (Glykogensynthase-Kinase 3 β) und verringerte Glykogen-Synthase-Aktivität, während die Phosphorylierung

der AKT-Substrate S6K (*ribosomal protein S6 kinase beta-1*) und FoxO1-3 (Forkhead-Box-Protein O1/2/3) und interessanterweise auch die AKT1-Phosphorylierung unverändert war (Braccini et al., 2015). In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass die Phosphatase INPP4B (*inositol polyphosphate 4-phosphatase type II*) die PI3K-C2 α -vermittelte selektive Aktivierung von AKT2 an frühen Endosomen hemmt (siehe Abb. 2C) (Li Chew et al., 2015). Über Klasse 2 PI3Ks wie die PI3K-C2 α könnte also eine Produktion von PI3,4P₂ in Rab5-positiven Endosomen stattfinden, was eine endosomale AKT-Aktivierung ermöglichen könnte (Sugiyama et al., 2019). Ein weiterer möglicher Mechanismus der Anreicherung von PI3K-Lipidprodukten in Endosomen ist die Dephosphorylierung von PIP₃ zu PI3,4P₂ durch SHIP2 an der Plasmamembran (siehe Abb. 2A). Das dabei entstehende PI3,4P₂ kann über CME in die Membran früher Endosomen gelangen, was durch den Clathrin-Inhibitor Pitstop2 blockiert wird (Liu et al., 2018). In dieser Studie wurde außerdem gezeigt, dass AKT2 bevorzugt an PI3,4P₂ bindet, während AKT1 und 3 eine deutlich höhere Affinität zu PIP₃ aufweisen und dass eine Hemmung von SHIP2 zu einer reduzierten AKT2-Aktivität sowohl an der Plasmamembran als auch an frühen Endosomen führt, während die PIP₃-Dichte und ebenso die AKT1-Aktivität an der Plasmamembran steigt. Unter Pitstop2 war die AKT2-Aktivität an der Plasmamembran verlängert, an den Endosomen aber signifikant reduziert, während die AKT1-Aktivität unverändert war. Diese selektive Blockade der endosomalen AKT2-Aktivität durch Pitstop2 hatte eine drastische Verringerung der GSK3 β -Phosphorylierung zur Folge, während die Phosphorylierung von FoxO3 und TSC2 (*tuberous sclerosis complex 2*) nahezu unverändert blieb (Liu et al., 2018). Die Ergebnisse der Arbeitsgruppen von Liu, Braccini und Li Chew weisen darauf hin, dass die drei AKT-Isoformen auf Wachstumsfaktorstimulation hin unterschiedlich reguliert werden und die räumliche Verteilung von aktiviertem AKT in der Zelle je nach Isoform abweicht. Dies könnte die Isoform-spezifischen Effekte von AKT1, 2 und 3 erklären, welche unter 1.1 beschrieben wurden.

1.4 Bedeutung von AKT für das Herz

In Kardiomyozyten werden hauptsächlich die Isoformen AKT1 und AKT2 exprimiert, während AKT3 unter physiologischen Bedingungen im Myokard kaum vorhanden ist (Reinartz et al., 2014). Im Myokard ist AKT maßgeblich für die Kardioprotektion (siehe 1.4.1) und die Regulation des Herzwachstums, der Kontraktilität (siehe 1.4.2) sowie des Metabolismus (siehe 1.4.3) verantwortlich (Sussman et al., 2011). Eine Dysregulation des AKT-Signalwegs im Myokard ist Ursache bzw. Folge pathologischer Prozesse, die schließlich zu Remodeling und kardialer Dekompensation führen (Sussman et al., 2011).

1.4.1 Kardioprotektion durch AKT

Während neonatale Kardiomyozyten noch in der Lage sind, sowohl durch Proliferation als auch durch Hypertrophie zum Wachstum des Myokards beizutragen, sinkt die Proliferationsfähigkeit von Kardiomyozyten in der postnatalen Periode rapide (Sussman et al., 2011), was die Bedeutung von kardioprotektiven Signalwegen, die den Zelltod der Kardiomyozyten verhindern, verdeutlicht. Entscheidend für die Herbeiführung des Zelltods ist der Verlust der mitochondrialen Integrität, welcher zur Freisetzung von normalerweise im Intermembranraum zurückgehaltenen pro-apoptotischen Molekülen wie Cytochrom c (Cyt c) führt (Sussman et al., 2011). Der Verlust der mitochondrialen Integrität kann einerseits durch pro-apoptotische Proteine aus der Bcl-2-Familie (*B-cell lymphoma 2*) (Parcellier et al., 2008) und andererseits durch Calciumüberladung, oxidativen Stress und konsekutive Öffnung der mitochondrialen *permeability-transition-pore* (mPTP) herbeigeführt werden (Hurst et al., 2017; Miyamoto et al., 2008; Rasola and Bernardi, 2011). AKT verhindert den Zelltod durch Regulation diverser Transkriptionsfaktoren (siehe Abb. 3A), Interaktion mit Bcl-2-Proteinen (siehe Abb. 3B) sowie Hemmung der mPTP-Öffnung (siehe Abb. 3C).

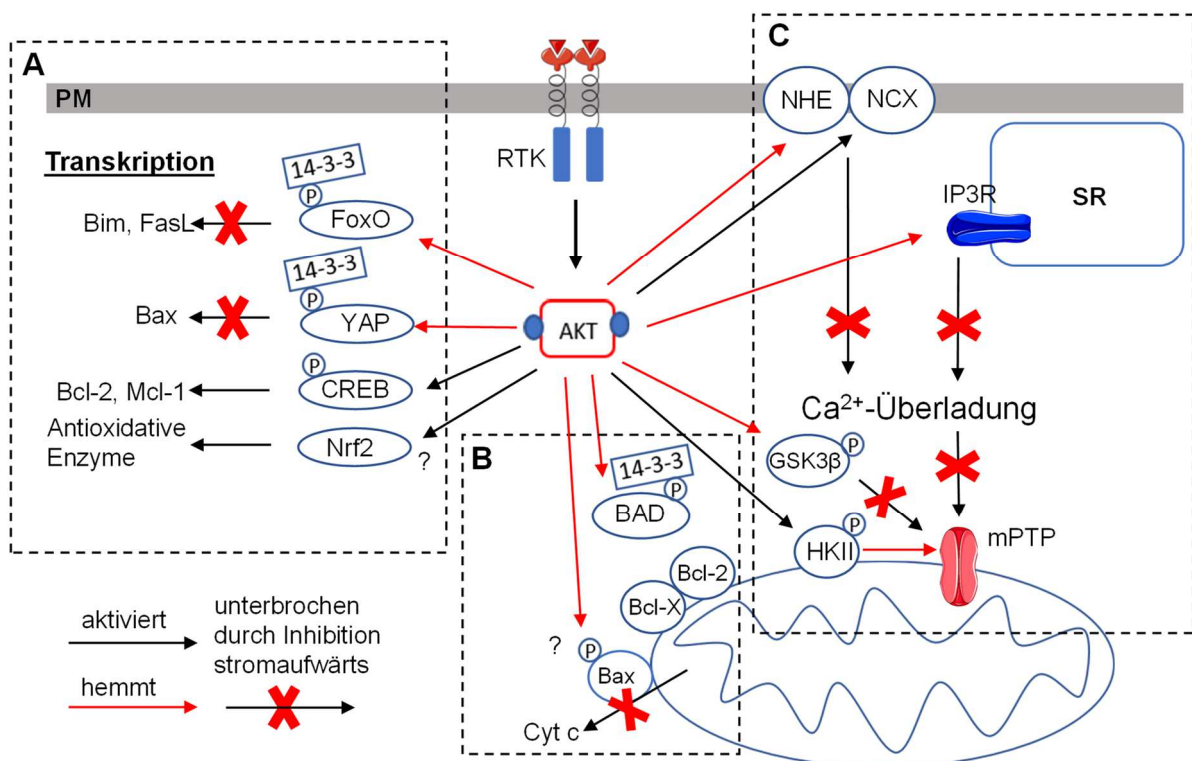


Abb. 3: Darstellung der kardiomyozytären AKT-Targets im Kontext des anti-apoptotischen Effektes von AKT. **A:** AKT-Effekte auf Transkriptionsfaktoren. **B:** AKT-vermittelte Inhibition der Apoptose durch Interaktion mit Bcl-2-Proteinen. **C:** AKT-Effekte auf die Calcium-Homöostase und die mPTP. Nähere und ergänzende Informationen befinden sich im Text. RTK-Bildelemente sowie IP₃-Rezeptor- und mPTP-Bildelemente entnommen aus Servier Medical Art und modifiziert; lizenziert unter Creative Commons Attribution 3.0 Unported License. <http://smart.servier.com>

A: AKT und Transkriptionsfaktoren

AKT kann durch Beeinflussung der Transkription anti-apoptotisch wirken (siehe Abb. 3A): AKT phosphoryliert und aktiviert den Transkriptionsfaktor CREB (*cAMP response element binding protein*), der an der Transkription der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Mcl-1 beteiligt ist (Parcellier et al., 2008). Über eine Phosphorylierung von FoxO-Transkriptionsfaktoren vermittelt AKT deren Bindung an 14-3-3-Proteine im Cytoplasma, wodurch die Transkription diverser pro-apoptotischer FoxO-Targets gehemmt wird (Yao et al., 2014). Das *Yes-associated-protein* (YAP) ist ein Koaktivator des Transkriptionsfaktors p73, welcher bei DNA-Schädigung die Transkription von BAX (*Bcl-2-associated X protein*) induziert (Basu et al., 2003). YAP kann durch AKT an Ser127 phosphoryliert werden, wodurch YAP gebunden an 14-3-3-Proteine aus dem Nucleus exportiert wird (Abeyrathna and Su, 2015; Basu et al., 2003).

B: AKT und Bcl-2-Proteine

Im Zytosol vorliegendes BAX wird von pro-apoptotischen Faktoren zu einer Konformationsänderung angeregt, woraufhin es an die äußere Mitochondrienmembran (OMM) transloziert, oligomerisiert und zur Freisetzung von Cyt c führt (siehe Abb. 3B) (Parcellier et al., 2008). Eine Depletion von BAX schützt in Ischämie-Reperfusionen-Modellen vor myokardialer Schädigung und es gibt Berichte, wonach BAX durch AKT phosphoryliert und inhibiert wird, was jedoch bisher nicht für Kardiomyozyten gezeigt wurde (Miyamoto et al., 2008). Das Bcl-2-Protein BAD (*Bcl-2-antagonist of cell death*) bildet einen Komplex mit den anti-apoptotischen Proteinen Bcl-2 und Bcl-X, wodurch diese gehemmt werden, und Apoptose begünstigt wird. AKT phosphoryliert BAD an Ser136, was zu dessen Bindung an 14-3-3-Proteine und zur Hemmung der Komplexbildung mit Bcl-2 und Bcl-X führt (siehe Abb. 3B) (Abeyrathna and Su, 2015). AKT kann also durch Phosphorylierung von Bcl-2-Proteinen dem Zelltod entgegenwirken.

C: AKT und die mPTP

Überladung der Mitochondrien mit Calcium (siehe Abb. 3C) und reaktiven Sauerstoffspezies führt zur Öffnung der mitochondrialen *permeability-transition-pore* (mPTP) (Hurst et al., 2017; Rasola and Bernardi, 2011). Eine verlängerte Öffnung der mPTP führt zu Depolarisation der inneren Mitochondrienmembran, Unterbrechung der oxidativen Phosphorylierung, osmotischer Matrix-Schwellung und schließlich Ruptur der äußeren Mitochondrienmembran, wobei große Mengen an Calcium und Apoptogenen freigesetzt werden (Rasola and Bernardi, 2011). Je mehr Mitochondrien von dieser Ruptur betroffen sind, desto ausgeprägter ist die konsekutive ATP-Depletion wie auch der Calciumanstieg im Zytosol und es kommt entweder bei ausreichenden ATP-Spiegeln zur Apoptosom-Bildung und folglich zur Apoptose oder zu einer Calcium-vermittelten Aktivierung lytischer Enzyme im Zytosol, wodurch der nekrotische Zelltod herbeigeführt wird (Rasola and Bernardi, 2011). Die mPTP spielt wahrscheinlich eine Schlüsselrolle in der Entstehung des myokardialen Ischämie-Reperfusionsschadens (Hurst et al.,

2017; Rasola and Bernardi, 2011) und es ist bekannt, dass RTK- sowie GPCR-vermittelte AKT-Aktivität in Ischämie-Reperfusionen-Modellen kardioprotektiv wirkt (Miyamoto et al., 2008). Es wurde gezeigt, dass AKT an kardiomyozytären Mitochondrien das Protein Hexokinase 2 (HK-2) phosphoryliert, was zu verstärkter HK-2 Lokalisation zu den Mitochondrien führt und vor ROS- (*reactive oxygen species*) bzw. Calcium-vermittelter mPTP-Öffnung schützt. HK-2-Dissoziation führte in isolierten Mitochondrien zu einem Verlust der mitochondrialen Integrität auf Calcium-Überladung hin sowie zu einer Depolarisation der inneren Mitochondrienmembran auf H₂O₂-Exposition hin (Miyamoto et al., 2008). Zudem inaktiviert AKT die GSK3 β durch eine Phosphorylierung an Ser9, wodurch die Öffnung der mPTP ebenfalls gehemmt werden kann (Yao et al., 2014). AKT kann zusätzlich Einfluss auf die Calciumhomöostase nehmen (siehe Abb. 3C) und am ER/SR (endoplasmatisches/sarkoplasmatisches Retikulum) über eine Phosphorylierung der IP₃-Rezeptoren die Freisetzung von Calcium hemmen, wodurch die mitochondriale Calciumaufnahme reduziert und die Apoptose gehemmt wird (Rasola and Bernardi, 2011), was jedoch in dieser Studie nicht an Kardiomyozyten gezeigt wurde. Außerdem wurde gezeigt, dass konstitutiv aktives AKT zu verstärkter Expression des Natrium-Calcium-Antiporters NCX führt (Miyamoto et al., 2005) und dass der Na/H-Antiporter NHE durch AKT phosphoryliert und inhibiert wird (Snabaitis et al., 2008). Der NHE trägt insbesondere unter ischämischen Bedingungen dazu bei, dass es durch Azidose infolge vermehrter anaerober Glykolyse zu einer zytosolischen Akkumulation von Natrium und folglich auch von Calcium kommt (Rasola and Bernardi, 2011). AKT kann nicht nur in die Calciumhomöostase eingreifen, sondern wahrscheinlich auch oxidativem Stress entgegenwirken. Insulin reduziert den myokardialen Ischämie-Reperfusionsschaden durch Verminderung von oxidativem Stress über einen PI3K-abhängigen Signalweg (Ji et al., 2010). Eine andere Arbeitsgruppe zeigte, dass Insulin über Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs in Kardiomyozyten, welche mechanischem Stress ausgesetzt wurden, den Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies unterdrücken, das mitochondriale Membranpotential aufrechterhalten und Apoptose sowie Nekrose reduzieren kann (Teshima et al., 2010). Außerdem wurde gezeigt, dass Insulin PI3K-abhängig zur Aktivierung von Nrf2 (*Nuclear respiratory factor 2*) führt, welches über das *Antioxidant Response Element* die Transkription antioxidativer Enzyme reguliert (siehe Abb. 3A) (Tan et al., 2011). AKT kann die Öffnung der mPTP also einerseits über HK-2- und GSK3 β -Phosphorylierung und möglicherweise auch über direkte Einflussnahme auf Calciumhomöostase und oxidativen Stress verhindern und dadurch vermutlich zum kardiomyozytären Überleben unter Stress beitragen.

1.4.2 Einfluss von AKT auf Wachstum und Kontraktilität

Stromabwärts der Klasse 1A PI3K reguliert AKT das physiologische Herzwachstum sowie adaptive Herzhypertrophie (Sussman et al., 2011). Wachstumsfaktoren wie Insulin oder IGF-1 aktivieren den Klasse 1A PI3K-AKT-Signalweg und stimulieren auf physiologische Belastung hin die adaptive Herzhypertrophie (Vega et al., 2017). AKT phosphoryliert TSC2 und hebt

damit dessen GAP-Effekt (*GTPase activating protein*) auf die GTPase Rheb auf, welche in ihrer GTP-gebundenen Form mTORC1 aktivieren kann (Manning and Toker, 2017). mTORC1 phosphoryliert das 4E-bindende Protein 1 (4E-BP1), was dessen inhibitorischen Effekt auf die Translation aufhebt und kompensatorische Herzhypertrophie unterstützt (Shimizu and Mina-mino, 2016). Der AKT-mTOR-Signalweg ist verstärkt aktiv bei physiologischer Herzhypertrophie infolge von Training und deaktiviert bei pathologischer Herzhypertrophie ausgelöst durch linksventrikuläre Druckbelastung (Kemi et al., 2008). Eine weitere Arbeitsgruppe zeigte, dass AKT1-defiziente Mäuse resistent gegen physiologische Hypertrophie infolge von Training sind und auf Endothelin-1-Stimulation hin eine exazerbierte Form pathologischer Hypertrophie entwickeln. Die Autoren schlussfolgern, dass AKT1 notwendig für physiologische Hypertrophie ist und einer pathologischen Hypertrophie entgegenwirken kann (DeBosch et al., 2006). Mäuse mit konstitutiv aktivem AKT (E40K-Mutation) zeigten eine myokardiale Hypertrophie und eine verbesserte systolische Funktion, jedoch eine beeinträchtigte diastolische Funktion unter Stress *in vivo* (Latronico et al., 2004). Auf zellulärer Ebene wiesen die E40K-Mutanten einen verstärkten Calcium-Einstrom und interessanterweise auch eine beschleunigte Relaxation auf (Latronico et al., 2004). In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass AKT nach physiologischer Aktivierung zum SR translozieren und dort Phospholamban (PLN) an Thr17 phosphorylieren kann, was zu verbesserter Kontraktilität führt (Catalucci et al., 2009). Die Autoren schlagen ein Modell vor, wonach die Phosphorylierung von PLN am SR durch AKT zu einer Disinhibition der SERCA2a (*sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2a*) führt, wodurch die Verfügbarkeit von sarkoplasmatischem Calcium erhöht und eine verbesserte Kontraktilität erzielt wird (Catalucci et al., 2009). In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass gezielte Aktivierung des AKT-Signalwegs in zwei unterschiedlichen Herzinsuffizienz-Modellen (infolge von mechanischem Stress bzw. Doxorubicin-Exposition) zu verbesserter Kontraktilität führt, und zwar bereits vor Auftreten einer kompensatorischen Hypertrophie. Dies war assoziiert mit einer Veränderung des Transkriptoms: zwei Wochen nach AKT-Aktivierung war die Expression von Zelltod-Genen vermindert und die Expression von Genen im Zusammenhang mit dem Glucose- und Lipid-Metabolismus gesteigert (Shiojima et al., 2012).

1.4.3 Myokardialer Metabolismus

Das Herz hat einen höheren Energiebedarf als jedes andere Organ, setzt jeden Tag 6 kg ATP um und pumpt täglich etwa 10 Tonnen Blut durch den Körper (Neubauer, 2007). Hierzu wandelt das Herz chemische Energie in Form von Fettsäuren und Glucose in mechanische Energie um (Neubauer, 2007). Im nüchternen Zustand werden 70% der myokardialen ATP-Produktion durch Fettsäure-Oxidation, 20% durch Kohlenhydrat-Katabolismus und 10% durch Oxidation von Laktose, Ketonen und Aminosäuren erzielt (Noordali et al., 2018). Fettsäuren werden hauptsächlich über die beiden membranassoziierten Proteine FABPpm (*fatty acid binding protein*) und FAT/CD36 (*fatty acid translocase*) von Kardiomyozyten aufgenommen,

können aber auch mittels passiver Diffusion die Plasmamembran durchqueren (Luiken et al., 2004). Intrazellulär werden die Fettsäuren in Acyl-CoA konvertiert (van der Vusse, 2000). Anschließend gelangen die Fettsäuren in die Mitochondrien (kurzkettige per passiver Diffusion und langkettige über das Carnitin-Shuttle-System) und werden dort in mehreren Oxidations-schritten unter Reduktion von NAD⁺ (Nicotinamidadenindinukleotid) und FAD (Flavin-Adenin-Dinukleotid) zu Acetyl-CoA abgebaut (Noordali et al., 2018). Glucose wird insulinunabhängig via GLUT1 (Glucosetransporter Typ 1) und insulinabhängig über GLUT4 in die Kardiomyozyten aufgenommen (Kolwicz and Tian, 2011). Im Anschluss wird es durch die Hexokinase zu Glucose-6-phosphat phosphoryliert (Kolwicz and Tian, 2011) und in der Glykolyse zu Pyruvat abgebaut, was zusätzlich zur Produktion von NADH und ATP führt (Gupta and Houston, 2017). Das entstandene Pyruvat kann im Zytosol zu Laktat reduziert werden oder in die Mitochondrien gelangen, wo es entweder zu Acetyl-CoA oxidiert oder zu Malat bzw. Oxalacetat carboxyliert wird, was eine wichtige anaplerotische Reaktion ist (Gupta and Houston, 2017). Das Acetyl-CoA, welches im Glucose- und Fettsäure-Abbau erzeugt wird, gelangt in den Citrat-Zyklus, der NADH und FADH₂ generiert (Schwarz et al., 2014). Die zuvor im Rahmen der Substratoxidation von NADH und FADH₂ aufgenommenen Elektronen werden auf die Proteine der Atmungskette in der inneren Mitochondrienmembran übertragen und durchlaufen mehrere Redoxreaktionen, was als Elektronentransportkette bezeichnet wird und letztlich zur Reduktion von Sauerstoff zu Wasser führt (Schwarz et al., 2014). NADH wird von Complex I (NADH-Oxidase) der Atmungskette oxidiert und die Elektronen von FADH₂ gelangen auf der Ebene des Ubichinon-Pools, der Complex I und Complex III funktional miteinander verbindet, in die Atmungskette (Nicholls and Ferguson, 2013, Bioenergetics, p. 57). Der Elektronentransport ist exergon und an die Translokation von Protonen von der Matrix in den Intermembranraum gekoppelt, wodurch ein elektrochemischer Protonengradient entsteht (siehe Abb. 4) (Nicholls and Ferguson, 2013, Bioenergetics, p. 3–4). Dieser Protonengradient ist die Triebkraft für den Protonen-Einstrom zurück in die Matrix durch Complex V, welcher somit eine revers arbeitende Protonenpumpe ist und ATP aus ADP und Phosphat synthetisiert (Nicholls and Ferguson, 2013, Bioenergetics, p. 4). Unter anderem durch UCP1 (*uncoupling protein 1*) wird der Protonengradient dissipiert, was als *Proton-Leak* bezeichnet wird (siehe Abb. 4) (Schwarz et al., 2013). Dieses *Proton-Leak* führt zu einer geringen Entkopplung von Substratoxidation und ATP-Synthese, macht in Ratten etwa 25% des Grundumsatzes aus und könnte ein Schutzmechanismus vor übermäßiger ROS-Produktion sein (Brand, 2000). Über 90% der myokardialen Energieproduktion entfällt auf die mitochondriale oxidative Phosphorylierung (Gupta and Houston, 2017; Kolwicz et al., 2013).

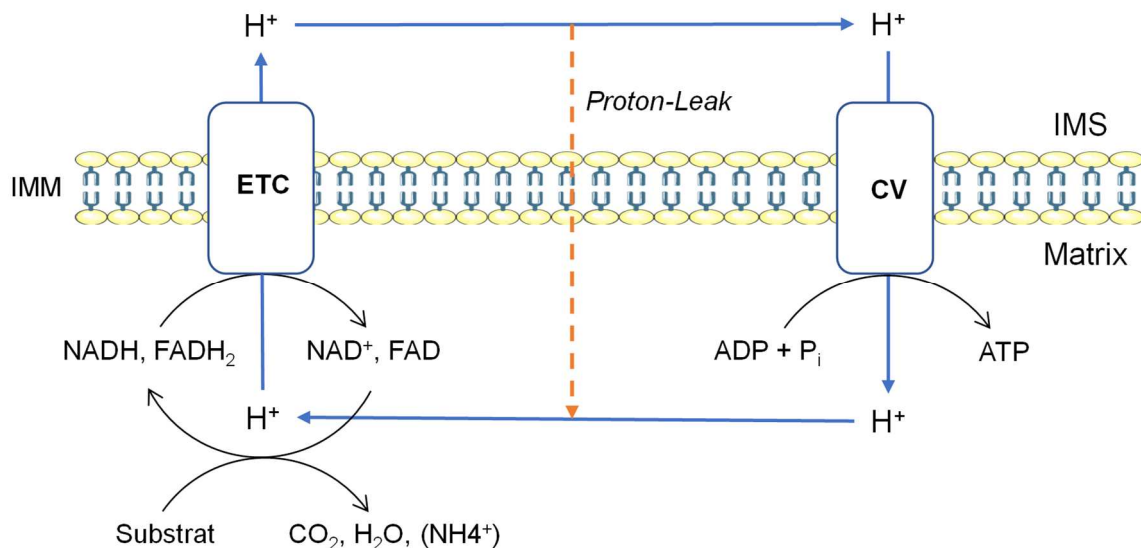


Abb. 4: Schematische Darstellung der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung. Protonenwiedereinstrom geschieht nicht nur durch Complex V, sondern auch über das sogenannte Proton-Leak, das durch die Membran selbst, durch Uncoupling-Proteine (UCPs) und ferner durch diverse mitochondriale Transporter generiert wird. Das Bildelement IMM wurde entnommen aus Servier Medical Art und modifiziert; lizenziert unter Creative Commons Attribution 3.0 Unported License. <http://smart.servier.com>

Der Energiebedarf des Herzens variiert in Abhängigkeit von der Belastung des Herz-Kreislaufsystems. Aus diesem Grund muss die Energieproduktion der Mitochondrien nach Bedarf gesteigert oder gesenkt werden. Calcium ist ein wichtiges Steuerelement der Aktivität diverser mitochondrialer Enzymsysteme (Luongo et al., 2015). β -adrenerge Stimulation des Herzens wirkt durch Erhöhung der kardiomyozytären Calcium-Freisetzung während der elektromechanischen Kopplung positiv inotrop. Ein Teil dieses Calciums akkumuliert in den Mitochondrien und aktiviert dort diverse Dehydrogenasen des Citrat-Zyklus (Luongo et al., 2015). Mitochondrien nehmen Calcium unter anderem durch den Kanal MCU (*mitochondrial calcium uniporter*) der inneren Mitochondrienmembran auf und das mitochondriale Membranpotential von etwa -160 mV ist die dafür notwendige Triebkraft (Kirichok et al., 2004). Es wurde gezeigt, dass Mäuse mit kardiomyozytärem MCU-KO unter Basalbedingungen unauffällig sind, auf β -adrenerge Stimulation hin aber eine im Vergleich zur Kontrolle verringerte Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen und eine erhöhte NAD^+/NADH -Ratio sowie eine im Vergleich zur Kontrolle verringerte Kontraktilitätssteigerung zeigen (Luongo et al., 2015). Dies weist darauf hin, dass der MCU eine entscheidende Rolle in der Calcium-vermittelten Anpassung der Energieproduktion an den Energiebedarf spielt (Luongo et al., 2015).

1.4.4 AKT und die Mitochondrienfunktion

Es ist bekannt, dass Insulin AKT-abhängig zu einer GLUT4-vermittelten Aufnahme von Glucose in die Zellen führt und zudem die Glykolyse stimuliert (Bertrand et al., 2008), die Rolle von Insulin und AKT in der mitochondrialen ATP-Gewinnung ist jedoch nicht vollständig geklärt.

In der Literatur finden sich insbesondere im Kontext der Auswirkungen von Diabetes mellitus auf die Herzfunktion zahlreiche interessante Hinweise, die zur Aufklärung der Funktion von AKT hinsichtlich der zellulären Bioenergetik beitragen können.

Diabetes mellitus ist eine Erkrankung gestörter Insulinsekretion und/oder gestörter Insulinwirkung (Taegtmeyer et al., 2002) und es gibt zahlreiche Hinweise, dass Diabetes mellitus mit einer mitochondrialen Dysfunktion einhergeht. Es wurde gezeigt, dass Typ 2 Diabetiker ohne koronare Herzkrankheit (KHK) oder echokardiographisch nachweisbarer kardialer Dysfunktion ein um 35% vermindertes Phosphokreatin/ATP-Verhältnis aufweisen (Scheuermann-Freestone et al., 2003), was auf Störungen des Energiemetabolismus hinweist. Mausmodelle für Typ 1 und Typ 2 Diabetes weisen einen erhöhten Sauerstoffverbrauch und eine reduzierte myokardiale Effizienz auf (How et al., 2006). Eine weitere Arbeitsgruppe beobachtete in einem Mausmodell für Typ 2 Diabetes eine gestörte oxidative Phosphorylierung und eine Fettsäure-induzierte mitochondriale Entkopplung der Atmungskette, die auf ein verstärktes UCP-vermitteltes *Proton-Leak* zurückzuführen sein könnte und die mit gesteigertem Sauerstoffverbrauch sowie reduzierter kardialer Effizienz einherging (Boudina et al., 2007). Anderson und Kollegen zeigten außerdem, dass Kardiomyozyten aus atrialem Gewebe von Typ 2 Diabetikern neben einer reduzierten respiratorischen Kapazität unter Glutamat- und Fettsäureoxidation zusätzlich eine erhöhte mitochondriale H_2O_2 -Freisetzung, ein reduziertes Glutathion/Glutathiondisulfid-Verhältnis und einen erhöhten Gehalt an ROS-modifizierten Proteinen aufweisen (Anderson et al., 2009). Insgesamt zeigen sich also sowohl in Diabetes-Patienten als auch an Mausmodellen für Typ 1 und Typ 2 Diabetes deutliche Hinweise auf eine gestörte myokardiale Mitochondrienfunktion. Der Beitrag des gestörten myokardialen Insulin-Signalwegs zu dieser mitochondrialen Dysfunktion lässt sich anhand dieser Studien jedoch nur schwierig bestimmen, da Diabetes mellitus mit vielen systemischen metabolischen Veränderungen einhergeht (Boudina et al., 2009).

Aus diesem Grund untersuchten Boudina und Kollegen die Herzfunktion sowie die myokardiale Bioenergetik von Mäusen mit kardiomyozytärem *Knockout* des Insulin-Rezeptors (Boudina et al., 2009). In *cardiac insulin receptor KO*-Mäusen (CIRKO) wurde gezeigt, dass die Herzen dieser Mäuse eine geringgradig eingeschränkte Kontraktilität aufweisen (Boudina et al., 2009). CIRKO-Kardiomyozyten zeigten weiterhin eine verringerte respiratorische Kapazität und ATP-Produktion sowie bei Respiration unter Fettsäureoxidation Hinweise auf eine Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung (Boudina et al., 2009). Zudem waren in CIRKO-Kardiomyozyten diverse Enzyme des Citrat-Zyklus und der Fettsäureoxidation verringert exprimiert und die Mitochondrien wiesen eine erhöhte H_2O_2 -Produktion auf. Interessanterweise zeigte sich nach Behandlung der CIRKO-Kardiomyozyten mit MnTBAP (*Mn(III)tetrakis(4-benzoic acid)porphyrin*; Mimetikum der Superoxiddismutase) eine Normalisierung der Kopplung der oxidativen Phosphorylierung sowie der Aktivität des ROS-sensiblen Enzyms Aconitase (Boudina et al.,

2009). Mäuse mit isoliert kardiomyozytär ausgeschaltetem Insulin-Signalweg zeigen also ebenso wie die diabetischen Mäuse Hinweise auf eine mitochondriale Dysfunktion, die mit verminderter respiratorischer Kapazität, erhöhter ROS-Produktion und Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung einhergeht. Dies lässt darauf schließen, dass diese Veränderungen in den diabetischen Mäusen zumindest teilweise auf fehlende Insulin-Effekte zurückzuführen sind. AKT ist ein zentraler Effektor stromabwärts des Insulinrezeptors. Inwieweit die aufgrund des gestörten Insulin-Signalwegs auftretende mitochondriale Dysfunktion auf eine verminderte AKT-Aktivität zurückzuführen ist, ist fraglich.

Eine weitere Arbeitsgruppe beobachtete, dass in Streptozotozin (STZ)-behandelten Mäusen (absoluter Insulinmangel durch Zerstörung der β -Zellen) die Aktivität von Complex V um 36% reduziert ist und dass Insulinstimulation diese reduzierte Aktivität PI3K-abhängig und unter Translokation von phosphoryliertem AKT in die Mitochondrien ausgleicht (Yang et al., 2009). Insulin führte auch zu einer Complex V-Aktivitätssteigerung in Kontrollherzen. Diese fiel geringer aus als in den STZ-Herzen und höher als in einem Maus-Modell für Insulinresistenz (Yang et al., 2009). Vier Jahre später zeigte die gleiche Arbeitsgruppe, dass phosphoryliertes AKT nach Insulinstimulation sequentiell über die äußere Mitochondrienmembran, den Intermembranraum und die innere Mitochondrienmembran in die mitochondriale Matrix transloziert (Yang et al., 2013). In normalem Myokard translozierte auf Insulinstimulation hin nur AKT1 in die Mitochondrien. Globale AKT2-KO-Mäuse zeigten keine beeinträchtigte Complex V-Aktivität, während diese bei AKT1-KO-Mäusen reduziert war, was durch Insulin-vermittelte kompensatorische AKT2-Translokation in die Mitochondrien ausgeglichen werden konnte (Yang et al., 2013). Transduktion von nicht-diabetischem Rattenmyokard mit konstitutiv aktivem AKT1 mit Mitochondrien-Lokalisationssequenz (Ad-Mito-AKT1) führte zu einer Steigerung der Complex V-Aktivität um 24%. Kardiomyozyten mit transduziertem Ad-Mito-AKT zeigten zudem im Vergleich zur Kontrolle erhöhte ATP- und Phosphokreatin-Konzentrationen sowie ein erhöhtes Phosphokreatin/ATP-Verhältnis (Yang et al., 2013). Diese Ergebnisse demonstrieren, dass es eine Stimulation der mitochondrialen Bioenergetik durch AKT geben könnte. Vorherige Arbeiten unseres Instituts haben außerdem eine AKT-Phosphorylierungsstelle an Complex V der Atmungskette identifiziert (Lachmann, 2018). Direkte Phosphorylierung von Complex V durch AKT könnte ein Mechanismus für die von Yang und Kollegen beobachtete Complex V-Stimulation durch AKT sein.

Es ist bekannt, dass die verschiedenen AKT-Isoformen teilweise funktionell überlappen. Durch unsere Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass kardiomyozytäre AKT1/2-DKO (iCM-AKT1/2-DKO) innerhalb weniger Wochen nach Induktion eine dilatative Kardiomyopathie mit reduzierter Ejektionsfraktion entwickeln, während kardiomyozytäre AKT-Einzel-KOs lebensfähig sind und keine reduzierte Herzfunktion aufweisen (Goedecke et al., 2017). An Tag 21 nach Induktion an iCM-AKT1/2-DKO-Herzen durchgeführte Transkriptom-Analysen zeigten eine

verminderte Transkription von Genen, die an Citrat-Zyklus, oxidativer Phosphorylierung sowie β -Oxidation beteiligt sind und weisen somit darauf hin, dass es im Rahmen der Pathogenese der Kardiomyopathie zu einer massiven mitochondrialen Dysfunktion kommen könnte (Goedcke et al., 2017).

1.5 Fragestellung

Es gibt viele Hinweise auf eine Beteiligung von AKT an der Regulation der myokardialen Bioenergetik. So wurde anhand von Einzelkomplexmessungen an mitochondrialen Membranfragmenten gezeigt, dass AKT die basale Aktivität von Complex V beeinflussen kann (Yang et al., 2013). Ebenfalls beobachteten Yang und Kollegen, dass Insulin unter AKT-Translokation in die Mitochondrien die Complex V-Aktivität akut steigert (Yang et al., 2009). Ob AKT die Funktion intakter Mitochondrien beeinflusst, ist bisher unklar. In dieser Arbeit wurde mittels Respirometrie die Funktion intakter myokardialer Mitochondrien aus Wildtyp-Mäusen und kardiomyozytären AKT1- und AKT2-KO-Mäusen (iCM-AKT1-KO, iCM-AKT2-KO) unter basalen Bedingungen (-Ins) sowie nach Insulin-Stimulation (+Ins) gemessen, um einerseits die Effekte des dauerhaften Verlustes von jeweils einer AKT-Isoform und andererseits die Effekte einer akuten Insulinstimulation auf die Mitochondrienfunktion zu untersuchen.

Es ist bekannt, dass die verschiedenen AKT-Isoformen funktionell überlappen, aber auch isoformspezifische Effekte aufweisen. In unserem Institut generierte iCM-AKT1/2-DKO entwickeln innerhalb von 28 Tagen nach Induktion eine Kardiomyopathie mit Hinweisen auf mitochondriale Dysfunktion, während iCM-AKT-Einzel-KOs lebensfähig sind und keine Herzinsuffizienz zeigen. Es stellte sich daher die Frage, inwieweit AKT1 und AKT2 im Kontext myokardialer Bioenergetik funktionell überlappen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden deshalb zusätzlich respirometrische Messungen an intakten kardiomyozytären Mitochondrien aus Wildtyp-Mäusen und iCM-AKT1/2-DKO durchgeführt.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Geräte und Chemikalien

Geräte	Hersteller
Eismaschine	Ziegra Eismaschinen GmbH
Eisschrank (-20°C)	Liebherr ProfiLine
Kühlschrank (+4°C)	Liebherr Premium NoFrost
Magnetrührer	IKA Labortechnik RCT basic
Messkammer	Strathkelvin Instruments Mito-Cell MT200
Sauerstoff-Elektrode	Strathkelvin Instruments Oxygen-Meter
Wasserbad	Haake P5 Wasserbad mit Julabo MP circulator
Zentrifuge	MegaStar 1.6R VWR
Wärmeschrank	Heraeus Instruments
Waage	Sartorius BP 121S
pH-Meter	Knick Digital pH-Meter
Plate-Reader	Packard SpectraCount
Stoppuhr	Oregon Scientific
Vortexer	Heidolph REAX top
Homogenisator	Potter Elvehjem Tissue Grinder
milliQ Wasser	milliPore
Pipetten Pipetman 10-1000µl	Gilson
Mikroliter-Spritzen	Hamilton
SDS-PAGE Laufkammer	Hoefler Instruments
Rotor Shake-Genie	Scientific Industries
Pierce G2 Fast Blotter	Thermo Scientific
Odyssey Scanner	Licor Biosciences

Respirationspuffer:

Chemikalien	Summenformel	Konzentration	Hersteller
Kaliumchlorid	KCl	110 mM	Merck
Dikaliumhydrogenphosphat	K ₂ HPO ₄	5 mM	Merck
MOPS	C ₇ H ₁₅ NO ₄ S	10 mM	Sigma-Aldrich
EGTA	C ₁₄ H ₂₄ N ₂ O ₁₀	2,5 mM	Sigma-Aldrich
Tetrasodiumpyrophosphat	Na ₄ P ₂ O ₇	1 mM	Sigma-Aldrich
BSA free fatty acid free	-	0,1 %	Roche
pH 7,15 (titriert mit KOH und HCl)			

Isolationspuffer:

Chemikalien	Summenformel	Konzentration	Hersteller
D-Mannitol	C ₆ H ₁₄ O ₆	200 mM	Sigma-Aldrich
D-Saccharose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	50 mM	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	K ₂ HPO ₄	5 mM	Merck
MOPS	C ₇ H ₁₅ NO ₄ S	5 mM	Sigma-Aldrich
EGTA	C ₁₄ H ₂₄ N ₂ O ₁₀	1 mM	Sigma-Aldrich
BSA free fatty acid free	-	0,1 %	Roche
pH 7,15 (titriert mit KOH und HCl)			

Substrate:

Bezeichnung	Chemikalien	Summenformel	Ali- quots	Endkon- zentra- tion	Hersteller
Complex I Substrat	Pyruvat	C ₃ H ₃ NaO ₃	1 M	10 mM	Sigma-Aldrich
	L-Glutamat	C ₅ H ₈ NNaO ₄	2 M	20 mM	Sigma-Aldrich
	L-Malat	C ₄ H ₆ O ₅	0,4 M	0,8 mM	Sigma-Aldrich
Complex II Substrat	Succinat	C ₄ H ₄ Na ₂ O ₄	1,25 M	10 mM	Sigma-Aldrich
	Rotenon	C ₂₃ H ₂₂ O ₆	1 mM	0,002 mM	Sigma-Aldrich
Complex IV Substrat	TMPD	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ ·2HCl	100 mM	1 mM	Sigma-Aldrich
	L-Ascorbat	C ₆ H ₇ NaO ₆	1 M	10 mM	Sigma-Aldrich
β-Oxidation und Com- plex I	Palmitoyl-l-carnitin	C ₂₃ H ₄₆ NO ₄ ·Cl	4 mM	0,04 mM	Sigma-Aldrich
	Malat	C ₄ H ₆ O ₅	100 mM	1 mM	Sigma-Aldrich
Entkoppler	CCCP	C ₉ H ₅ ClN ₄	10 mM	0,002 mM	Sigma-Aldrich
ADP	ADP	C ₁₀ H ₁₄ KN ₉ O ₁₀ P ₂ ·2H ₂ O	25 mM	0,25 mM	Sigma-Aldrich
	ADP	C ₁₀ H ₁₄ KN ₉ O ₁₀ P ₂ ·2H ₂ O	200 mM	2 mM	Sigma-Aldrich

Western Blot Analyse

Sammelgel	Trenngel 12,5 %	4x Lämmli-Puffer
3,7 ml H ₂ O 625 µl 40 % Acrylamid 625 µl 1 M Tris pH 6,8 50 µl 10 % SDS 10 µl Temed 15 µl 10 % APS	4,375 ml H ₂ O 3,125 ml 40 % Acrylamid 2,5 ml 1,5 M Tris pH 8,8 100 µl 10 % SDS 20 µl Temed 25 µl 10 % APS	250 mM Tris-HCl pH 8,8 8 % SDS 35 ml Glycerin/100 ml 0,03 % Bromphenolblau 100 mM DTT

Laufpuffer	Anodenpuffer	Kathodenpuffer
25 mM Tris 200 mM Glycin 0,1 % SDS	300 mM Tris 200 mM Tricin pH 8,8	300 mM Aminocaprinsäure 30 mM Tris pH 8,7

TBS	TBST
150 mM NaCl 25 mM Tris-HCl pH 7,4	150 mM NaCl 25 mM Tris-HCl 0,1 % Tween-20 pH 7,4

Antikörper:

Name	Spezies	Verdünnung	Hersteller	Nummer
Akt (pan) (40d4)	mouse	1:2000	Cell Signaling	#2920
Phospho-Akt (Ser 473)	rabbit	1:1000	Cell Signaling	#9271
Akt1 (2H10)	mouse	1:1000	Cell Signaling	#2967
Akt2 (D6G4)	rabbit	1:1000	Cell Signaling	#3063
GAPDH (14C10)	rabbit	1:1000	Cell Signaling	#2118
Anti-Mouse IRDye® 680	goat	1:10.000	LI-COR	926-32220
Anti-Rabbit IRDye® 800	goat	1:10.000	LI-COR	926-32211

Reagenzien/Kits/sonstige Chemikalien:

- Bradford-Reagenz (Bio-Rad *Protein Assay Dye Reagent Concentrate*)
- BCA-Kit (Pierce™ *BCA Protein Assay Kit*)
- Protease aus *Bacillus licheniformis* (Sigma Aldrich)
- Natriumsulfit (Sigma Aldrich)
- Insulin (Insuman Rapid, Sanofi)
- *Phosphate Buffered Saline* (PBS)
- Licor *Odyssey Blocking Buffer* (TBS)

2.2 Tiere

In dieser Arbeit wurden Mäuse mit induzierbarem kardiomyozytärem AKT1- und AKT2-Einzel-*Knockout* (iCM-AKT1-KO, iCM-AKT2-KO) sowie Mäuse mit induzierbarem kardiomyozytärem AKT1/2-Doppel-*Knockout* (iCM-AKT1/2-DKO) verwendet. Der *Knockout* wurde mithilfe des Cre-loxP-Systems herbeigeführt.

Das Cre-loxP-System ist ein sequenzspezifisches Rekombinationssystem und stammt aus der Bakteriophage P1. Diese kann mittels der Rekombinase Cre (*causes recombination*) gezielt an DNA-Sequenzen, welche von sogenannten loxP-Sites (*locus of crossing over*) flankiert sind, Rekombination initiieren (Hoess et al., 1982; Sternberg and Hamilton, 1981). Das Cre-loxP-System wird genutzt, um in Zell-Linien und Tieren loxP-markierte Gene auszuschneiden und somit zu deletieren (Zhang et al., 1996).

Durch Fusion mit der Hormonbindungsdomäne (HBD) von Steroidrezeptoren können bestimmte Proteine auf Ligandenbindung an die HBD hin aktiviert werden (Littlewood et al., 1995). Die G525R-Mutante der HBD des Östrogenrezeptors ist Östrogen-unsensibel, reagiert aber auf die Bindung von selektiven Östrogenrezeptormodulatoren wie 4-OH-Tamoxifen (4-Hydroxytamoxifen) und kann mit Proteinen fusioniert werden, die daraufhin gezielt durch Gabe von 4-OH-Tamoxifen aktiviert werden können (Littlewood et al., 1995).

Um den Zeitpunkt der Cre-Aktivierung und Zielgen-Deletion zu kontrollieren, kann ein Fusionsprotein aus Cre und dieser mutierten Hormonbindungsdomäne verwendet werden (Zhang et al., 1996). Die Gabe von 4-Hydroxytamoxifen führt in Tieren, die das Fusionsprotein MerCreMer (*Mer=mutated estrogen receptor*) exprimieren, zur Freisetzung von MerCreMer aus einem inhibitorischen Komplex aus Hitzeschockproteinen (HSP) und somit zur Cre-Aktivierung (Zhang et al., 1996). Um einen gewebsspezifischen *Knockout* zu generieren, kann die Expression von Cre zudem unter die Kontrolle eines gewebsspezifischen Promotors gestellt werden (Zhang et al., 1996).

Sohal und Kollegen generierten durch Kopplung der MerCreMer-cDNA an den kardiomyozytär-spezifischen α -MHC-Promotor transgene Mäuse mit ausschließlich kardiomyozytär exprimierter Cre-Rekombinase (Sohal et al., 2001).

In Abbildung 5 ist die Tamoxifen vermittelte KO-Induktion mittels des Cre-loxP-Systems schematisch dargestellt.

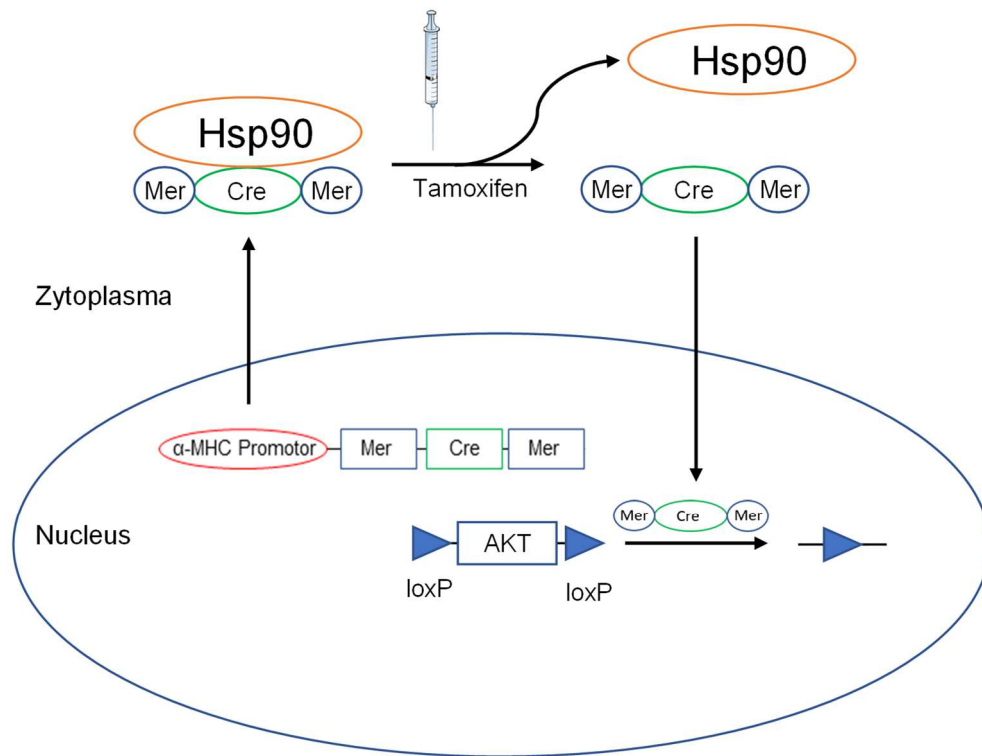


Abb. 5: Schematische Darstellung der AKT-Knockout-Induktion mittels Tamoxifen im Cre-loxP-System. Für Details siehe Text. Modifiziert nach Kim et al., 2018. Das Bildelement Spritze wurde aus der Bibliothek von Servier Medical Art entnommen und modifiziert; lizenziert unter Creative Commons Attribution 3.0 Unported License. <http://smart.servier.com>

Die in den Experimenten dieser Arbeit verwendeten Mäuse hatten den genetischen Hintergrund C57BL/6 und wurden durch Kreuzung von α -MHC-MerCreMer-Tieren mit AKT-gefloxten Mäusen generiert (Raupach, 2011). Der Knockout wurde im Alter von drei bis vier Monaten durch intraperitoneale Injektion von 4-OH-Tamoxifen (20 mg/kg KG/Tag) über fünf Tage induziert. Die Experimente an den iCM-AKT1/2-Einzel-KOs fanden mit einem Abstand von mindestens vier Tagen zur letzten 4-OH-Tamoxifen-Injektion statt und die Experimente an den iCM-AKT1/2-Doppel-KOs fanden 21 Tage nach Beginn der 4-OH-Tamoxifen-Injektionen statt. Bei den Doppel-KOs war ein konstanter zeitlicher Abstand zwischen KO-Induktion und Messung wichtig, da sich die Herzfunktion dieser Mäuse nach KO-Induktion kontinuierlich verschlechtert. Die Einzel-KOs zeigen demgegenüber nach KO-Induktion einen stabilen Phänotyp, weswegen bei diesen Mäusen auf einen konstanten zeitlichen Abstand zwischen Induktion und Experiment verzichtet wurde. Die Mäuse wurden in den Räumen der Zentralen Einrichtung

für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gehalten. Die Tierversuche wurden durch das Landesamt für Natur-, Umwelt- und Verbraucherschutz (LANUV) behördlich genehmigt (Aktenzeichen 84-02.04.2014.A308).

2.3 Insulinstimulation

Den Mäusen wurde vor der Organentnahme und Mitochondrienisolation für vier Stunden das Futter entzogen, um eine Stimulation des AKT-Signalwegs durch endogene Insulin-Sekretion zu minimieren. Die respirometrischen Messungen wurden an jedem Experimenttag an isolierten kardiomyozytären Mitochondrien aus jeweils zwei Mäusen durchgeführt. Anschließend erhielt eine der beiden Mäuse eine gewichtsadaptierte Insulininjektion (30 IU/kg) i.p. (+Ins Gruppe) und die andere eine PBS-Injektion (-Ins Gruppe). 15 Minuten nach der Injektion wurden die Mäuse mittels zervikaler Dislokation getötet und die Herzen wurden entnommen. Im Anschluss daran erfolgte die Mitochondrienisolation.

2.4 Mitochondrienisolation

Das Protokoll zur Mitochondrienisolation dieser Arbeit wurde in modifizierter Form aus Vorarbeiten (Heinen et al., 2007a, 2007b) entnommen und ist in Abbildung 6 dargestellt. Die Herzen wurden im Anschluss an die Organentnahme in auf 4°C gekühlten Isolationspuffer gegeben. Alle weiteren Schritte der Mitochondrienisolation fanden bei 4°C statt. Die Herzen wurden in Isolationspuffer auf Stücke von etwa 1 mm³ zerkleinert und dabei 2-fach mit Isolationspuffer gewaschen. Anschließend wurden die Fragmente mit 6 µl Protease versetzt und für ca. 30 Sekunden in 1 ml Isolationspuffer homogenisiert. Nach Zugabe von 5 ml Isolationspuffer wurden die Fragmente nochmals für 30 Sekunden homogenisiert. Die Mitochondrienisolation aus dem Homogenisat erfolgte mittels Differentialzentrifugation. Zunächst wurde das Homogenisat für 10 Minuten bei 3200 G zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 5 ml Isolationspuffer resuspendiert und anschließend für 10 Minuten bei 500 G zentrifugiert. Der dabei entstandene Überstand wurde in einem dritten Schritt für 10 Minuten bei 3200 G zentrifugiert und das finale Pellet wurde je nach Größe in 150 bis 250 µl Isolationspuffer resuspendiert.

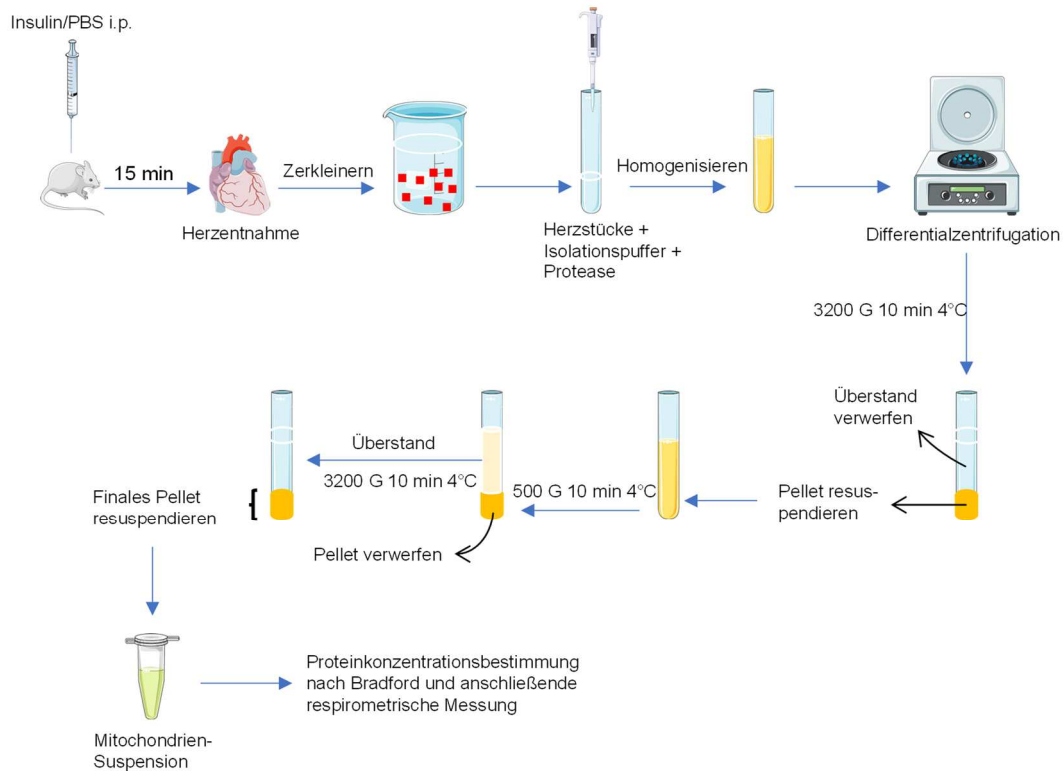


Abb. 6: Darstellung des Protokolls zur Mitochondrienisolierung. Weitere Details werden im Text unter 2.4 beschrieben. Die Bildelemente Maus, Spritze, Herz, Becherglas, Pipette, Zentrifuge, Reagenzglas und Eppendorf-Gefäß wurden aus der Bibliothek von Servier Medical Art entnommen und modifiziert; lizenziert unter Creative Commons Attribution 3.0 Unported License. <http://smart.servier.com>

2.5 Proteinkonzentrationsbestimmung

Nach der Mitochondrienisolierung wurde der Proteingehalt der Mitochondriensuspension mittels eines Bradford-Assays (siehe 2.5.1) bestimmt. Um die zeitliche Verzögerung bis zur respirometrischen Messung zu minimieren, wurde durch eine vorab pipettierte BSA-Standardreihe (*bovine serum albumin*) eine Standardkurve erstellt, mithilfe derer ausgehend von der gemessenen Extinktion die Proteinkonzentration der Mitochondriensuspension berechnet wurde. Da die Bestimmung der Standardkurve und die Messung der Proteinkonzentration nicht zeitgleich erfolgten, könnten die auf diese Weise ermittelten Proteinkonzentrationen ungenau sein. Aus diesem Grund wurden im Anschluss an die respirometrischen Messungen zur Kontrolle der Bradford-Resultate BCA-Assays (siehe 2.5.2) durchgeführt. Der gemessene Sauerstoffverbrauch der isolierten Mitochondrien wurde anhand des Verhältnisses der Bradford- und BCA-Resultate normalisiert.

2.5.1 Bradford-Assay

Der Bradford-Assay beruht auf der Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine, wodurch sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm auf 595 nm verschiebt (Bradford, 1976). Coomassie Brilliant Blue G-250 wechselt bei steigendem pH-Wert von einer kationischen über eine neutrale zu einer anionischen Form. Die kationische Form hat ein Absorptionsmaximum bei 470 nm , die neutrale Form bei 650 nm und die anionische

Form bei 595 nm (Compton and Jones, 1985). Die Bindung an Proteine erfolgt über ionische und nicht-ionische Wechselwirkungen, wodurch das Gleichgewicht zur anionischen Form von Coomassie Brilliant Blue G-250 verschoben wird und sich die Absorptionseigenschaften entsprechend ändern (Compton and Jones, 1985). Die Bradford-Methode erlaubt eine reproduzierbare und schnelle Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradford, 1976). BSA-Standards mit aufsteigender Proteinkonzentration erzeugen einen Anstieg der bei 595 nm gemessenen Extinktion (Bradford, 1976). Dieser Anstieg ist im Bereich zwischen 2 und 10 µg/ml linear (Zor and Selinger, 1996).

Für die Bradford-Assays wurde in dieser Arbeit das Bradford-Reagenz *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* von Bio-Rad verwendet. Die Extinktion bei 595 nm wurde mit einem Packard *SpectraCount Plate Reader* gemessen. Im Anschluss an die Experimente wurden die Mitochondrienproben bei -20°C im Eisschrank gelagert und es wurde zur Kontrolle der Proteinkonzentration jeweils ein BCA-Assay durchgeführt.

2.5.2 BCA-Assay

Im Rahmen der Biuret-Reaktion kommt es zu Reduktion von Cu^{2+} -Ionen zu Cu^{1+} -Ionen durch Proteine. Bicinchoninsäure bildet einen Komplex mit einwertigem Kupfer, der eine intensiv-violette Färbung aufweist (Smith et al., 1985). Die Intensität der Färbung ist in einem breiten Bereich proportional zur Proteinkonzentration (Smith et al., 1985). Das Absorptionsmaximum des Bicinchoninsäure-Kupfer-Komplexes liegt bei 562 nm (Smith et al., 1985).

Für die BCA-Assays wurde in dieser Arbeit das Pierce™ *BCA Protein Assay Kit* verwendet. Die Extinktion bei 577 nm wurde mit einem Packard *SpectraCount Plate Reader* gemessen.

2.6 Messung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs

Nach Bestimmung der Proteinkonzentration der Mitochondriensuspension mittels Bradford-Assay wurde der Sauerstoffverbrauch der isolierten Mitochondrien mithilfe einer Clark-Typ-Sauerstoffelektrode (*Oxygen-Meter* von Strathkelvin Instruments) und einer Messkammer (*Mito-Cell* MT200 von Strathkelvin Instruments) in Abhängigkeit unterschiedlicher Substrate gemessen. Durch Anschluss der *Mito-Cell* an ein Wasserbad (Haake P5) über einen Zirkulator (Julabo MP *circulator*) wurde die Temperatur in der Messkammer während der Experimente auf 30°C eingestellt und aufrechterhalten. Die Messkammer der *Mito-Cell* MT200 hat ein Volumen von 500 µl. Vor jeder Messung wurde die Mitochondriensuspension mit Respirationspuffer auf ein Volumen von 600 µl mit der Proteinkonzentration 0,1 µg/µl verdünnt, sodass die in der Messkammer vorhandene Proteinmenge während jeder Messung 50 µg betrug. Der Sauerstoffgehalt in der Kammer wurde kontinuierlich gemessen und der Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien in nmol O_2 /mg Protein/Minute berechnet. Substrate wurden während der Messungen mit Hamilton-Spritzen in die Messkammer injiziert. Im Folgenden wird die

Funktionsweise der Sauerstoffelektrode erläutert sowie auf die Messparameter und verwendeten Substratkombinationen eingegangen.

2.6.1 Funktionsweise der Sauerstoffelektrode

Sauerstoff-Messelektroden vom Clark-Typ werden seit über 50 Jahren zur Echtzeitmessung des Sauerstoffpartialdrucks in Flüssigkeiten und Gasen genutzt. Insbesondere in der biomedizinischen Forschung finden diese Elektroden Verwendung, um den Sauerstoffverbrauch von Zellen bzw. isolierten Mitochondrien zu messen (Brand and Nicholls, 2011). Sauerstoff-Messelektroden vom Clark-Typ bestehen aus einer Platin- bzw. Gold-Kathode sowie einer Silber-Anode, die über eine Kaliumchlorid-Lösung miteinander verbunden sind (Ojuka et al., 2016). Der Kontakt zur Umgebung wird durch eine Sauerstoff-permeable Membran hergestellt (Lanza and Nair, 2009). An der Oberfläche der Platinelektrode kann Sauerstoff unter Aufnahme von Elektronen, die durch Oxidation von Silberatomen freigesetzt werden, mit Wasser zu Hydroxid-Ionen reagieren (Enderle and Bronzino, 2012). Durch das Anlegen einer Spannung von etwa 0,6 Volt wird die Redoxreaktion zwischen Sauerstoff und Silber katalysiert (Enderle and Bronzino, 2012). Unter diesen Bedingungen ist der Stromfluss zwischen Silberanode und Platinkathode proportional zum Sauerstoffgehalt der Lösung (Clark et al., 1953). Nach Kalibrierung der Elektrode mit Lösungen mit bekannter Sauerstoffkonzentration kann anhand des gemessenen Stromflusses der Sauerstoffgehalt in der Umgebung der Elektrode gemessen werden (Lanza and Nair, 2009). In Anwesenheit einer O₂-konsumierenden biologischen Probe sinkt die Sauerstoffkonzentration allmählich und durch Bildung des Differentials kann der Sauerstoffverbrauch der Probe berechnet werden (Ojuka et al., 2016). In Abbildung 7 ist die Funktionsweise der Clark-Typ-Sauerstoffelektrode schematisch dargestellt.

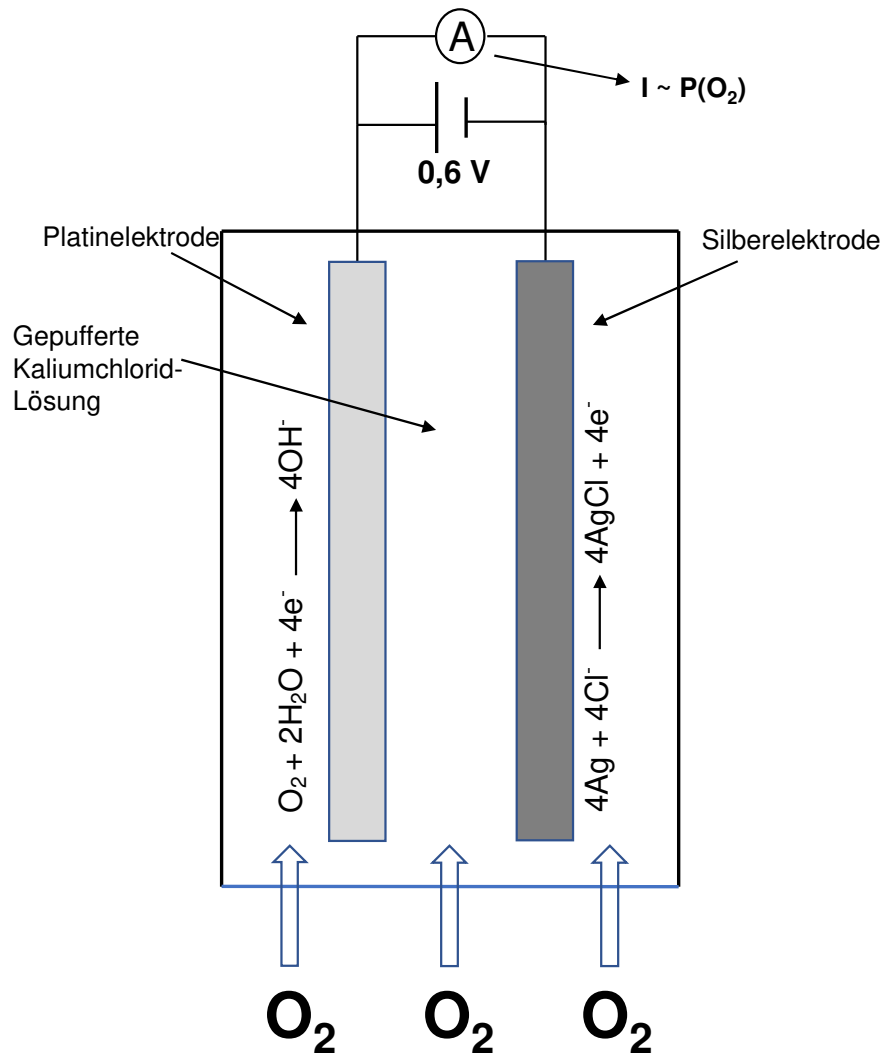


Abb. 7: Aufbau einer Clark-Elektrode zur Echtzeitmessung des Sauerstoffpartialdrucks. Sauerstoff diffundiert über eine Membran zur Platinelektrode und wird dort durch Elektronen aus der Silberelektrode reduziert. Diese Reaktion wird katalysiert durch eine angelegte Spannung von 0,6 Volt. Der Stromfluss wird durch ein Amperemeter gemessen und ist proportional zum Sauerstoffgehalt der die Elektrode umgebenden Lösung.

2.6.2 Substratkombinationen

Mitochondriale Respiration erfordert einen kontinuierlichen Fluss von Substraten und deren Produkten über die Mitochondrienmembranen zwischen Zytosol und mitochondrialer Matrix (Gnaiger, 2014). Zur Messung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauches *in vitro* ist es also notwendig, die isolierten Mitochondrien mit Substraten zu inkubieren, die von den Mitochondrien importiert und oxidiert werden können. Die in dieser Arbeit verwendeten Substratkombinationen sowie deren Import und Oxidation in den Mitochondrien werden im Folgenden erläutert.

Complex I Substrat: Pyruvat/Glutamat/Malat

Pyruvat wird über den mitochondrialen Pyruvat-Carrier (MPC) im Symport mit einem H⁺-Ion über die innere Mitochondrienmembran transportiert (Taylor, 2017). In der Matrix katalysiert die Pyruvat Dehydrogenase die Reaktion von Pyruvat zu Acetyl-CoA unter Bildung von CO₂ und Reduktion von NAD⁺ zu NADH (Patel et al., 2014). Acetyl-CoA gelangt im Anschluss in den Citrat-Zyklus. Glutamat kann entweder über den Aspartat-Glutamat-Carrier (AGC) im Antiport gegen Aspartat oder über den Glutamat-Carrier (GC) im Symport mit einem H⁺-Ion über die innere Mitochondrienmembran transportiert werden (Taylor, 2017). In der mitochondrialen Matrix wird Glutamat durch Desaminierung oder durch Transaminierung mit Oxalacetat zu α -Ketoglutarat. Die Desaminierung wird durch die Glutamat-Dehydrogenase katalysiert und liefert NADH sowie NH₄⁺. α -Ketoglutarat wird entweder durch die α -Ketoglutarat-Dehydrogenase unter NADH-Gewinn zu Succinat oxidiert oder über den Oxoglutarat-Carrier im Austausch gegen Malat aus der mitochondrialen Matrix exportiert (Gnaiger, 2014). Malat kann neben dem bereits genannten Oxoglutarat-Carrier über weitere Carrier-Systeme in die mitochondriale Matrix gelangen: Der Dicarboxylat-Carrier (DIC) transportiert Malat (aber auch Succinat) im Austausch gegen Phosphat über die innere Mitochondrienmembran (Fiermonte et al., 1999). Der Tricarboxylat-Carrier transportiert Malat im Austausch gegen Citrat oder Isocitrat sowie ein H⁺-Ion (Nicholls and Ferguson, 2013, Bioenergetics, p. 275). In der mitochondrialen Matrix wird Malat durch die Malat-Dehydrogenase unter NADH-Gewinn zu Oxalacetat umgesetzt (Gnaiger, 2014). Das durch die Oxidation von Pyruvat, Glutamat und Malat gewonnene NADH wird durch Complex I (NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase) wieder oxidiert und überträgt somit je NADH 2 Elektronen auf die mitochondriale Elektronentransportkette (Barrientos, 2002). Der Import von Malat in die mitochondriale Matrix hat zur Folge, dass Succinat im Austausch gegen Phosphat über den Dicarboxylat-Carrier exportiert wird. Auch die Succinat-*Precursor* α -Ketoglutarat, Citrat und Isocitrat werden im Austausch gegen Malat exportiert. Zusätzlich bildet sich in der mitochondrialen Matrix ein Malat-Fumarat-Gleichgewicht aus, wodurch es zur Produkt-Inhibition der Succinat-Dehydrogenase (Complex II) kommt. Je höher die eingesetzte Malat-Konzentration ist, desto geringer ist die Beteiligung von Complex II an der Respiration unter dieser Substratkombination (Gnaiger, 2014).

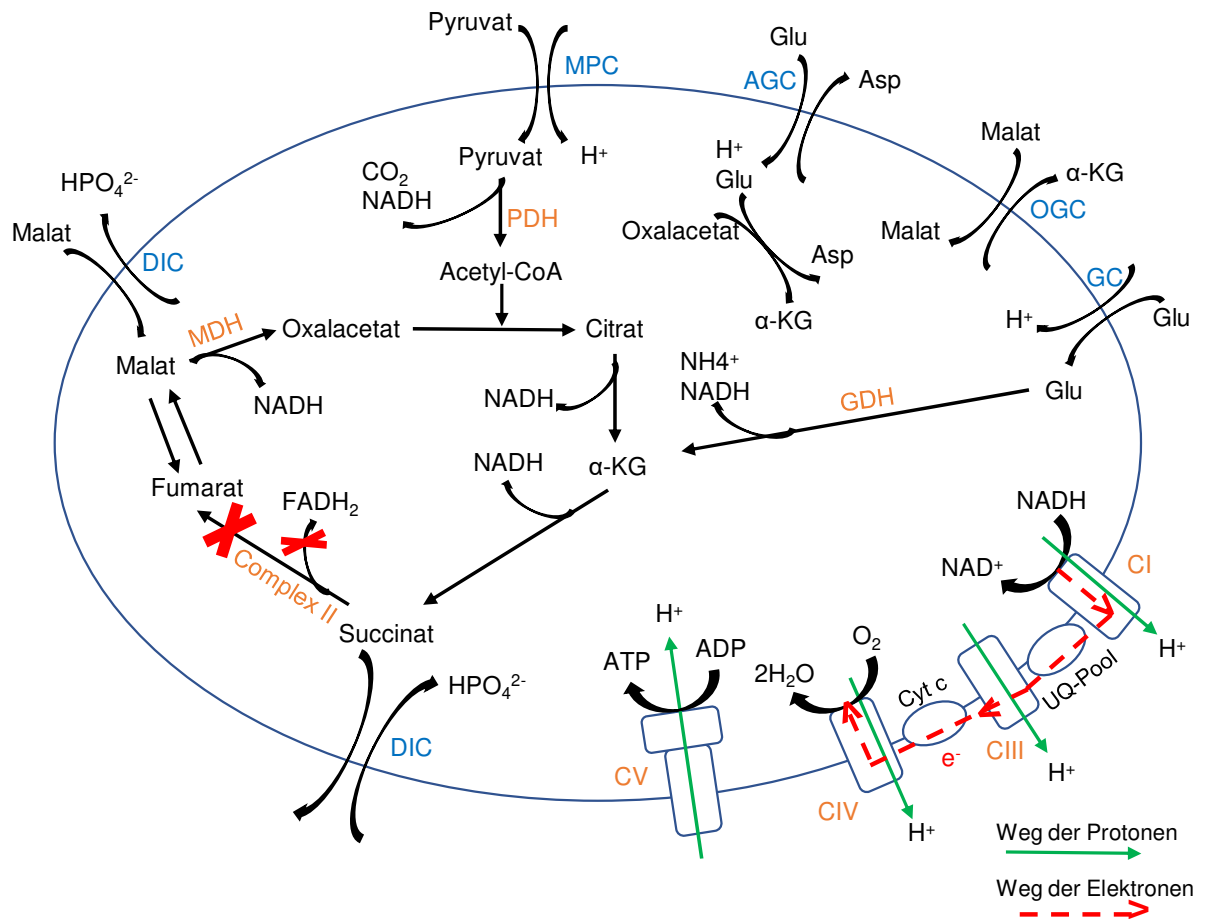


Abb. 8: Schematische Darstellung des Imports und der Verarbeitung der Substratkombination Pyruvat/Glutamat/Malat. Für Details siehe 2.6.2 unter Complex I Substrat. Modifiziert nach Gnaiger, 2014. Transporter: MPC=mitochondrialer Pyruvat-Carrier; AGC=Aspartat-Glutamat-Carrier; OGC=Oxoglutarat-Carrier; DIC=Dicarboxylat-Carrier. Enzyme: PDH=Pyruvat-Dehydrogenase; GDH=Glutamat-Dehydrogenase; MDH=Malat-Dehydrogenase.

Complex II Substrat: Succinat/Rotenon

Succinat wird über den Dicarboxylat-Carrier (DIC) im Austausch gegen Phosphat über die innere Mitochondrienmembran transportiert (Taylor, 2017). Succinat wird durch Complex II (Succinat-Dehydrogenase) auf der Matrix-Seite der inneren Mitochondrienmembran zu Fumarat oxidiert. Die Elektronen werden via FAD auf Ubichinon übertragen (Gnaiger, 2014). Durch den Complex I-Inhibitor Rotenon kommt es zur Unterbrechung der NADH-Oxidation durch Complex I, sodass Elektronen ausschließlich über Complex II in den Ubichinon-Pool gelangen. Zusätzlich kommt es aufgrund der NADH-Produktion durch die Malat-Dehydrogenase (MDH) zu einem Redox-Shift hin zu einem hohen NADH/NAD⁺-Verhältnis, wodurch NAD⁺-abhängige Dehydrogenasen wie die MDH inhibiert werden. Dadurch wird verhindert, dass es zu einer Akkumulation von Oxalacetat und somit zu einer Inhibition der Succinat-Dehydrogenase kommt (Gnaiger, 2014).

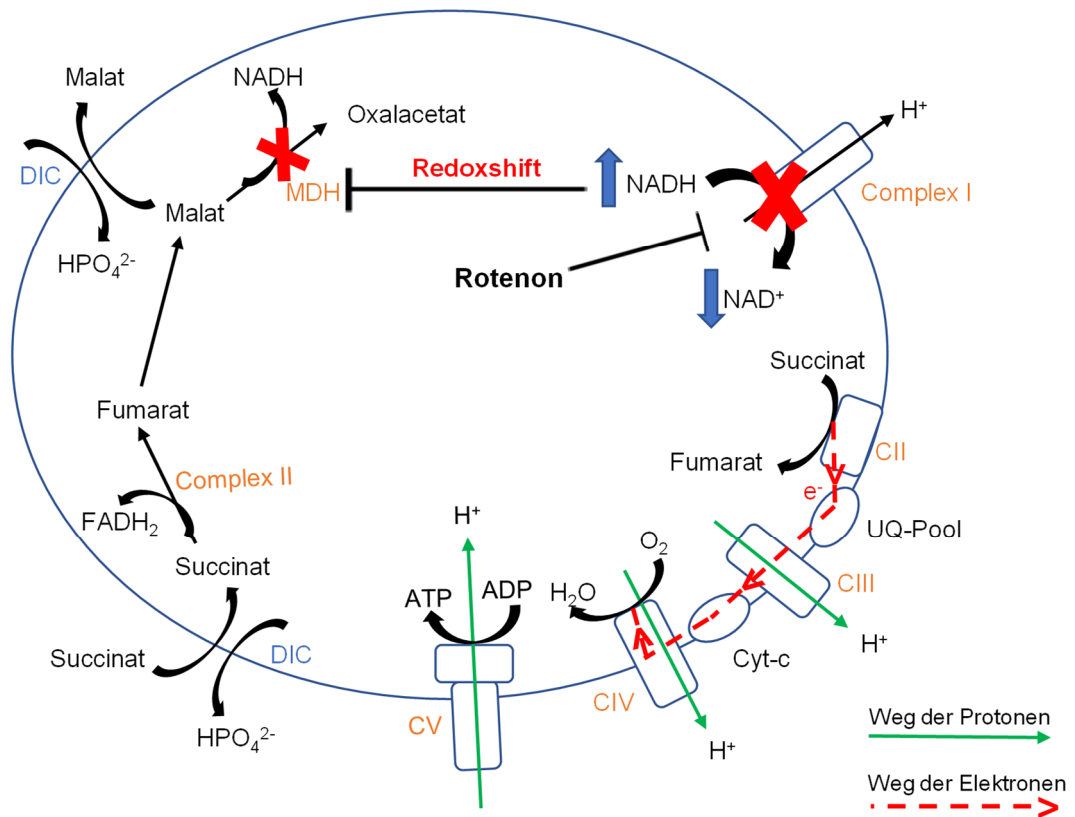


Abb. 9: Schematische Darstellung des Imports und der Verarbeitung der Substratkombination Succinat/Rotenon. Für Details siehe 2.6.2 unter Complex II Substrat. Modifiziert nach Gnaiger, 2014. Transporter: DIC=Dicarboxylat-Carrier. Enzyme: MDH=Malat-Dehydrogenase.

β -Oxidation, CETF und Complex I: Palmitoyl-I-carnitin/Malat

Palmitoyl-I-carnitin wird über die Carnitin-Acylcarnitin-Translokase (CACT) in die mitochondriale Matrix transportiert und dort durch die Carnitin-Palmitoyl-Transferase II (CPT2) in Palmitoyl-CoA überführt (van Eunen et al., 2013). Palmitoyl-CoA wird durch die Acyl-CoA-Dehydrogenase in seine Enoyl-CoA-Form überführt, wobei das Elektron transferierende Flavoprotein (ETF) reduziert wird. Dieses wird von der ETF-Ubichinon-Oxidoreduktase oxidiert, welche die Elektronen an den Ubichinon-Pool der inneren Mitochondrienmembran weitergibt (Perevoshchikova et al., 2013). Durch H_2O Addition entsteht aus Enoyl-CoA Hydroxyacyl-CoA, welches anschließend unter NADH-Gewinnung zu Ketoacyl-CoA reagiert wird. Dieses wird schließlich durch die 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase in Acetyl-CoA und ein um 2 C-Atome verkürztes Acyl-CoA überführt (Ojuka et al., 2016). Das gewonnene NADH wird von Complex I oxidiert. Mitochondriale Respiration unter Palmitoyl-I-carnitin ist langsam und kann weder durch ADP noch durch Entkopplung stimuliert werden, was vermutlich auf die Akkumulation von Acetyl-CoA und konsekutive Inhibition der 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase zurückzuführen ist (Perevoshchikova et al., 2013). Durch Kombination von Palmitoyl-I-carnitin und Malat kann eine verbesserte mitochondriale Respiration erzielt werden (Perevoshchikova et al., 2013). Addition von Malat führt durch die Malat-Dehydrogenase unter NADH-Gewinnung zu Oxalacetat, welches mit Acetyl-

CoA zu Citrat reagiert und CoA-SH freisetzt, wodurch eine Acetyl-CoA-Akkumulation verhindert wird und ausreichend CoA-SH für die β -Oxidation zur Verfügung steht (Ojuka et al., 2016; Perevoshchikova et al., 2013). Bei Verwendung der Substratkombination Palmitoyl-I-carnitin/Malat werden der Elektronentransportkette also sowohl über den ETF-Complex (CETF) als auch über Complex I Elektronen zugeführt.

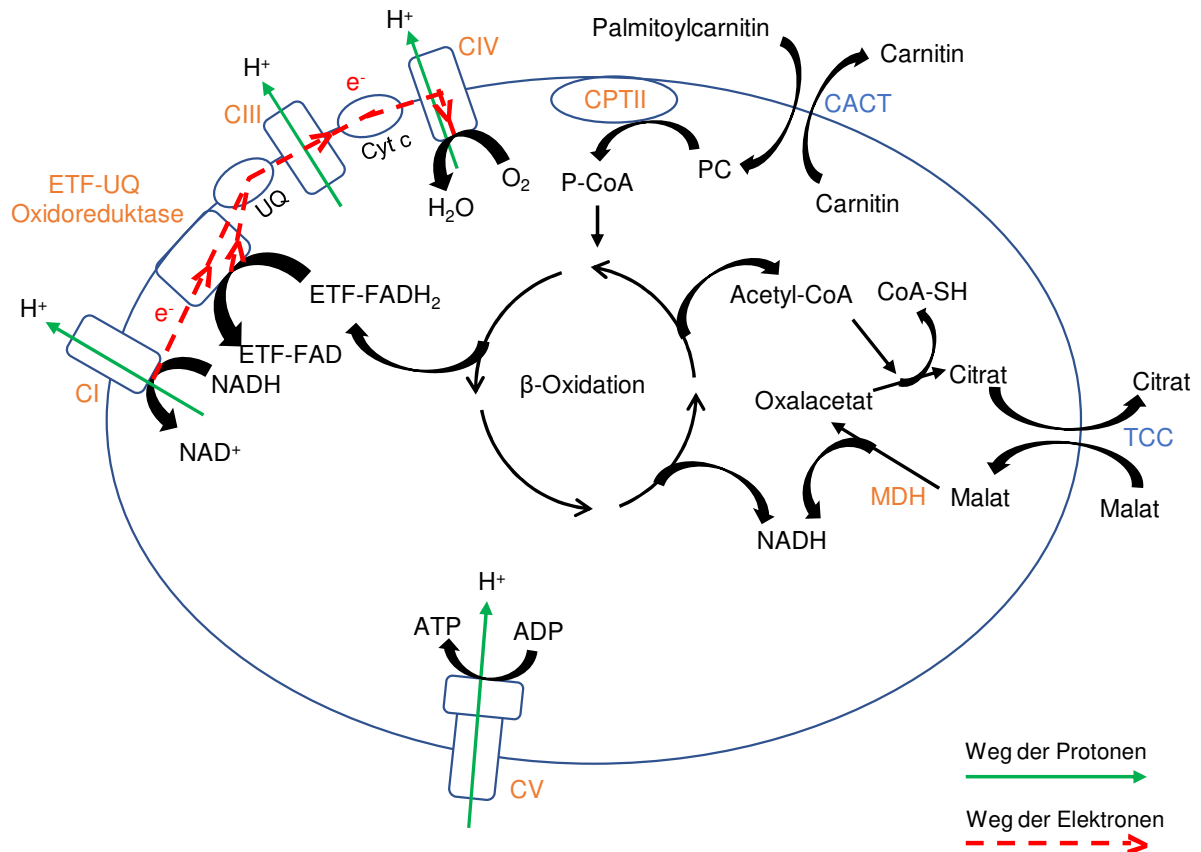


Abb. 10: Schematische Darstellung des Imports und der Verarbeitung der Substratkombination Palmitoyl-I-carnitin/Malat. Für Details siehe 2.6.2 unter β -Oxidation, CETF und Complex I. Modifiziert nach Ojuka et al., 2016. Transporter: CACT=Carnitin-Acylcarnitin-Translokase; TCC=Tricarboxylat-Carrier. Enzyme: CPTII=Carnitin-Palmitoyl-Transferase II; MDH=Malat-Dehydrogenase.

Complex IV: TMPD/Ascorbat

Die Substratkombination Tetramethyl-p-Phenylendiamin (TMPD)/Ascorbat führt über Cytochrom c zu einer Complex IV-abhängigen Respiration (Kayser et al., 2004). TMPD reduziert Cytochrom c, liefert auf diese Weise Elektronen zu Complex IV und wird seinerseits durch Ascorbat wieder reduziert (Kayser et al., 2004).

2.6.3 Gemessene Parameter

Zu Beginn jeder respirometrischen Messung wurden 600 μl Mitochondriensuspension mit einer Proteinkonzentration von 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in die Messkammer gegeben. Nach etwa einer Minute wurde das jeweilige Substrat in die Messkammer injiziert, wodurch state 2-Respiration erreicht wird. State 2 wird definiert als Respiration in Anwesenheit von Substraten und in Abwesenheit von ADP (Nicholls and Ferguson, 2013, Bioenergetics, p. 61). Diese Definition weicht von der state 2-Definition nach Chance und Williams ab, die die Anwesenheit von ADP und die Abwesenheit von exogenen Substraten als state 2 definierten (Chance and Williams, 1955). Die Respirationsrate der Mitochondrien wird bestimmt durch das thermodynamische Ungleichgewicht zwischen den Redoxpotentialdifferenzen entlang der Elektronentransportkette und der einwärts gerichteten *proton motive force* (PMF) (Nicholls and Ferguson, 2013, Bioenergetics, p. 78). In Abwesenheit von ATP-Synthese durch Complex V wird die Respirationsrate der Mitochondrien hauptsächlich durch das *Proton-Leak* bestimmt, welches den elektrochemischen Protonengradient (*proton motive force*) dissipiert (Hafner et al., 1990). In diesem Zustand wird der Protoneneinstrom über das *Proton-Leak* durch die Protonenextrusion der Elektronentransportkette (ETC) gerade ausgeglichen (Nicholls and Ferguson, 2013, Bioenergetics, p. 78).

Addition von ADP zur Substrat-haltigen Mitochondriensuspension führt zu state 3-Respiration (Heinen et al., 2007a, 2007b; Lanza and Nair, 2009). ADP wird über die Adeninnukleotid-Translokase (ANT) im Austausch gegen ATP in die mitochondriale Matrix importiert. Dadurch wird das von Complex V hergestellte Gleichgewicht zwischen ADP und ATP zum ADP verschoben, sodass Complex V verstärkt unter Protoneneinstrom ADP phosphoryliert. Dadurch wird die PMF reduziert, was das Ungleichgewicht zwischen ETC und PMF vergrößert und zu einer verstärkten Aktivität der ETC führt. Dies hat eine erhöhte Respirationsrate zur Folge (Nicholls and Ferguson, 2013, Bioenergetics, p. 78). State 3-Respiration ist etwa zu gleichen Teilen abhängig von der ATP-Umsetzung (Aktivität von Complex V, ANT und Phosphat-Carrier) und von der Substratoxidation (Aktivität von Enzymsystemen für Substratimport, Substratverarbeitung und Elektronentransportkette) (Brand and Nicholls, 2011).

Sobald sich durch die Aktivität von Complex V das Gleichgewicht zwischen ADP und ATP wiederherstellt, sinkt die Respirationsrate und state 4-Respiration stellt sich ein (Brand and Nicholls, 2011). Diese wird hauptsächlich vom *Proton-Leak* kontrolliert (Lanza and Nair, 2009). Durch Addition des Complex V-Inhibitors Oligomycin kann state 3-Respiration auch gezielt beendet werden. Den dadurch erreichten Zustand bezeichnet man als state 4_{oligo} (Brand and Nicholls, 2011). State 4 kann gegenüber state 4_{oligo} geringfügig erhöht sein, wenn die Mitochondrienpräparation mit ATPasen kontaminiert ist, die während der state 3-Respiration synthetisiertes ATP wieder zu ADP dephosphorylieren (Nicholls and Ferguson, 2013, Bioenergetics, p. 64).

Sobald eine stabile state 4-Respiration erreicht ist, kann die oxidative Phosphorylierung durch Addition von Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon (CCCP) entkoppelt werden (Heinen et al., 2007a, 2007b). Dieser Zustand repräsentiert die maximale respiratorische Kapazität der Mitochondrien, hängt ausschließlich von Substratimport, Substratverarbeitung und Elektronentransportkette ab (Lanza and Nair, 2009) und wird als state 3u bezeichnet.

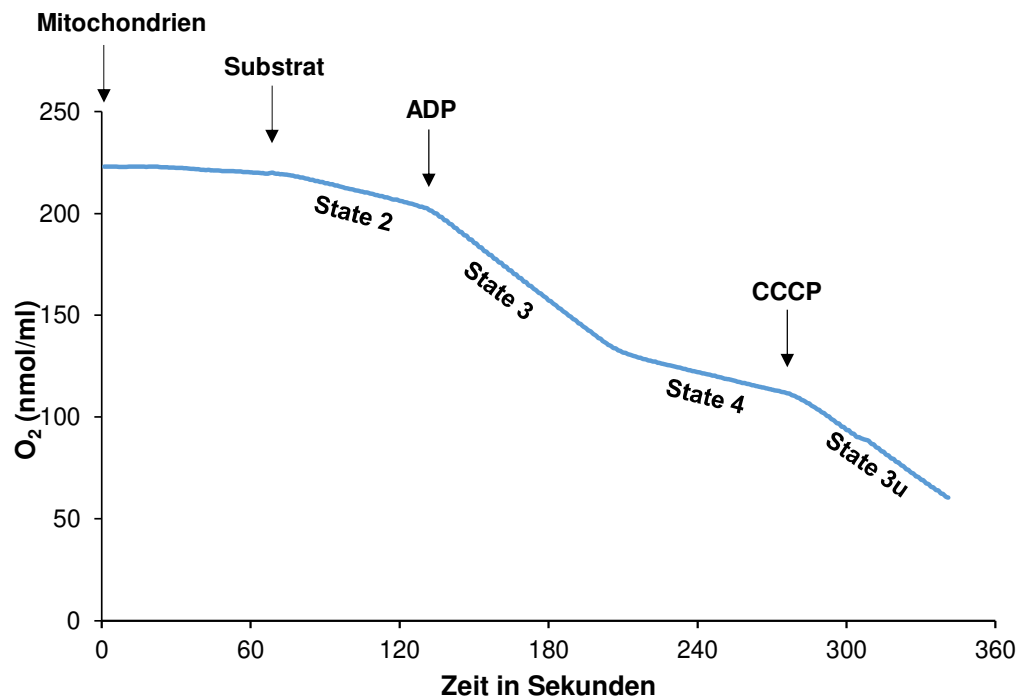


Abb. 11 Beispieltrace einer respirometrischen Messung an isolierten Mitochondrien. Nach etwa einer Minute wird das Substrat zur Mitochondriensuspension hinzugegeben und state 2-Respiration stellt sich ein. Die Zugabe von ADP eine Minute später führt state 3-Respiration herbei. Bei Einstellung eines stabilen state 4 wird mittels CCCP entkoppelt und der state 3u stellt sich ein. Weitere Details im Text unter 2.6.3.

Durch Bildung des Quotienten der Respirationsraten in state 3 und state 4 wurde für jede Messung die *respiratory control ratio* (RCR) bestimmt. Die RCR repräsentiert die Fähigkeit der Mitochondrien, auf ADP-Stimulation hin die Respirationsrate zu steigern. Hohe RCR-Werte bedeuten eine hohe Kapazität für Substratoxidation und oxidative Phosphorylierung sowie ein gering ausgeprägtes *Proton-Leak* (Brand and Nicholls, 2011). Die RCR kann auch als Maß für die Qualität der mitochondrialen Präparation verwendet werden, da beschädigte Mitochondrien ein erhöhtes *Proton-Leak* aufweisen (Nicholls and Ferguson, 2013, Bioenergetics, p. 64).

Anhand des kumulativen Sauerstoffverbrauchs im state 3 und der zugegebenen ADP-Stoffmenge wurde außerdem für jede Messung die *P/O-Ratio* berechnet. Diese steht für die Anzahl phosphorylierter ADP-Moleküle pro reduziertem Sauerstoffatom und ist ein Maß für die mitochondriale Effizienz (Layec et al., 2016).

2.6.4 Messprotokolle

Bei allen verwendeten Protokollen wird die Messkammer mit 500 μl Mitochondriensuspension einer Proteinkonzentration von 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ gefüllt. Anschließend wird die Messung gestartet.

Complex I-Substrat

- Minute 1: Injektion von 11 μl Pyruvat/Glutamat/Malat
- Minute 2: Injektion von 5 μl ADP (25 mM)
- Bei stabilem state 4: Injektion von 5 μl CCCP

Complex II

- Minute 1: Injektion von 5 μl Succinat/Rotenon
- Minute 2: Injektion von 5 μl ADP (25 mM)
- Bei stabilem state 4: Injektion von 5 μl CCCP

Palmitoyl-l-carnitin

- Minute 1: Injektion von 10 μl Palmitoyl-l-carnitin
- Minute 2: Injektion von 5 μl ADP (25 mM)
- Bei stabilem state 4: Injektion von 5 μl CCCP

Complex IV

- Unmittelbar nach Injektion der Mitochondrien: Injektion von 5 μl ADP (200 mM)
- Minute 1: Injektion von 5 μl TMPD/Ascorbat

2.7 Western Blot Analyse

Die Western Blot Analyse wird in der Molekularbiologie genutzt, um in einem Gemisch von Proteinen (beispielsweise in einem Zelllysat) ein bestimmtes Protein zu identifizieren (Yang and Mahmood, 2012). Hierzu werden die Proteine durch Gelelektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und daraufhin mittels elektrophoretischen Transfers auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet. Die Membran wird anschließend zunächst mit einem primären Antikörper (Bindung an das Zielprotein) und dann einem sekundären Antikörper (Bindung an den primären Antikörper) inkubiert. Der sekundäre Antikörper verfügt über eine Signalquelle (beispielsweise ein Fluoreszenzsignal), anhand derer die Zielprotein-Bande sichtbar gemacht wird (Yang and Mahmood, 2012). Die Stärke des Signals korreliert mit der aufgetragenen Menge des Zielproteins und ermöglicht einen relativen Vergleich von Proteinmengen, erlaubt aber keine absolute Bestimmung der Proteinkonzentration und wird als semi-quantitative Methode bezeichnet (Yang and Mahmood, 2012).

2.7.1 Proteinauftrennung mittels SDS-PAGE

Die Proben der für diese Arbeit durchgeführten Western Blot Analysen wurden durch Homogenisation ganzer Herzen gewonnen. Vor Durchführung der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (*SDS-PAGE*) wurden die mit Lämmli-Puffer verdünnten Proben auf 95°C erhitzt. Durch das im Lämmli-Puffer enthaltene Dithiothreitol (DTT) sowie durch die hohe Temperatur werden Disulfid-Brücken sowie Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb der Proteine gelöst, was zur Denaturierung der Proteine beiträgt.

Das Anion von SDS ist ein starkes Detergens, bindet an nahezu alle Proteine und löst nicht-kovalente Bindungen auf. SDS trägt somit zur Denaturierung der Tertiärstruktur bei und bildet negativ geladene Polypeptid-Detergens-Komplexe, deren Mobilität im Trenngel nicht länger von Form und Ladung des Proteins, sondern ausschließlich vom Molekulargewicht bestimmt wird (Garfin, 1990). Die Wanderungsgeschwindigkeit im Trenngel zur Anode hin ist etwa anti-proportional zum Logarithmus des Molekulargewichts der Proteine (Garfin, 1990).

Die Proben gelangten während der Elektrophorese zunächst in das Sammelgel und wurden anschließend bei einer konstanten Spannung von 150 Volt im Trenngel nach ihrer Größe aufgetrennt. Die *SDS-PAGE* wurde in HOEFER-Elektrophoresekammern unter Verwendung von *SDS-PAGE* Laufpuffer durchgeführt.

2.7.2 Proteintransfer mittels Western-Blot

Durch elektrophoretischen Transfer wurden die im Rahmen der *SDS-PAGE* entstandenen Banden vom Polyacrylamid-Gel auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet. Zum Transfer wurde der Pierce G2 Fast Blotter von Thermo Scientific genutzt.

2.7.3 Blockierung und Proteindetektion

Die Nitrocellulose-Membran wurde im Anschluss an den elektrophoretischen Transfer für eine Stunde in TBS-verdünntem (*Tris buffered saline*) Licor Odyssey Blocking Buffer (1:1 Verdünnung) inkubiert, um eine unspezifische Bindung der Antikörper an die Membran zu verhindern. Daraufhin wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper/den Primärantikörpern (verdünnt in TBST-Lösung (*Tris buffered saline + Tween*) mit 5 % BSA) inkubiert. Die Membran wurde anschließend mehrfach in TBST gewaschen und für eine Stunde bei Raumtemperatur mit den Sekundärantikörpern (1:10.000 verdünnt in Blocking-Lösung mit 0,1 % Tween) inkubiert. Nach mehrfachem Waschen wurden die Fluoreszenzsignale der Sekundärantikörper mittels eines *Licor Odyssey Scanners* (Licor Biosciences, Lincoln, USA) und des Programms Odyssey 2.1 und 3.0 gemessen. Der Scanner misst bei 700 nm und 800 nm und kann somit die Fluoreszenzsignale von zwei auf diesen Wellenlängen emittierenden Farbstoffen, die wiederum an jeweils einen Sekundärantikörper gekoppelt sind, erfassen. Das bei 700

nm gemessene Signal wird in rot und das bei 800 nm gemessene Signal wird in grün dargestellt.

2.8 Überprüfung der Knockout-Effizienz

Mittels Western Blot wurde überprüft, ob der kardiomyozytäre AKT-Knockout durch Injektion von 4-OH-Tamoxifen suffizient induziert wird. Hierzu wurden die Herzen von jeweils drei Wildtyp-Mäusen, drei iCM-AKT1-KO-Mäusen sowie drei iCM-AKT2-KO-Mäusen nach fünftägiger Injektion mit 4-OH-Tamoxifen entnommen und homogenisiert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Assay wurden die Proben mit Lämmli-Puffer verdünnt, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Diese wurde nach der Blockierung mit primären Antikörpern gegen AKT1 und AKT2 sowie gegen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) versetzt und über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Membranen mehrfach in TBST gewaschen und für eine Stunde mit den 1:10.000 in Blocking-Lösung mit 0,1% Tween verdünnten Sekundärantikörpern *Anti-Mouse IRDye® 680* und *Anti-Rabbit IRDye® 800* inkubiert. Nach mehrfachem Waschen wurden die Fluoreszenzsignale der Sekundärantikörper im *Licor Odyssey Scanner* gemessen. Es wurde das Verhältnis der Signale von AKT1 bzw. AKT2 zum *Housekeeper* GAPDH berechnet. Für den Wildtyp wurde die AKT/GAPDH-Ratio als Referenz auf 1 festgelegt und die Abweichung der Einzel-KOs von den Wildtypen kalkuliert (siehe 3.1 und Abb. 12). Das Experiment zur Überprüfung der Knockout-Effizienz sowie dessen Auswertung wurde von Frau Dominika Miklos durchgeführt.

2.9 Überprüfung der Insulin-Stimulation

Es wurde untersucht, ob das von uns verwendete Insulin-Stimulationsprotokoll zu einer AKT-Aktivierung *in vivo* führt. Vier Wildtyp-Mäusen wurde für vier Stunden das Futter entzogen, um eine Stimulation des AKT-Signalwegs durch endogene Insulin-Sekretion zu minimieren. Anschließend erhielten zwei der Mäuse eine gewichtsadaptierte Insulin-Injektion i.p. und die zwei anderen Mäuse eine PBS-Injektion i.p. 15 Minuten nach den Injektionen wurden die Mäuse mittels zervikaler Dislokation getötet und die Herzen entnommen. Nach Aufarbeitung der Herzen für eine Western Blot Analyse wurden die Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend geblottet. Die Membran wurde mit Primärantikörpern gegen Gesamt-AKT (*Akt (pan) (40d4)*) und phosphoryliertes AKT (*Phospho-Akt (Ser 473)*) versetzt und über Nacht inkubiert. Nach mehrfachem Waschen mit TBST wurden die Membranen für eine Stunde mit den 1:10.000 in Blocking-Lösung mit 0,1 % Tween verdünnten Sekundärantikörpern *Anti-Mouse IRDye® 680* und *Anti-Rabbit IRDye® 800* inkubiert. Daraufhin wurden die Membranen mehrfach gewaschen und die Fluoreszenzsignale der Sekundärantikörper im *Licor Odyssey Scanner* gemessen. Für alle Proben wurde das Verhältnis zwischen dem Gesamt-AKT-Signal

(panAKT) und dem Signal des phosphorylierten AKT (phosphoAKT) berechnet und die phosphoAKT/panAKT-Ratio der PBS-Tiere wurde als Referenz auf 1 festgelegt (siehe 3.3 und Abb. 16).

2.10 Statistische Auswertung

Die Rohdaten der respirometrischen Untersuchungen wurden nach den Experimenten in ein Excel-Dokument übertragen. In Excel wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet und die gezeigten Diagramme sowie Tabellen erstellt. Für die statistische Auswertung der Daten wurde das Programm Sigma-Plot 13.0 (Systat Software, USA) verwendet. Für die Vergleiche zwischen den +Ins und -Ins Gruppen sowie zwischen Wildtypen und iCM-AKT1/2-DKO's wurde der ungepaarte t-Test verwendet. Für die Vergleiche zwischen den -Ins Gruppen der Wildtypen, iCM-AKT1-KO's und iCM-AKT2-KO's wurden *One-Way-ANOVAs* gefolgt vom Student-Newman-Keuls-Test (SNK) als *Post-Hoc*-Test durchgeführt. Die Signifikanzgrenze wurde bei $p \leq 0,05$ angesetzt.

3 Ergebnis

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von AKT auf die Funktion myokardialer Mitochondrien zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde die Respiration isolierter kardialer Mitochondrien aus Wildtyp-Mäusen mit der Respiration kardialer Mitochondrien aus Mäusen mit kardiomyozytärem AKT-KO verglichen. Alle Mäuse erhielten im Vorfeld der Experimente an fünf aufeinanderfolgenden Tagen 4-OH-Tamoxifen.

3.1 KO-Effizienz

Um zu überprüfen, ob die Gabe von 4-OH-Tamoxifen zur effizienten Induktion des kardiomyozytären AKT-KOs führt, wurden nach fünftägiger Gabe von 4-OH-Tamoxifen die Herzen von jeweils drei Mäusen der Genotypen WT, iCM-AKT1-KO und iCM-AKT2-KO entnommen, homogenisiert und mittels Western Blot unter Verwendung von Antikörpern gegen AKT1, AKT2 und GAPDH als *Housekeeper* analysiert.

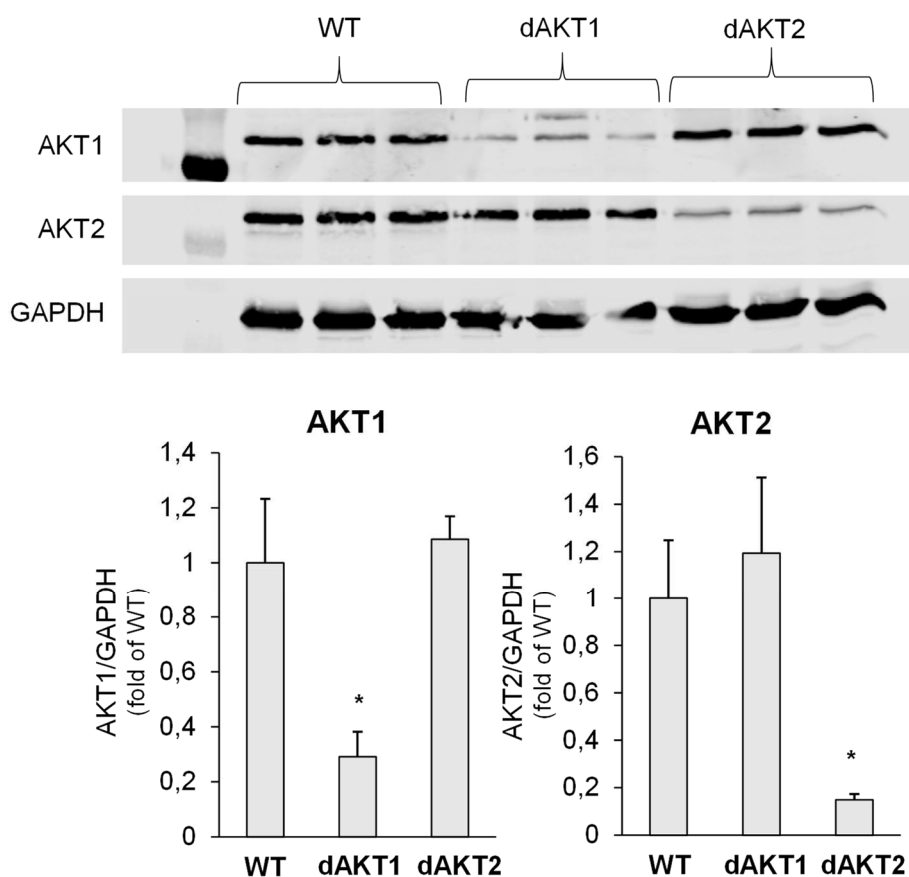


Abb. 12: Darstellung der Western Blot Analyse zur Knockout-Effizienz. Herzen von Wildtyp-Mäusen (WT), iCM-AKT1-KOs (dAKT1) und iCM-AKT2-KOs (dAKT2) wurden homogenisiert und mittels Western Blot analysiert. Die AKT1/GAPDH-Ratio bei den AKT1-KOs und die AKT2/GAPDH-Ratio bei den AKT2-KOs sind im Vergleich zum Wildtyp signifikant reduziert. WT n=3; dAKT1 n=3; dAKT2 n=3. * p<0,05. Western Blot und Auswertung wurden von Frau Dominika Miklos durchgeführt.

Wie in Abbildung 12 ersichtlich, nahm die kardiale AKT1-Expression in Relation zum *Hou-keeper* GAPDH in den iCM-AKT1-KOs nach fünftägiger Gabe von 4-OH-Tamoxifen im Vergleich zum Wildtyp um etwa 70 % ab ($p=0,004$), wohingegen die AKT2-Expression unverändert blieb. Die iCM-AKT2-KOs zeigten nach Induktion eine im Vergleich zum Wildtyp um etwa 80 % verminderte AKT2-Expression in Relation zu GAPDH ($p=0,011$), während die AKT1-Expression unverändert blieb. Zudem zeigte sich keine signifikante kompensatorisch verstärkte Expression der jeweils anderen Isoform. Die in Abbildung 12 erkennbare verbliebene Expression von AKT1 in den iCM-AKT1-KOs und von AKT2 in den iCM-AKT2 KOs lässt sich darauf zurückführen, dass die Western-Blots an Proben durchgeführt wurden, die anhand einer Homogenisierung ganzer Herzen gewonnen wurden. Somit wurden neben Kardiomyozyten auch weitere im Herz vorhandene Zelltypen wie Endothelzellen und Fibroblasten homogenisiert, in welchen die Expression beider AKT-Isoformen auch nach Induktion des kardiomyozytären *Knockouts* unbeeinträchtigt bleibt. Beide kardiomyozytären AKT-Einzel-KOs werden also durch fünftägige Gabe von 4-OH-Tamoxifen effizient induziert.

3.2 Mitochondriale Respiration der Einzel-KOs

Wie in der Einleitung beschrieben, gibt es Hinweise darauf, dass AKT sowie der Insulin-Signalweg eine Schlüsselrolle in der Steuerung der mitochondrialen Funktion in Kardiomyozyten einnehmen. In dieser Arbeit sollten daher die Auswirkungen des Verlustes einer kardiomyozytär exprimierten Isoform von AKT auf die Respiration intakter Mitochondrien unter basalen Bedingungen sowie nach Insulin-Stimulation untersucht werden. Zu diesem Zweck erhielt eine Gruppe der Tiere 15 Minuten vor der Organentnahme Insulin (+Ins) und die andere PBS (-Ins). Zunächst wurde die mitochondriale Respiration der Wildtypen und Einzel-KOs unter basalen Bedingungen (-Ins) verglichen.

Complex I-Substrat:

Unter Complex I-Substrat zeigten die -Ins Gruppen der Einzel-KOs und der Wildtypen keine signifikanten Veränderungen der Mittelwerte in der state 3- und state 3u-Respiration. Während die iCM-AKT2-KOs im state 3 und state 3u eine um 6,4 % geringere Respirationsrate aufwiesen als die Wildtypen, lag die Respirationsrate der iCM-AKT1-KOs annähernd auf gleicher Höhe wie die der Wildtypen. In der state 4-Respiration zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den Einzel-KOs und den Wildtypen, die Mittelwerte der iCM-AKT1-KOs lagen allerdings mit 16 % und die Mittelwerte der iCM-AKT2-KOs mit 6,7 % über denen der Wildtypen (siehe Abb. 13).

Die RCR (*Respiratory Control Ratio*=state 3/state 4) war dagegen bei beiden Einzel-KOs gegenüber den Wildtypen signifikant reduziert (um 19,4 % bei den iCM-AKT1-KOs und um 14,7 % bei den iCM-AKT-2-KOs) (siehe Abb. 13).

Bei der *P/O-Ratio* zeigten die Einzel-KOs eine Tendenz zu einer Abnahme gegenüber den Wildtypen, diese Abweichungen waren allerdings nicht signifikant (siehe Abb. 13).

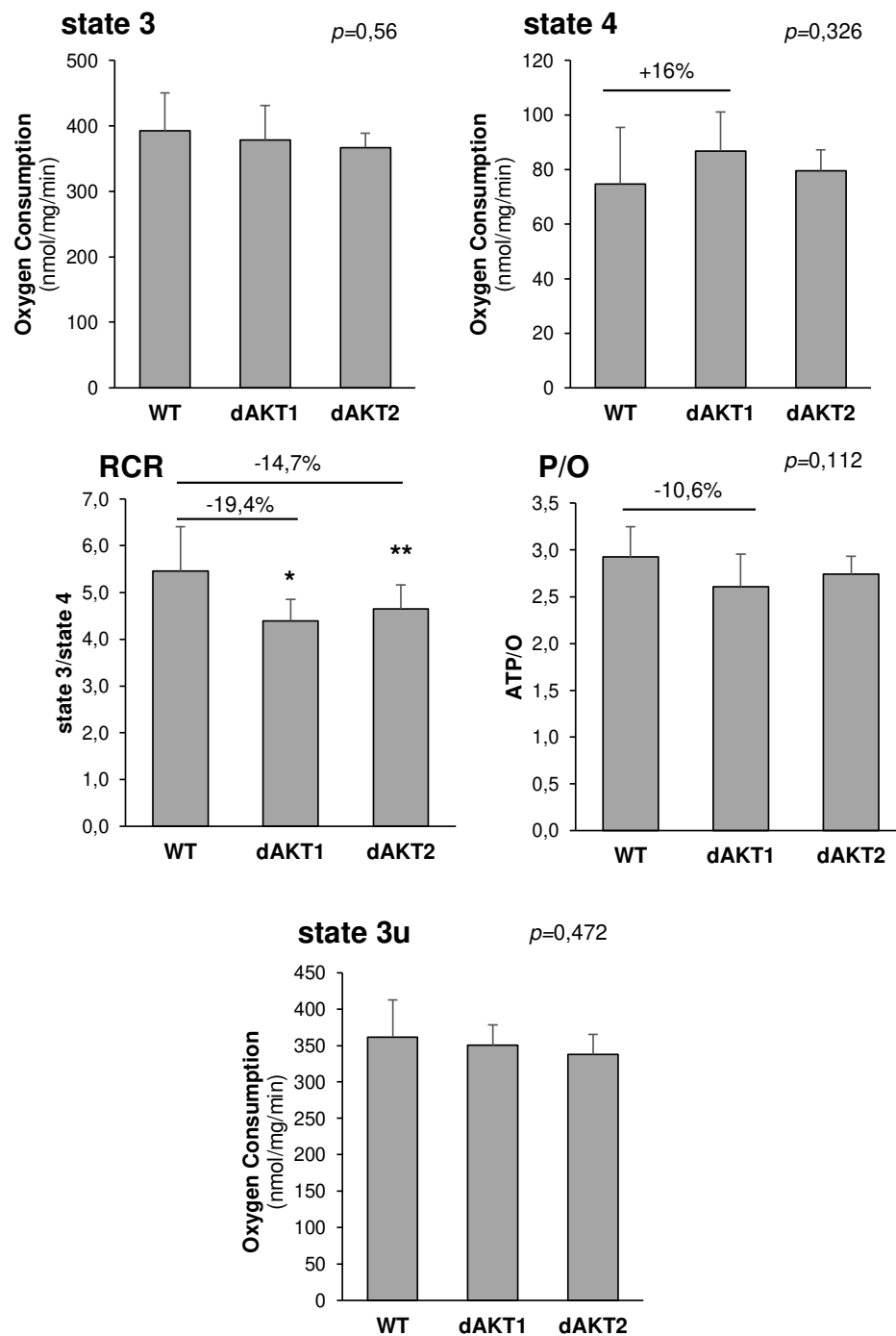


Abb. 13: Graphische Darstellung der unter Complex I-Substrat und basalen Bedingungen (-Ins) an isolierten kardiomyozytären Mitochondrien aus WT-Mäusen (WT), iCM-AKT1-KOs (dAKT1) und iCM-AKT2-KOs (dAKT2) gemessenen respirometrischen Parameter. Der Sauerstoffverbrauch wird in der Einheit nmol O₂/mg Protein/min angegeben. Die Ergebnisse sind zusätzlich in Tabelle 1 dargestellt. Die p-Werte beziehen sich auf den Vergleich der drei -Ins Gruppen. WT n=11; dAKT1 n=7; dAKT2 n=7. * $p=0,018$ ** $p=0,034$

Complex II-Substrat:

Unter Complex II-Substrat zeigten sich bei keinem der gemessenen Parameter signifikante Unterschiede zwischen den Einzel-KOs und den Wildtypen.

In der state 3- und state 3u-Respiration zeigten die iCM-AKT2-KOs eine Tendenz zu einem reduzierten Sauerstoffverbrauch gegenüber den Wildtypen, während die Respirationsrate der iCM-AKT1-KOs annähernd auf gleicher Höhe mit den Wildtypen lag. In der state 4-Respiration zeigten die iCM-AKT1-KOs einen durchschnittlich höheren Sauerstoffverbrauch als die Wildtypen (siehe Abb. 14).

Bei der RCR und der *P/O-Ratio* zeigten beide Einzel-KOs einen schwachen Trend zu einer Abnahme gegenüber den Wildtypen (siehe Abb. 14).

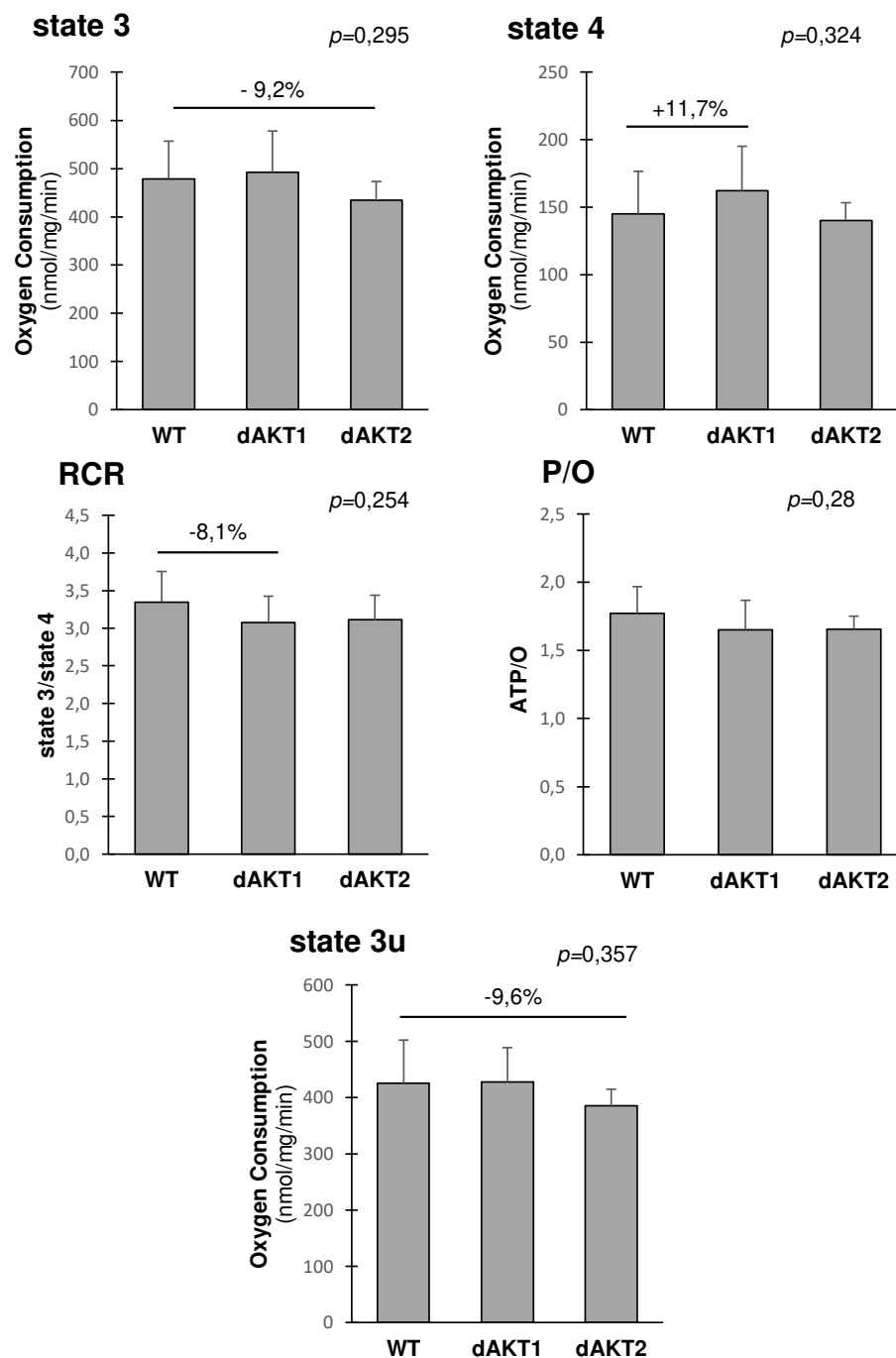


Abb. 14: Graphische Darstellung der unter Complex II-Substrat und basalen Bedingungen (-Ins) an isolierten kardiomyozytären Mitochondrien aus WT-Mäusen (WT), iCM-AKT1-KOs (dAKT1) und iCM-AKT2-KOs (dAKT2) gemessenen respirometrischen Parameter. Der Sauerstoffverbrauch wird in der Einheit nmol O₂/mg Protein/min angegeben. Die Ergebnisse sind zusätzlich in Tabelle 1 dargestellt. Die p-Werte beziehen sich auf den Vergleich der drei -Ins Gruppen. WT n=11; dAKT1 n=7; dAKT2 n=7.

Complex IV-Substrat:

Unter Complex IV-Substrat zeigten die Einzel-KOs gegenüber den Wildtypen eine Tendenz zu einem verringerten Sauerstoffverbrauch im state 3. Die iCM-AKT1-KOs lagen um 5,2 % unter den Wildtypen. Deutlicher war die Abweichung bei den iCM-AKT2-KOs, die einen um 16,1 % geringeren Sauerstoffverbrauch als die Wildtypen aufwiesen. Diese Unterschiede waren nicht signifikant (siehe Abb. 15).

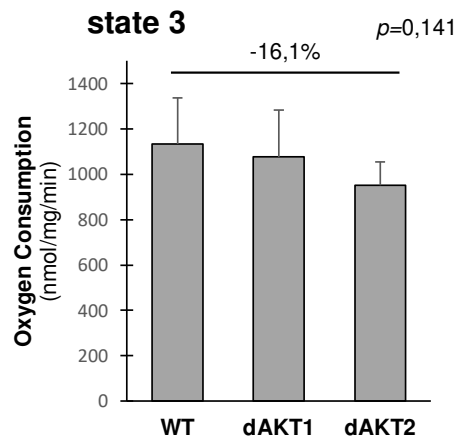


Abb. 15: Graphische Darstellung der state 3 Respiration unter Complex IV-Substrat und basalen Bedingungen (-Ins), gemessen an isolierten kardiomyozytären Mitochondrien aus WT-Mäusen (WT), iCM-AKT1-KOs (dAKT1) und iCM-AKT2-KOs (dAKT2). Der Sauerstoffverbrauch wird in der Einheit nmol O₂/mg Protein/min angegeben. Die Ergebnisse sind zusätzlich in Tabelle 1 dargestellt. Der p-Wert bezieht sich auf den Vergleich der drei -Ins Gruppen. WT n=11; dAKT1 n=7; dAKT2 n=7.

Fazit:

In der Gesamtbetrachtung der Messergebnisse der -Ins Gruppen zeigten sich nur geringgradige Unterschiede zwischen den Wildtypen und den Einzel-KOs, die mit Ausnahme der Unterschiede in der RCR nicht signifikant waren.

Unter Complex I-Substrat war die RCR der Einzel-KOs gegenüber den Wildtypen signifikant reduziert. Unter Complex II-Substrat zeigte sich dagegen nur ein schwacher Trend zu einer verringerten RCR bei den Einzel-KOs. Ursächlich für die Abweichungen in der RCR waren eine Tendenz der iCM-AKT2-KOs zu einer verringerten Respiration im state 3 und eine Tendenz insbesondere der iCM AKT1-KOs zu einer gesteigerten Respiration im state 4. Auch im state 3u zeigten die iCM-AKT2-KOs eine tendenziell verminderte Respirationsrate.

Beide Einzel-KOs zeigten eine schwache Tendenz zu einer gegenüber den Wildtypen verminderten *P/O-Ratio*.

Complex I	state 3	Stabw	Statistik	Complex II	state 3	Stabw	Statistik
WT	392	58		WT	479	78	
dAKT1	378	53	$p=0,56$	dAKT1	493	85	$p=0,295$
dAKT2	367	22		dAKT2	435	39	
Complex I	state 4	Stabw	Statistik	Complex II	state 4	Stabw	Statistik
WT	75	21		WT	145	32	
dAKT1	87	14	$p=0,326$	dAKT1	162	33	$p=0,324$
dAKT2	80	8		dAKT2	140	13	
Complex I	RCR	Stabw	Statistik	Complex II	RCR	Stabw	Statistik
WT	5,45	0,95		WT	3,35	0,41	
dAKT1	4,39	0,46	$p=0,014^*$	dAKT1	3,08	0,35	$p=0,254$
dAKT2	4,65	0,51		dAKT2	3,11	0,33	
Complex I	P/O	Stabw	Statistik	Complex II	P/O	Stabw	Statistik
WT	2,92	0,33		WT	1,77	0,19	
dAKT1	2,61	0,35	$p=0,112$	dAKT1	1,65	0,22	$p=0,28$
dAKT2	2,74	0,19		dAKT2	1,66	0,09	
Complex I	state 3u	Stabw	Statistik	Complex II	state 3u	Stabw	Statistik
WT	362	51		WT	426	76	
dAKT1	350	28	$p=0,472$	dAKT1	427	61	$p=0,357$
dAKT2	338	27		dAKT2	385	29	
Complex IV	state 3	Stabw	Statistik				
WT	1134	203					
dAKT1	1075	207	$p=0,141$				
dAKT2	951	103					

Tabelle 1: Übersicht über die Ergebnisse der respirometrischen Messungen an isolierten kardiomyozytären Mitochondrien aus Wildtyp-Mäusen (WT), iCM-AKT1-KO-Mäusen (dAKT1) sowie iCM-AKT2-KO-Mäusen (dAKT2). Gemessen wurde unter Basalbedingungen (-Ins). Complex I, II und IV stehen für die verwendeten Substrate, deren Elektronen über die entsprechenden Atmungskettenkomplexe der Elektronentransportkette zugeführt werden. Angegeben werden Mittelwerte, Standardabweichung (=Stabw) sowie der statistische Signifikanzwert. WT n=11; dAKT1 n=7; dAKT2 n=7. * WT vs. dAKT1 $p=0,018$; WT vs. dAKT2 $p=0,034$

3.3 Mitochondriale Respiration nach Insulin-Stimulation

Wie in der Einleitung beschrieben, gibt es Hinweise darauf, dass Insulin über den AKT-Signalweg Einfluss auf die mitochondriale Funktion ausübt. In dieser Arbeit sollte daher die mitochondriale Respiration nach Insulin-Gabe gemessen werden. Um zu überprüfen, ob das von uns verwendete Insulin-Stimulations-Protokoll zu einer Phosphorylierung und Aktivierung von AKT führt, wurde jeweils zwei Mäusen eine gewichtsadaptierte Dosis Insulin (+Ins) bzw. PBS (-Ins) verabreicht. Nach 15 Minuten wurden die Herzen der Mäuse entnommen und mittels Western Blot unter Verwendung von Antikörpern gegen Gesamt-AKT und phosphoryliertes AKT analysiert. Anschließend wurde für jede Probe das Verhältnis der Signale von phosphoryliertem AKT (phosphoAKT) zu Gesamt-AKT (panAKT) berechnet. Wie in Abb. 16 dargestellt, war das phosphoAKT/panAKT-Verhältnis der Proben aus den +Ins Tieren im Vergleich zu den -Ins Tieren etwa dreifach erhöht. Bei Verwendung unseres Insulin-Stimulationsprotokolls scheint also eine Aktivierung des AKT-Signalwegs stattzufinden.

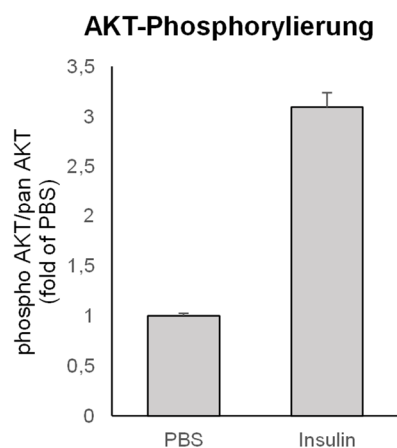
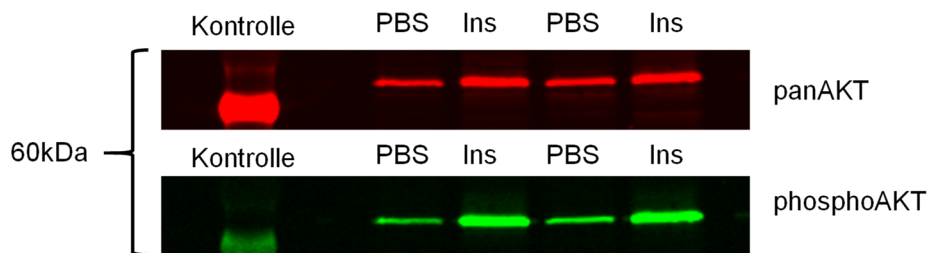


Abb. 16: Darstellung der Western Blot Analyse zur Insulinstimulation des AKT-Pathways. Jeweils zwei Mäuse erhielten entsprechend unseres Protokolls eine Insulin- oder eine PBS-Injektion. Nach 15 Minuten wurden die Herzen entnommen, homogenisiert und mittels Western Blot analysiert. Die phosphoAKT/pan-AKT-Ratio war bei den Insulin-stimulierten Mäusen etwa dreifach erhöht. Es findet also eine Stimulation des AKT-Signalwegs durch unser Insulinstimulations-Protokoll statt. PBS n=2; Insulin n=2.

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob eine Stimulation durch Insulin einen Einfluss auf die Respiration isolierter Mitochondrien in den Wildtypen und den AKT-Einzel-KOs hat. Zu diesem Zweck wurde die mitochondriale Respiration der +Ins Gruppen und der -Ins Gruppen verglichen.

Complex I-Substrat:

Unter Complex I-Substrat zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den -Ins Gruppen und den korrespondierenden +Ins Gruppen.

In der state 3-Respiration zeigten sowohl die Wildtypen als auch die Einzel-KOs eine tendenziell gesteigerte Respiration. Dieser Unterschied war bei den iCM-AKT1-KOs mit 14,8 % am deutlichsten ausgeprägt (siehe Abb. 17). Im state 4 zeigten sich bei den Einzel-KOs kaum Veränderungen zwischen den -Ins und +Ins Gruppen, wohingegen die state 4-Respiration bei den Wildtypen unter Insulinstimulation durchschnittlich um 9,3 % höher ausfiel.

Die RCR zeigte bei den Einzel-KOs einen starken Trend zu einer Steigerung unter Insulinstimulation, welche bei den iCM-AKT1-KOs mit 18,2 % am deutlichsten ausfiel (siehe Abb. 17).

In der state 3u-Respiration zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede, dafür aber zumindest im Falle der Einzel-KOs ein schwacher Trend zu einem erhöhten Sauerstoffverbrauch unter Insulinstimulation (siehe Abb. 17).

In der state 4-Respiration zeigten die Einzel-KOs sowohl basal als auch unter Insulinstimulation ähnliche Respirationsraten (siehe Tabelle 2).

Die *P/O-Ratio* lag sowohl bei den Wildtypen als auch bei den Einzel-KOs in den -Ins Gruppen etwa auf gleicher Höhe wie in den +Ins Gruppen (siehe Tabelle 2).

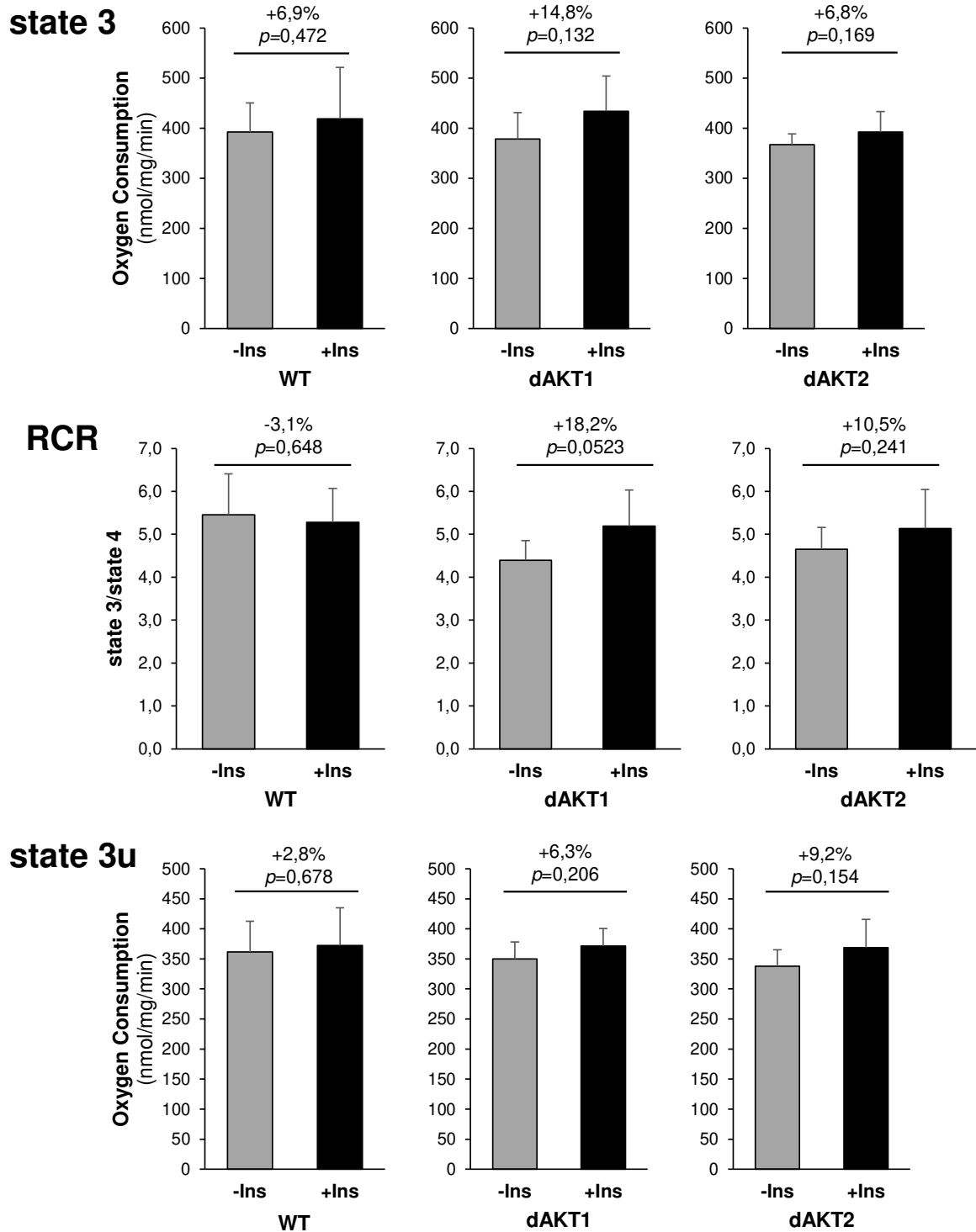


Abb. 17: Graphische Darstellung respirometrischen Parameter state 3, state 3u und RCR unter Complex I-Substrat und basalen Bedingungen (-Ins) sowie Insulinstimulation (+Ins), gemessen an isolierten kardiomyozytären Mitochondrien aus Wildtyp-Mäusen (WT), iCM-AKT1-KOs (dAKT1) und iCM-AKT2-KOs (dAKT2). Der Sauerstoffverbrauch wird in der Einheit nmol O₂/mg Protein/min angegeben. Die Ergebnisse sind zusätzlich in Tabelle 2 dargestellt. WT -Ins n=11, WT +Ins n=10; dAKT1 -Ins n=7, dAKT1 +Ins n=6; dAKT2 -Ins n=7, dAKT2 +Ins n=7.

Complex II-Substrat:

Unter Complex II-Substrat zeigten sich mit einer Ausnahme keine signifikanten Unterschiede zwischen den -Ins Gruppen und den korrespondierenden +Ins Gruppen.

In der state 3-Respiration ließ sich sowohl bei den Wildtypen als auch bei den Einzel-KOs eine schwache Tendenz zu einem gesteigerten Sauerstoffverbrauch unter Insulinstimulation beobachten (siehe Abb. 18). In der state 4-Respiration zeigten sich bei den Wildtypen und den Einzel-KOs keine signifikanten Unterschiede im Sauerstoffverbrauch zwischen den -Ins und den +Ins Gruppen (siehe Tabelle 2).

Die RCR zeigte nur im Falle der iCM-AKT1-KOs unter Complex II-Substrat einen tendenziellen Anstieg unter Insulinstimulation (siehe Abb. 18).

In der state 3u-Respiration zeigte die +Ins Gruppe der iCM-AKT2-KOs eine um 8,1 % gesteigerte Respiration gegenüber der entsprechenden -Ins Gruppe. Dieser Unterschied war zu $p=0,0312$ signifikant (siehe Abb. 18).

Die *P/O-Ratio* lag sowohl bei den Wildtypen als auch bei den Einzel-KOs in den -Ins Gruppen etwa auf gleicher Höhe wie in den +Ins Gruppen (siehe Tabelle 2).

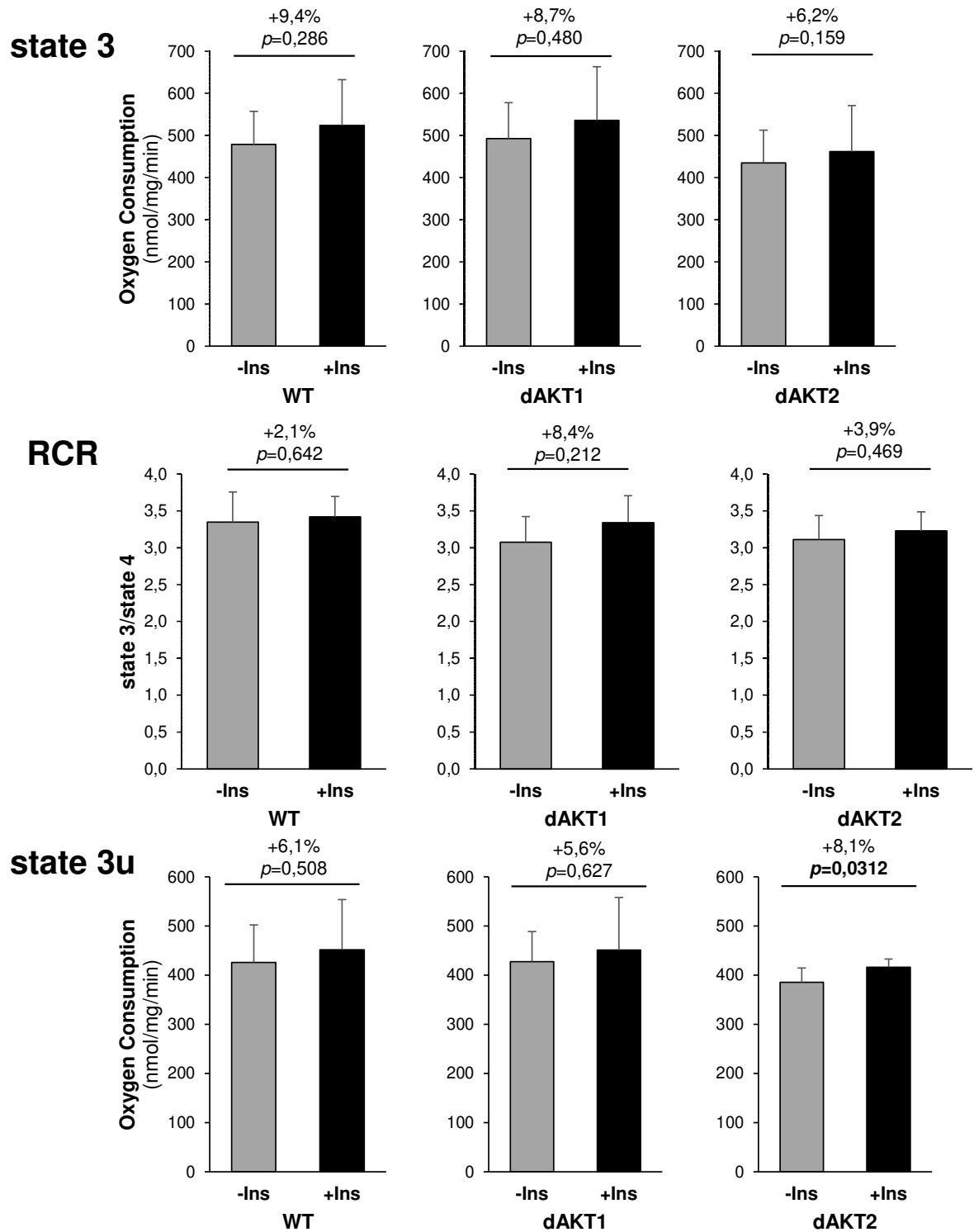


Abb. 18: Graphische Darstellung respirometrischen Parameter state 3, state 3u und RCR unter Complex II-Substrat und basalen Bedingungen (-Ins) sowie Insulinstimulation (+Ins), gemessen an isolierten kardiomyozytären Mitochondrien aus Wildtyp-Mäusen (WT), iCM-AKT1-KOs (dAKT1) und iCM-AKT2-KOs (dAKT2). Der Sauerstoffverbrauch wird in der Einheit nmol O₂/mg Protein/min angegeben. Die Ergebnisse sind zusätzlich in Tabelle 2 dargestellt. WT -Ins n=11, WT +Ins n=10; dAKT1 -Ins n=7, dAKT1 +Ins n=6; dAKT2 -Ins n=7, dAKT2 +Ins n=7.

Complex IV-Substrat:

Unter Complex IV-Substrat zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den -Ins Gruppen und den korrespondierenden +Ins Gruppen. Dennoch ließ sich unter Complex IV-Substrat wie auch unter Complex I- und II-Substrat eine schwache Tendenz zu einer gesteigerten Respiration unter Insulinstimulation beobachten (siehe Abb. 19).

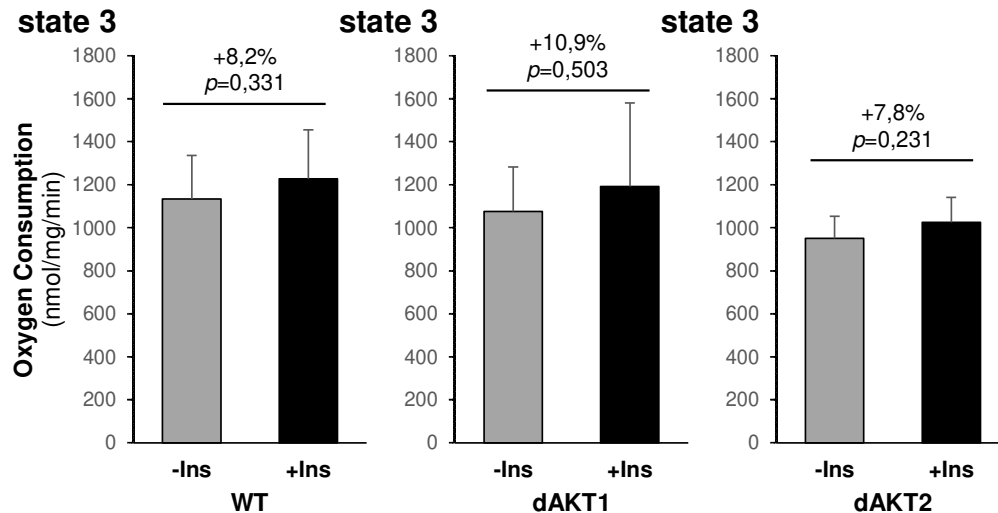


Abb. 19: Graphische Darstellung der state 3-Respiration unter Complex IV-Substrat und basalen Bedingungen (-Ins) sowie Insulinstimulation (+Ins), gemessen an isolierten kardiomyozytären Mitochondrien aus Wildtyp-Mäusen (WT), iCM-AKT1-KOs (dAKT1) und iCM-AKT2-KOs (dAKT2). Der Sauerstoffverbrauch wird in der Einheit nmol O₂/mg Protein/min angegeben. Die Ergebnisse sind zusätzlich in Tabelle 2 dargestellt. WT -Ins n=11, WT +Ins n=10; dAKT1 -Ins n=7, dAKT1 +Ins n=6; dAKT2 -Ins n=7, dAKT2 +Ins n=7.

Fazit:

In der Gesamtbetrachtung der Daten zeigte sich eine Tendenz zu einem erhöhten Sauerstoffverbrauch der +Ins Gruppen gegenüber den -Ins Gruppen unter Kopplung von ATP-Umsatz und Substratoxidation (state 3), sowie unter Entkopplung mittels eines Protonophors (state 3u). Diese Unterschiede waren im Falle der iCM-AKT2-KOs unter Complex II-Substrat für den Parameter state 3u signifikant.

Es zeigte sich zudem ein Trend zu einer RCR-Erhöhung der +Ins Gruppen der Einzel-KOs im Vergleich zu den jeweiligen -Ins Gruppen. Der RCR-Anstieg fiel für die iCM-AKT1-KOs am deutlichsten aus und lag unter Complex I-Substrat nah an der Signifikanzgrenze.

Complex I	state 3	Stabw	Statistik	Complex II	state 3	Stabw	Statistik
WT -Ins	392	58	$p=0,472$	WT -Ins	479	78	$p=0,286$
WT +Ins	419	103		WT +Ins	524	109	
dAKT1 -Ins	378	53	$p=0,132$	dAKT1 -Ins	493	85	$p=0,480$
dAKT1 +Ins	434	70		dAKT1 +Ins	536	127	
dAKT2 -Ins	367	22	$p=0,169$	dAKT2 -Ins	435	39	$p=0,159$
dAKT2 +Ins	392	41		dAKT2 +Ins	462	29	
Complex I	state 4	Stabw	Statistik	Complex II	state 4	Stabw	Statistik
WT -Ins	75	21	$p=0,484$	WT -Ins	145	32	$p=0,538$
WT +Ins	82	27		WT +Ins	153	29	
dAKT1 -Ins	87	14	$p=0,726$	dAKT1 -Ins	162	33	$p=0,895$
dAKT1 +Ins	84	11		dAKT1 +Ins	160	26	
dAKT2 -Ins	80	8	$p=0,909$	dAKT2 -Ins	140	13	$p=0,632$
dAKT2 +Ins	79	15		dAKT2 +Ins	144	15	
Complex I	RCR	Stabw	Statistik	Complex II	RCR	Stabw	Statistik
WT -Ins	5,45	0,95	$p=0,648$	WT -Ins	3,35	0,41	$p=0,642$
WT +Ins	5,28	0,79		WT +Ins	3,42	0,27	
dAKT1 -Ins	4,39	0,46	$p=0,0523$	dAKT1 -Ins	3,08	0,35	$p=0,212$
dAKT1 +Ins	5,19	0,84		dAKT1 +Ins	3,34	0,37	
dAKT2 -Ins	4,65	0,51	$p=0,241$	dAKT2 -Ins	3,11	0,33	$p=0,469$
dAKT2 +Ins	5,14	0,91		dAKT2 +Ins	3,23	0,26	
Complex I	P/O	Stabw	Statistik	Complex II	P/O	Stabw	Statistik
WT -Ins	2,92	0,33	$p=0,876$	WT -Ins	1,77	0,19	$p=0,547$
WT +Ins	2,95	0,32		WT +Ins	1,83	0,20	
dAKT1 -Ins	2,61	0,35	$p=0,629$	dAKT1 -Ins	1,65	0,22	$p=0,764$
dAKT1 +Ins	2,70	0,32		dAKT1 +Ins	1,68	0,16	
dAKT2 -Ins	2,74	0,19	$p=0,702$	dAKT2 -Ins	1,66	0,09	$p=0,453$
dAKT2 +Ins	2,69	0,34		dAKT2 +Ins	1,71	0,14	
Complex I	state 3u	Stabw	Statistik	Complex II	state 3u	Stabw	Statistik
WT -Ins	362	51	$p=0,678$	WT -Ins	426	76	$p=0,508$
WT +Ins	372	63		WT +Ins	452	102	
dAKT1 -Ins	350	28	$p=0,206$	dAKT1 -Ins	427	61	$p=0,627$
dAKT1 +Ins	372	29		dAKT1 +Ins	451	107	
dAKT2 -Ins	338	27	$p=0,154$	dAKT2 -Ins	385	29	$p=0,0312$
dAKT2 +Ins	369	47		dAKT2 +Ins	416	17	
Complex IV	state 3	Stabw	Statistik				
WT -Ins	1134	203	$p=0,331$				
WT +Ins	1227	228					
dAKT1 -Ins	1075	207	$p=0,503$				
dAKT1 +Ins	1192	389					
dAKT2 -Ins	951	103	$p=0,231$				
dAKT2 +Ins	1025	116					

Tabelle 2: Respirometrische Parameter isolierter kardiomyozytärer Mitochondrien aus Wildtyp-Mäusen (WT), iCM-AKT1-KO-Mäusen (dAKT1) sowie iCM-AKT2-KO-Mäusen (dAKT2). In dieser Tabelle sind zusätzlich zu den Messergebnissen, die unter Basalbedingungen erhoben wurden (-Ins; siehe Tabelle 1) auch die Messergebnisse unter Insulinstimulation (+Ins) enthalten. Complex I, II und IV stehen für die verwendeten Substrate, deren Elektronen über die entsprechenden Atmungskettenkomplexe der Elektronentransportkette zugeführt werden. Angegeben werden Mittelwerte, Standardabweichung (Stabw) sowie der statistische Signifikanzwert. WT -Ins n=11, WT +Ins n=10; dAKT1 -Ins n=7, dAKT1 +Ins n=6; dAKT2 -Ins n=7, dAKT2 +Ins n=7.

3.4 Doppel-KOs

Wie in der Einleitung beschrieben, besteht für die drei bisher identifizierten Isoformen von AKT ein hoher Grad an Sequenzhomologie und funktionaler Überlappung (Yudushkin, 2019). Da in Kardiomyozyten hauptsächlich die Isoformen AKT1 und AKT2 exprimiert werden (Reinartz et al., 2014), stellte sich uns die Frage, ob AKT1 und AKT2 im Kontext der mitochondrialen Bioenergetik funktional überlappen, der Verlust einer der beiden Isoformen also durch die jeweils verbleibende Isoform kompensiert wird.

Um zu untersuchen, ob es unter basalen Bedingungen eine kompensatorische Funktionsüberlappung zwischen AKT1 und AKT2 auf der Ebene der mitochondrialen Bioenergetik gibt, wurden respirometrische Messungen an iCM-AKT1/2-DKO an Tag 21 nach Induktion durchgeführt. Um zusätzlich mögliche Veränderungen im mitochondrialen Fettsäuremetabolismus der iCM-AKT1/2-DKO zu untersuchen, wurde in dieser Messreihe mit Palmitoyl-l-carnitin/Malat ein weiteres Substrat eingeführt, welches nach Transport in die Mitochondrien über das Carnitin-Carrier-System die β -Oxidation durchläuft (siehe 2.6.2).

Complex I-Substrat:

Unter Complex I-Substrat zeigten die iCM-AKT1/2-DKO im state 3 sowie im state 4 einen ähnlich hohen Sauerstoffverbrauch wie die Wildtypen (siehe Abb. 20). Dementsprechend zeigte sich auch in der RCR kein Unterschied zwischen den Wildtypen und den iCM-AKT1/2-DKO. Somit konnte der signifikante Unterschied in der RCR, der zwischen Einzel-KOs und Wildtypen beobachtet wurde (siehe 3.2, Abb. 13), für die iCM-AKT1/2-DKO nicht nachgewiesen werden.

Im state 3u zeigten die iCM-AKT1/2-DKO einen deutlichen Trend zu einem verringerten Sauerstoffverbrauch. Dieser lag bei den Doppel-KOs um 10,1 % niedriger als bei den Wildtypen ($p=0,0847$) (siehe Abb. 20).

Die mittlere *P/O-Ratio* der iCM-AKT1/2-DKO lag um 9,6 % niedriger als die der Wildtypen. Dieser Unterschied war signifikant (siehe Abb. 20).

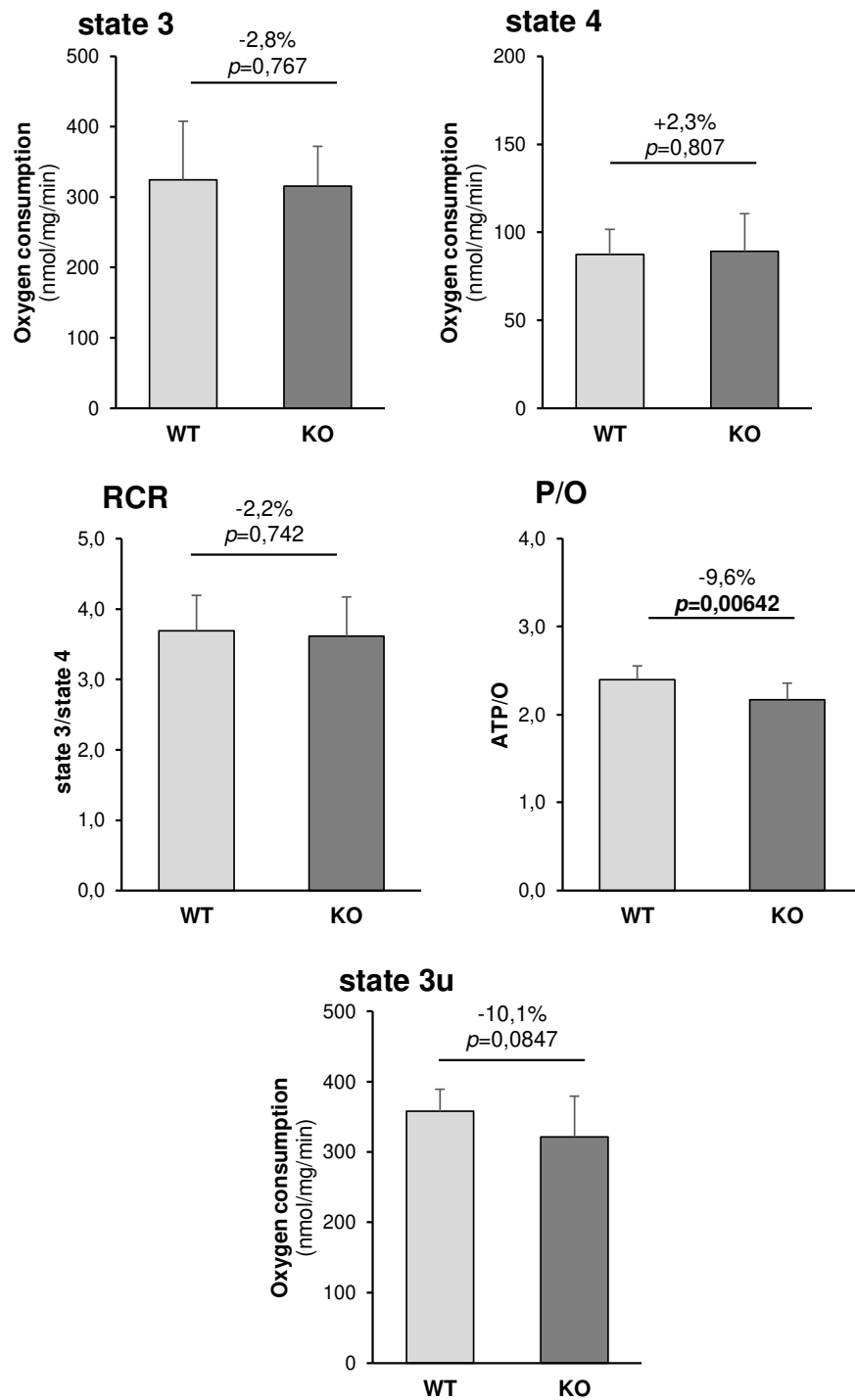


Abb. 20: Graphische Darstellung der unter Complex I-Substrat an isolierten kardiomyozytären Mitochondrien aus WT-Mäusen (WT) und iCM-AKT1/2-DKOs (KO) gemessenen respirometrischen Parameter. Der Sauerstoffverbrauch wird in der Einheit $\text{nmol O}_2/\text{mg Protein}/\text{min}$ angegeben. Die Ergebnisse sind zusätzlich in Tabelle 3 dargestellt. Die p-Werte beziehen sich auf den Vergleich zwischen WT und KO. WT $n=11$; KO $n=11$.

Complex II-Substrat:

Im state 3 zeigten die iCM-AKT1/2-DKO einen nicht-signifikanten Trend zu einem um 7,5 % niedrigeren Sauerstoffverbrauch als die Wildtypen (siehe Abb. 21). Im state 4 verbrauchten die iCM-AKT1/2-DKO im Durchschnitt 7,1 % mehr Sauerstoff als die Wildtypen. Auch dieser Unterschied war nicht signifikant (siehe Abb. 21). Aus der tendenziell erniedrigten state 3- und erhöhten state 4-Respiration der iCM-AKT1/2-DKO ergab sich eine im Vergleich zu den Wildtypen signifikant erniedrigte RCR der iCM-AKT1/2-DKO (siehe Abb. 21).

Die unter Complex I-Substrat beobachtete Tendenz zu einem erniedrigten Sauerstoffverbrauch der Doppel-KO im state 3u trat unter Complex II-Substrat ebenfalls auf. Die Doppel-KO zeigten im state 3u einen um 12,1 % niedrigeren Sauerstoffverbrauch als die Wildtypen. Dieser Unterschied war signifikant (siehe Abb. 21).

Ebenso wie unter Complex I-Substrat war die *P/O-Ratio* bei den iCM-AKT1/2-DKO gegenüber dem WT signifikant reduziert. Die *P/O-Ratio* der iCM-AKT1/2-DKO lag im Durchschnitt um 9,7 % niedriger als die *P/O-Ratio* der Wildtypen (siehe Abb. 21).

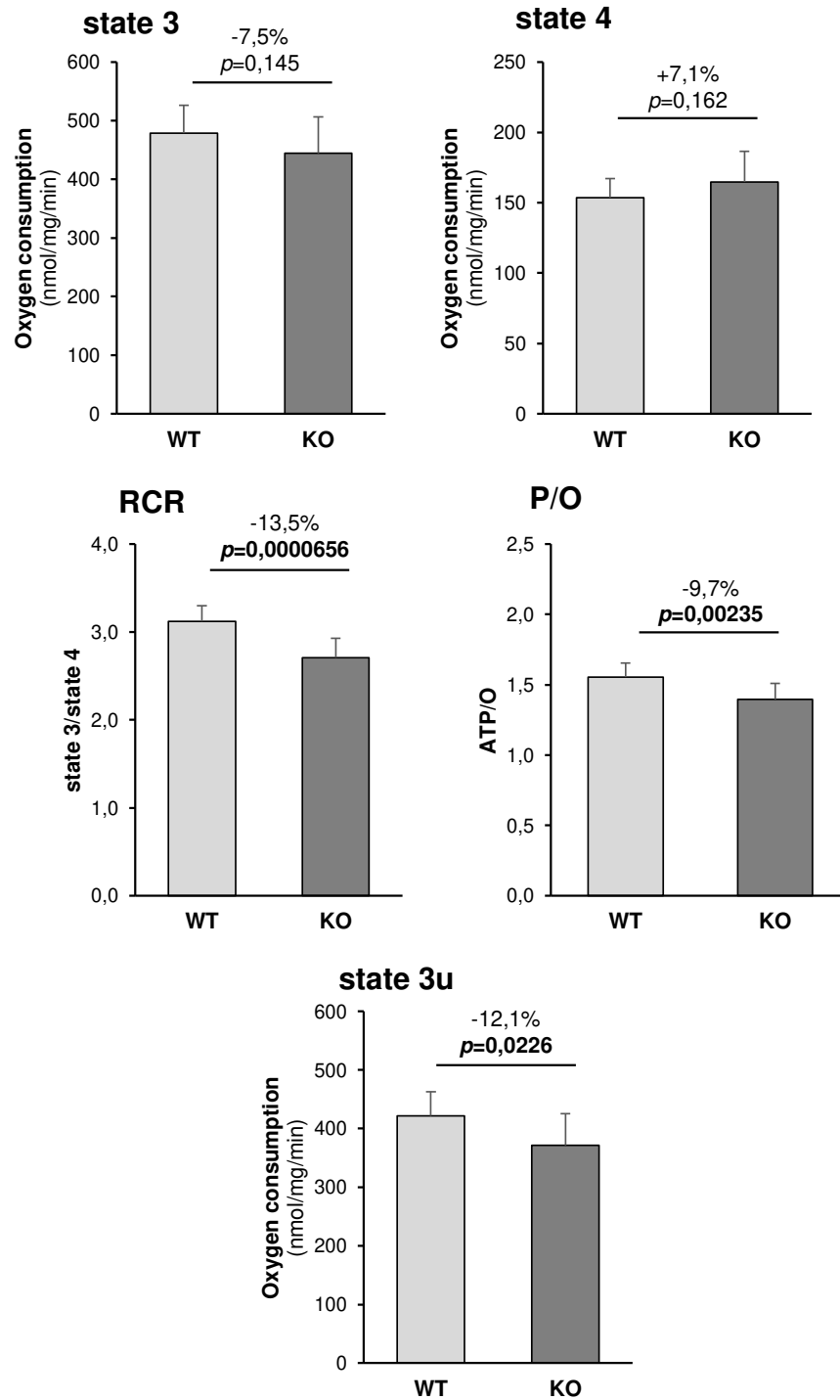


Abb. 21: Graphische Darstellung der unter Complex II-Substrat an isolierten kardiomyozytären Mitochondrien aus WT-Mäusen (WT) und iCM-AKT1/2-DKO (KO) gemessenen respirometrischen Parameter. Der Sauerstoffverbrauch wird in der Einheit nmol O₂/mg Protein/min angegeben. Die Ergebnisse sind zusätzlich in Tabelle 3 dargestellt. Die p-Werte beziehen sich auf den Vergleich zwischen WT und KO. WT n=11; KO n=11.

Palmitoyl-l-carnitin + Malat (PCM):

Im state 3 zeigten die iCM-AKT1/2-DKO� einen um 15,9 % niedrigeren Sauerstoffverbrauch als die Wildtypen. Dieser Unterschied war signifikant (siehe Abb. 22). Im state 4 war der mittlere Sauerstoffverbrauch der iCM-AKT1/2-DKO� gegenüber den Wildtypen um 8,3 % erhöht, dieser Unterschied war allerdings nicht signifikant ($p=0,376$). Die Unterschiede zwischen iCM-AKT1/2-DKO� und Wildtypen in der state 3- und state 4-Respiration führten zu einem signifikanten Unterschied in der RCR: die Doppel-KO� erreichten im Mittel eine um 21,7 % niedrigere RCR als die Wildtypen (siehe Abb. 22).

Nach Entkopplung mittels eines Protonophors (state 3u) lag der Sauerstoffverbrauch der iCM-AKT1/2-DKO� um 22,9 % unter dem Sauerstoffverbrauch der Wildtypen. Dieser Unterschied war signifikant (siehe Abb. 22).

Die *P/O-Ratio* der Doppel-KO� war unter Palmitoyl-l-carnitin/Malat ebenso wie unter Complex I- und Complex II-Substrat signifikant niedriger als bei den Wildtypen. Im Mittel lag die *P/O-Ratio* der iCM-AKT1/2-DKO� um 12,5 % unter der *P/O-Ratio* der Wildtypen (siehe Abb. 22).

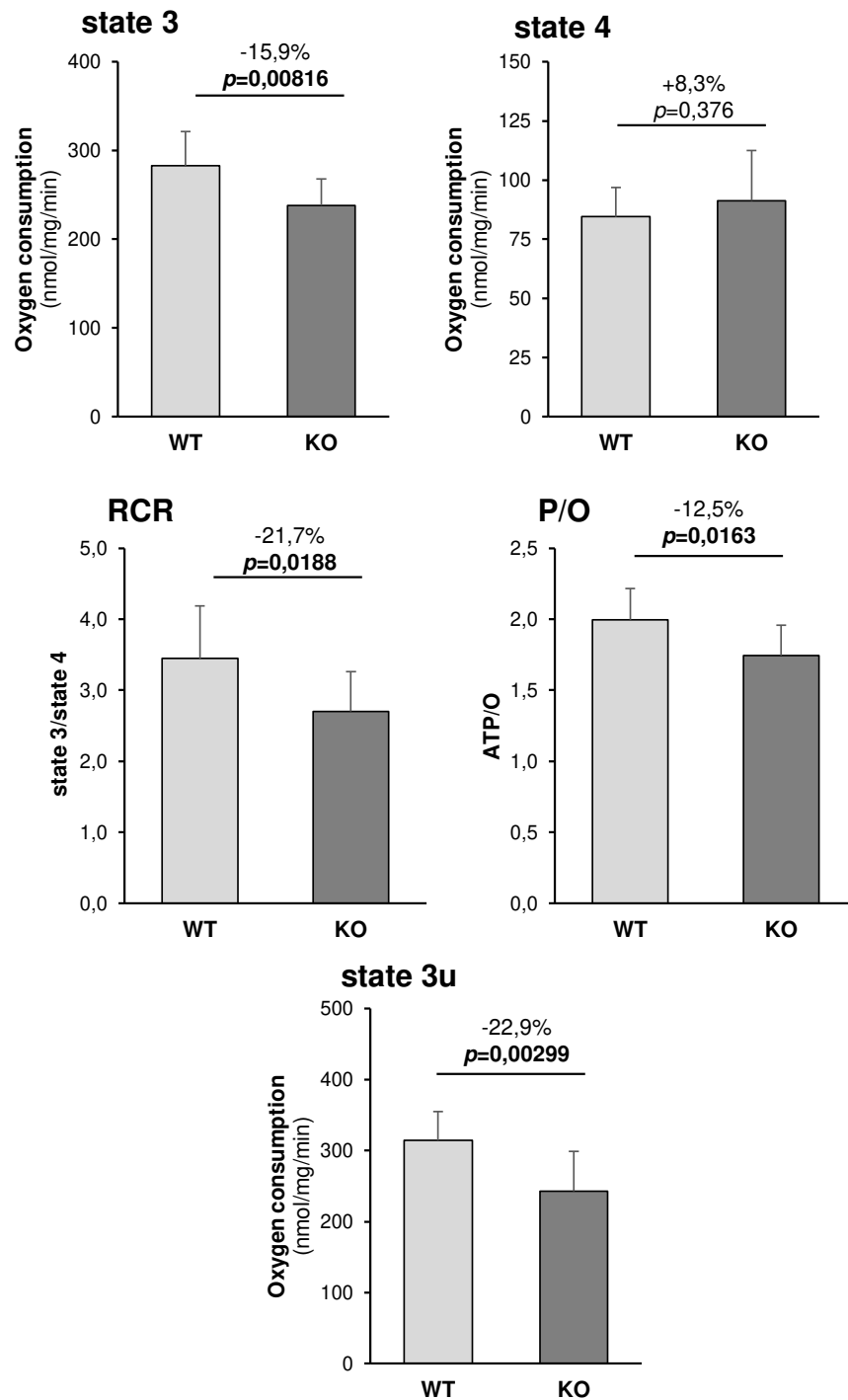


Abb. 22: Graphische Darstellung der unter Palmitoyl-l-carnitin/Malat an isolierten kardiomyozytären Mitochondrien aus WT-Mäusen (WT) und iCM-AKT1/2-DKOs (KO) gemessenen respirometrischen Parameter. Der Sauerstoffverbrauch wird in der Einheit $\text{nmol O}_2/\text{mg Protein}/\text{min}$ angegeben. Die Ergebnisse sind zusätzlich in Tabelle 3 dargestellt. Die p-Werte beziehen sich auf den Vergleich zwischen WT und KO. WT $n=11$; KO $n=10$.

Complex IV-Substrat:

Unter Complex IV-Substrat zeigten die iCM-AKT1/2-DKOs im state 3 einen Trend zu einem geringeren Sauerstoffverbrauch. Dieser lag bei den Doppel-KOs um 10,6 % niedriger als bei den Wildtypen. Dieser Unterschied war nicht signifikant ($p=0,0616$).

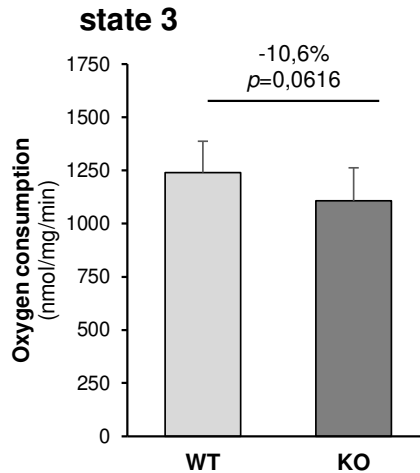


Abb. 23: Graphische Darstellung der unter Complex IV-Substrat an isolierten kardiomyozytären Mitochondrien aus WT-Mäusen (WT) und iCM-AKT1/2-DKOs (KO) gemessenen respirometrischen Parameter. Der Sauerstoffverbrauch wird in der Einheit nmol O₂/mg Protein/min angegeben. Die Ergebnisse sind zusätzlich in Tabelle 3 dargestellt. Die p-Werte beziehen sich auf den Vergleich zwischen WT und KO. WT n=11; KO n=10.

Fazit:

In der Gesamtbetrachtung der respirometrischen Daten der iCM-AKT1/2-DKOs zeigten sich im Vergleich zu den Wildtypen deutlichere Unterschiede als bei den Einzel-KOs.

Über alle eingesetzten Substrate hinweg ließ sich ein starker Trend zu einer verminderten state 3u-Respiration beobachten. Dieser Trend war unter Palmitoyl-l-carnitin/Malat am stärksten ausgeprägt.

Die state 3-Respiration der Doppel-KOs zeigte sich unter Complex II- und Complex IV-Substrat tendenziell vermindert, diese Unterschiede waren allerdings nicht signifikant. Lediglich unter Palmitoyl-l-carnitin/Malat zeigten die iCM-AKT1/2-DKOs auch in der state 3-Respiration einen signifikant verminderten Sauerstoffverbrauch.

Zusätzlich war die P/O-Ratio unter allen eingesetzten Substraten bei den iCM-AKT1/2-DKOs gegenüber den Wildtypen signifikant erniedrigt.

Complex I	state 3	Stabw	Statistik	Complex II	state 3	Stabw	Statistik
WT	325	83	$p=0,767$	WT	479	48	$p=0,145$
KO	316	56		KO	443	60	
Complex I	state 4	Stabw	Statistik	Complex II	state 4	Stabw	Statistik
WT	87	14	$p=0,807$	WT	154	13	$p=0,162$
KO	89	21		KO	165	22	
Complex I	RCR	Stabw	Statistik	Complex II	RCR	Stabw	Statistik
WT	3,69	0,50	$p=0,742$	WT	3,12	0,18	$p=0,0000656$
KO	3,61	0,55		KO	2,70	0,21	
Complex I	P/O	Stabw	Statistik	Complex II	P/O	Stabw	Statistik
WT	2,40	0,16	$p=0,00624$	WT	1,55	0,10	$p=0,00235$
KO	2,17	0,19		KO	1,40	0,12	
Complex I	state 3u	Stabw	Statistik	Complex II	state 3u	Stabw	Statistik
WT	357	31	$p=0,0847$	WT	422	41	$p=0,0226$
KO	321	58		KO	371	54	
PCM	state 3	Stabw	Statistik	Complex IV	state 3	Stabw	Statistik
WT	283	39	$p=0,00816$	WT	1239	148	$p=0,0616$
KO	238	30		KO	1108	155	
PCM	state 4	Stabw	Statistik				
WT	84	12	$p=0,376$				
KO	91	21					
PCM	RCR	Stabw	Statistik				
WT	3,45	0,74	$p=0,0188$				
KO	2,70	0,56					
PCM	P/O	Stabw	Statistik				
WT	2,00	0,22	$p=0,0163$				
KO	1,75	0,21					
PCM	state 3u	Stabw	Statistik				
WT	315	40	$p=0,00299$				
KO	243	56					

Tabelle 3: Übersicht über die Ergebnisse der respirometrischen Messungen an isolierten kardiomyozytärer Mitochondrien aus Wildtyp-Mäusen (WT) und iCM-AKT1/2-DKO-Mäusen (KO). Complex I, II und IV stehen für die verwendeten Substrate, deren Elektronen über die entsprechenden Atmungskettenkomplexe der Elektronentransportkette zugeführt werden. Angegeben werden Mittelwerte, Standardabweichung (Stabw) sowie der statistische Signifikanzwert. Complex I-Substrat: KO n=11, WT n=11; Complex II-Substrat: KO n=11, WT n=11; PCM: KO n=10, WT n=11; Complex IV-Substrat: KO n=10, WT n=11.

4 Diskussion

Das Herz hat einen höheren Energiebedarf als jedes andere Organ und über 90 % der myokardialen Energieproduktion erfolgt durch die mitochondriale oxidative Phosphorylierung (Gupta and Houston, 2017). Wie in der Einleitung ausführlich beschrieben wurde, trägt AKT wesentlich zum Überleben von Kardiomyozyten unter Stress (z.B. mechanische Belastung sowie Ischämie/Reperfusion) bei, indem AKT mit Bcl-2-Proteinen interagiert (Abeyrathna and Su, 2015; Miyamoto et al., 2008), die Transkription diverser pro- und anti-apoptotischer Gene reguliert (Abeyrathna and Su, 2015; Parcellier et al., 2008; Yao et al., 2014) und der Öffnung der mPTP infolge von Ca^{2+} - und ROS-Akkumulation entgegenwirkt (Miyamoto et al., 2008; Yao et al., 2014). Außerdem ist AKT über den AKT-mTORC1-4E-BP1-Signalweg an der kompensatorischen Herzhypertrophie beteiligt (Shimizu and Minamino, 2016; Sussman et al., 2011; Vega et al., 2017) und kann die myokardiale Kontraktilität auch unabhängig von kompensatorischer Hypertrophie steigern (Catalucci et al., 2009; Shiojima et al., 2012).

Zelluläres Überleben, die Anpassung an mechanischen Stress durch kompensatorische Hypertrophie und die Steigerung der Kontraktilität sind energieintensive Prozesse und die Rolle von AKT in der Steuerung dieser Vorgänge lässt die Überlegung, dass AKT auch an der Steuerung der zellulären Bioenergetik beteiligt sein könnte, plausibel erscheinen. So wurde gezeigt, dass Insulinstimulation PI3K-abhängig zu einer Translokation von phosphoryliertem AKT in die Mitochondrien sowie zu einer gesteigerten Complex V-Aktivität führt (Yang et al., 2009). In einer weiteren Studie beobachteten Yang und Kollegen, dass die basale Complex V-Aktivität in globalen AKT1-KOs vermindert ist, und dass konstitutiv aktives AKT1 mit einer mitochondrialen Lokalisationssequenz (Ad-mito-AKT1) die Complex V-Aktivität und außerdem den Phosphokreatin-Gehalt sowie das Phosphokreatin/ATP-Verhältnis in Kardiomyozyten steigert (Yang et al., 2013).

Unter physiologischen Bedingungen werden im Myokard hauptsächlich die Isoformen AKT1 und AKT2 exprimiert (Reinartz et al., 2014). In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob AKT1 sowie AKT2 einen Einfluss auf die Funktion intakter kardiomyozytärer Mitochondrien haben. Zu diesem Zweck wurde die Respiration isolierter kardialer Mitochondrien aus Mäusen mit kardiomyozytärem AKT1-KO (iCM-AKT1-KO) sowie AKT2-KO (iCM-AKT2-KO) im Vergleich zu einer kardialen Mitochondrienpräparation aus Kontrollmäusen (Wildtyp) gemessen. Um zu überprüfen, ob Insulinstimulation die mitochondriale Respiration beeinflusst, wurden die Einzel-KOs und die Wildtypen jeweils in zwei Gruppen eingeteilt, von denen eine vor der Organentnahme eine Insulin-Injektion erhielt.

Da es zahlreiche Nachweise für eine funktionale Überlappung der AKT-Isoformen gibt (Yudushkin, 2019), stellte sich zudem die Frage, inwieweit AKT1 und AKT2 im Kontext der mitochondrialen Bioenergetik den Verlust der jeweils anderen Isoform kompensieren können. Um

die Auswirkungen des Verlustes von AKT1 und AKT2 auf die Mitochondrienfunktion zu untersuchen, wurde die Respiration isolierter kardialer Mitochondrien aus Mäusen mit kardiomyozytärem AKT1/2-Doppel-KO (iCM-AKT1/2-DKO) gemessen und mit einer kardialen Mitochondrienpräparation aus Kontrollmäusen (Wildtyp) verglichen.

Im Folgenden werden die wichtigsten in dieser Arbeit erlangten Erkenntnisse stichpunktartig zusammengefasst. Anschließend werden die Ergebnisse dieser Arbeit im Detail diskutiert.

1. AKT beeinflusst die respiratorische Kapazität kardialer Mitochondrien.
2. AKT beeinflusst die Effizienz der oxidativen Phosphorylierung kardialer Mitochondrien.
3. Insulinstimulation führt tendenziell zu einer gesteigerten mitochondrialen Respiration bei gleichbleibender Effizienz der oxidativen Phosphorylierung.

4.1 Mitochondriale Respiration der Einzel- und Doppel-KOs

Zur Untersuchung des Effektes von AKT auf die Respiration intakter Mitochondrien wurden respirometrische Messungen unter Verwendung verschiedener Substrate an isolierten Mitochondrien aus iCM-AKT1-KOs, iCM-AKT2-KOs und iCM-AKT1/2-DKOs durchgeführt. Im Folgenden werden die Effekte des Verlustes von einer AKT-Isoform sowie von beiden AKT-Isoformen auf die basale (nicht Insulin-stimulierte) mitochondriale Respiration diskutiert.

4.1.1 Respiratorische Kapazität

Die iCM-AKT1/2-DKOs wiesen unter Complex II-Substrat sowie unter Palmitoyl-l-carnitin/Malate eine signifikant geringere state 3u-Respiration auf als die Wildtypen. Unter Complex I-Substrat zeigten die iCM-AKT1/2-DKOs einen nicht-signifikanten Trend zu einer niedrigeren state 3u-Respiration gegenüber den Wildtypen. Bei den Einzel-KOs ergab sich ein gemischtes Bild. Die iCM-AKT1-KOs lagen im state 3u auf Höhe der Wildtypen, während die iCM-AKT2-KOs unter Complex II-Substrat eine nicht-signifikante Tendenz zu einem verringerten Sauerstoffverbrauch zeigten. Die relative Abnahme der iCM-AKT2-KOs im state 3u war hinsichtlich ihrer Größenordnung mit der Abnahme bei den iCM-AKT1/2-DKOs vergleichbar.

Die state 3u-Respiration wird durch die Gabe eines Protonophors wie Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon (CCCP) herbeigeführt, welcher die innere Mitochondrienmembran durchlässig für Protonen macht. Dadurch werden die ADP-Phosphorylierung an Complex V sowie der Elektronentransport zwischen den Reduktionsäquivalenten und Sauerstoff voneinander entkoppelt (Heinen et al., 2007a, 2007b), sodass der gemessene Sauerstoffverbrauch ausschließlich Ausdruck der Kapazität der mitochondrialen Enzymsysteme für Substratoxidation (Substratimport, Substratverarbeitung sowie Elektronentransport) ist (Lanza and Nair, 2009).

Die signifikant verminderte state 3u-Respiration der Mitochondrien aus den iCM-AKT1/2-DKOs lässt also darauf schließen, dass die Kapazität zur mitochondrialen Substratoxidation bei den Doppel-KOs reduziert ist.

Im state 3 zeigten die iCM-AKT1/2-DKOs nur unter Palmitoyl-l-carnitin/Malat eine signifikante Abnahme der Respiration. Unter Complex II-Substrat und Complex IV-Substrat wiesen die Doppel-KOs einen nicht-signifikanten Trend zu einer verringerten Respiration auf. Die iCM-AKT1-KOs lagen im state 3 etwa auf Höhe der Wildtypen, während die iCM-AKT2-KOs unter Complex II- und Complex IV-Substrat einen nicht-signifikanten Trend zu einer verringerten state 3-Respiration aufwiesen. Der relative Unterschied zwischen den iCM-AKT2-KOs und den Wildtypen im state 3 war wiederum hinsichtlich der Größenordnung vergleichbar mit dem relativen Unterschied zwischen den Doppel-KOs und den Wildtypen.

Die state 3-Respiration wird durch Gabe einer definierten Menge ADP herbeigeführt, welches an Complex V unter Protoneneinstrom zu ATP phosphoryliert wird. Die ADP-Phosphorylierung sowie die Substratoxidation sind im state 3 gekoppelt. Daraus folgt, dass Veränderungen in der state 3-Respiration sowohl durch Veränderungen der ATP-Umsetzung (Aktivitäten von Complex V, der Adeninnukleotid-Translokase und des Phosphat-Carriers) als auch der Substratoxidation (Aktivität der Enzymsysteme für Substratimport, Substratverarbeitung und Elektronentransport) verursacht werden können (Brand and Nicholls, 2011). Die signifikanten Veränderungen der iCM-AKT1/2-DKOs im state 3u weisen auf eine reduzierte Kapazität zur Substratoxidation hin. Die vergleichsweise moderaten Veränderungen der Doppel-KOs im state 3 ließen sich durch die Annahme erklären, dass die ATP-Umsetzung normalerweise der limitierende Faktor der state 3-Respiration ist. Eine Abnahme der Substratoxidationskapazität würde sich unter dieser Annahme erst auf die state 3-Respiration auswirken, wenn sie selbst zum limitierenden Faktor der state 3-Respiration würde. Diese Überlegung ist im Einklang mit der Beobachtung, dass der state 3 bei den Doppel-KOs lediglich unter dem Substrat Palmitoyl-l-carnitin/Malat, unter welchem auch die größte state 3u-Abnahme gemessen wurde, signifikant reduziert war. Interessant ist zudem die deutliche Tendenz zu einer Abnahme der state 3-Respiration unter Complex IV-Substrat, welche bei den iCM-AKT2-KOs und den iCM-AKT1/2-DKOs beobachtet wurde. Wie in der Einleitung beschrieben, handelt es sich bei Complex IV-Substrat um TMPD/Ascorbat. TMPD überträgt Elektronen direkt auf Cytochrom c und wird durch Ascorbat wiederum reduziert (Kayser et al., 2004). Einer Abnahme der Respiration unter Complex IV-Substrat kann in diesem experimentellen Setting ein verringerter Cytochrom c-Gehalt der Mitochondrien, eine verminderte Complex IV-Aktivität oder eine reduzierte ATP-Umsetzung zugrunde liegen. Da unter Complex IV-Substrat keine state 3u-Respiration gemessen wurde, ist eine Interpretation im Hinblick auf die Ursache der Veränderung erschwert.

Insgesamt zeigten die iCM-AKT1/2-DKOs eine verminderte respiratorische Kapazität gegenüber den Wildtypen. Dieser Unterschied war unter Palmitoyl-l-carnitin/Malat am deutlichsten

ausgeprägt, was auf eine besondere Beeinträchtigung des Fettsäure-Metabolismus schließen lässt.

Die iCM-AKT1-KOs wiesen hinsichtlich der respiratorischen Kapazität keine Unterschiede gegenüber den Wildtypen auf, wohingegen die iCM-AKT2-KOs Tendenzen zu einer Abnahme der respiratorischen Kapazität zeigten, die in ihrer Größenordnung nur etwas geringer ausgeprägt waren als die Veränderungen der Doppel-KOs. Diese Beobachtungen sprechen tendenziell gegen eine funktionale Überlappung von AKT1 und AKT2 bezüglich der mitochondrialen respiratorischen Kapazität unter Complex I-, Complex II- und Complex IV-Substrat. Für zukünftige Studien wäre eine Messung der respiratorischen Kapazität kardialer Mitochondrien aus iCM-AKT1/2-Einzel-KOs unter Palmitoyl-l-carnitin/Malat von Interesse, da die iCM-AKT1/2-DKO unter diesem Substrat eine deutlich drastischere Abnahme der respiratorischen Kapazität zeigten als unter den anderen Substraten.

Experimente im Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf haben ergeben, dass die in dieser Arbeit verwendeten Mäuse mit iCM-AKT1/2-DKO ein verändertes myokardiales Transkriptom aufweisen. Die Expression von Genen, die für Proteine des Fettsäure-Metabolismus und des Citrat-Zyklus sowie für Untereinheiten der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe codieren, war an Tag 21 nach KO-Induktion signifikant reduziert (Goedecke et al., 2017; Goedecke et al., unveröffentlichte Daten). Zugleich entwickeln die iCM-AKT1/2-DKO innerhalb von 28 Tagen nach Induktion eine Kardiomyopathie mit reduzierter Ejektionsfraktion, während die iCM-AKT1/2-Einzel-KOs eine normale Herzfunktion aufweisen und phänotypisch stabil sind (Goedecke et al., 2017). Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die respiratorische Kapazität von Mitochondrien aus iCM-AKT1/2-DKO insbesondere unter Palmitoyl-l-carnitin/Malat vermindert ist, was auf eine mitochondriale Dysfunktion und einen gestörten Fettsäure-Metabolismus schließen lässt. Die mitochondriale oxidative Phosphorylierung ist für mehr als 90 % der myokardialen Energieproduktion verantwortlich (Gupta and Houston, 2017) und die Oxidation von Fettsäuren ist anteilmäßig die wichtigste Energiequelle für das Myokard (Lopaschuk et al., 2021). Die Ergebnisse dieser Arbeit legen also nahe, dass es durch den Verlust von AKT1 und AKT2 im Myokard zu einem Energiemangel kommen könnte. Ein kardiales Energie-Defizit gilt als wichtiger Faktor im Rahmen der Entstehung und Progression von Herzinsuffizienz (Lopaschuk et al., 2021). Eine gestörte mitochondriale Funktion könnte also eine der Ursachen für die schwere Herzinsuffizienz der iCM-AKT1/2-DKO sein.

Wie genau AKT die mitochondriale Funktion beeinflussen könnte, ist noch nicht ausreichend geklärt. Grundsätzlich kann AKT zelluläre Funktionen über eine Steuerung der Transkription und der Translation sowie über posttranslationale Modifikation beeinflussen (Manning and Toker, 2017) und in der Literatur finden sich zahlreiche Hinweise auf eine Regulation der zellulären Bioenergetik durch AKT.

Es wurde gezeigt, dass die Transkriptionsfaktoren FoxK1 und FoxK2 AKT-abhängig vom Zytoplasma in den Nucleus translozieren (Sakaguchi et al., 2019). Ein Doppel-*Knockdown* von FoxK1 und FoxK2 führte in dieser Studie zu einer verminderten Expression von Genen, die mit dem Lipid-Metabolismus in Zusammenhang stehen und die Doppel-*Knockdown*-Zellen zeigten nach Entkopplung mittels eines Protonophors eine um 73 % verminderte respiratorische Kapazität unter Fettsäure-Oxidation. Die respiratorische Kapazität unter Pyruvat-Glucose war ebenfalls um 21 % reduziert. Re-Expression von FoxK1 und FoxK2 steigerte wiederum die zelluläre Respiration (Sakaguchi et al., 2019). Da diese Experimente an Leberzellen durchgeführt wurden, ist die Übertragbarkeit auf Kardiomyozyten fraglich. Dennoch wurde durch die Ergebnisse dieser Arbeitsgruppe demonstriert, dass AKT über Transkriptionsfaktoren wie FoxK1 und FoxK2 Einfluss auf die mitochondriale Bioenergetik nehmen könnte. Die von Sakaguchi und Kollegen gezeigte drastische Verminderung der Kapazität zur Fettsäureoxidation in den FoxK1/2-Doppel-*Knockdowns* ist angesichts der von uns gemessenen eingeschränkten mitochondrialen Fettsäureoxidation in den iCM-AKT1/2-DKO eine interessante Beobachtung. Ein Ansatz für zukünftige Experimente wäre die Untersuchung der Auswirkungen eines FoxK-*Knockdowns* auf die Genexpression und die mitochondriale Funktion in Kardiomyozyten sowie die Untersuchung der FoxK-Aktivität und -Lokalisation in iCM-AKT1/2-DKO.

Ein weiterer Mechanismus, über welchen AKT die mitochondriale Bioenergetik steuern könnte, ist der AKT-mTOR-Signalweg. AKT phosphoryliert TSC2, wodurch der GTPase-aktivierende Effekt von TSC2 auf Rheb aufgehoben wird. In seiner GTP-gebundenen Form kann Rheb mTORC1 aktivieren (Manning and Toker, 2017). Ein zentrales Target von mTORC1 ist 4E-BP1, welches einen inhibitorischen Komplex mit eIF4E bildet. Die Phosphorylierung von 4E-BP1 durch mTORC1 führt zur Aufhebung dieses inhibitorischen Komplexes und ermöglicht die Initiation der Translation (Morita et al., 2013). An MEF-Zellen mit PTEN-*Knockout* und dementsprechend gesteigerter AKT-Phosphorylierung wurde beobachtet, dass diese eine erhöhte Expression der Atmungskettenkomplexe I bis V auf der Proteinebene sowie eine erhöhte ATP-Synthese-Rate zeigen. Der Anteil von phosphoryliertem 4E-BP1 war in den PTEN-KO-Zellen deutlich erhöht und die Zugabe eines PI3K- oder AKT-Inhibitors führte zu einer Abnahme der 4E-BP1-Phosphorylierung sowie zu einer verminderten Expression der Atmungskettenkomplexe I, III und IV (Goo et al., 2012). An Wildtyp-MEF-Zellen wurde zudem gezeigt, dass die Inkubation mit einem AKT-Inhibitor die Expression der Atmungskettenkomplexe I-V senkt und dass ein *Knockdown* von 4E-BP1 in Anwesenheit und auch in Abwesenheit eines AKT-Inhibitors die Expression der Atmungskettenkomplexe I bis V steigert. Die Autoren schlagen ein Modell vor, wonach AKT über mTORC1 die 4E-BP1-vermittelte Inhibition der Translation aufhebt und dadurch die zelluläre Kapazität zur oxidativen Phosphorylierung steigert (Goo et al., 2012). Eine weitere Arbeitsgruppe zeigte anhand von MCF7-Zellen, dass eine

pharmakologische mTOR-Inhibition die Translation von mehreren Untereinheiten der NADH-Dehydrogenase (Complex I) und der ATP-Synthase (Complex V) sowie die Translation des mitochondrialen Transkriptionsfaktors TFAM vermindert (Morita et al., 2013). Unter mTOR-Inhibition war zudem die zelluläre Respiration, der Gehalt an mitochondrialer DNA sowie der zelluläre ATP-Gehalt reduziert (Morita et al., 2013). Ein *Knockdown* der mTORC1-Komponente Raptor führte zu ähnlichen Resultaten, ein *Knockdown* des mTORC2-Bestandteils Rictor jedoch nicht, woraus die Autoren folgern, dass die beobachteten Effekte durch Inhibition von mTORC1 vermittelt werden (Morita et al., 2013). In der gleichen Studie wurde gezeigt, dass ein *TSC2-Knockout* in MEF-Zellen zu einer gesteigerten Translation von TFAM sowie der δ -Untereinheit der ATP-Synthase führt und die zelluläre Respiration und den Gehalt an ATP und mitochondrialer DNA erhöht (Morita et al., 2013). TFAM ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor, der die Transkription und die Replikation der mitochondrialen DNA steuert (Ngo et al., 2014). Ein Verlust von TFAM führt zu einer letalen mitochondrialen Dysfunktion infolge einer Depletion der mitochondrialen DNA (Piantadosi and Suliman, 2006). Die Ergebnisse von Morita und Kollegen deuten darauf hin, dass mTORC1 über TFAM die mitochondriale Biogenese und damit auch die zelluläre Kapazität zur oxidativen Phosphorylierung stimulieren könnte (Morita et al., 2013). Auch hier ist die Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf Kardiomyozyten fraglich. Angesichts der Tatsache, dass AKT über den mTORC1-4E-BP1-Signalweg an der Entwicklung der kompensatorischen Hypertrophie des Myokards auf erhöhte mechanische Belastung hin beteiligt ist (Shimizu and Minamino, 2016; Sussman et al., 2011; Vega et al., 2017) und mRNA-Translation mit sehr hohen energetischen Kosten verbunden ist (Morita et al., 2013), wäre eine Stimulation der myokardialen Kapazität zur oxidativen Phosphorylierung über den gleichen Signalweg zumindest plausibel. Ein interessanter Ansatz für zukünftige Experimente wäre die Untersuchung, inwieweit die Inhibition bzw. Aktivierung von mTORC1 in Kardiomyozyten die mitochondriale Biogenese und die Expression von Proteinen, die an der oxidativen Phosphorylierung beteiligt sind, beeinflusst. In darauffolgenden Experimenten könnten die Auswirkungen des von uns verwendeten kardiomyozytären *AKT-Knockouts* auf den mTORC1-Signalweg untersucht werden.

In einer weiteren an Kardiomyozyten durchgeführten Studie wurde demonstriert, dass Hypoxie zu einer verminderten Complex IV-Aktivität und einem reduzierten ATP/ADP-Verhältnis führt (Song et al., 2018). PI3K-Inhibition aggravierte die Hypoxie-induzierte mitochondriale Dysfunktion, während IGF1-Gabe die Translokation von phosphoryliertem AKT in die Mitochondrien, die Complex IV-Aktivität und das ATP/ADP-Verhältnis unter Hypoxie steigerte. Die Autoren schlussfolgern, dass mitochondriales phosphoryliertes AKT Complex IV aktiviert (Song et al., 2018). Es ist allerdings unklar, durch welchen Mechanismus AKT in diesem Experiment die Complex IV-Aktivität steigern könnte und ob Hypoxie dabei ein notwendiger Faktor ist. Dennoch könnte ein stimulatorischer Effekt durch AKT auf Complex IV die von uns beobachtete starke Tendenz zu einer Abnahme der state 3-Respiration der iCM-AKT2-KOs und der

iCM-AKT1/2-DKOs unter Complex IV-Substrat erklären. Ein interessanter Ansatz für zukünftige Experimente wäre die Untersuchung der Complex IV-Aktivität und -Expression in Kardiomyozyten mit iCM-AKT-KO.

Es gibt Hinweise darauf, dass AKT auch über posttranslationale Modifikation Einfluss auf die mitochondriale Bioenergetik nehmen könnte. Mehrere Arbeitsgruppen haben bereits beobachtet, dass aktiviertes AKT in die Mitochondrien translozieren kann (Bijur and Jope, 2003; Santi et al., 2010). In Mäuse-Myokard kommt es auf Insulin-Stimulation hin zu einer sequentiellen Translokation von phosphoryliertem AKT1 über die äußere Mitochondrienmembran, den Intermembranraum und die innere Mitochondrienmembran in die mitochondriale Matrix, was mit einer erhöhten Complex V-Aktivität einhergeht (Yang et al., 2013, 2009). Die gleiche Arbeitsgruppe beobachtete, dass AKT1-KO-Mäuse im Gegensatz zu AKT2-KO-Mäusen basal eine reduzierte kardiale Complex V-Aktivität aufweisen und dass Transduktion von mitochondrialem konstitutiv aktiven AKT1 (Ad-mito-AKT1) die Complex V-Aktivität sowie das Phosphokreatin/ATP-Verhältnis in Rattenmyokard steigert (Yang et al., 2013). Im Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie wurde gezeigt, dass AKT1 mit Complex V interagiert (Blasberg, 2015) und diesen wahrscheinlich auch an dessen α -Untereinheit phosphoryliert (Lachmann, 2018). In Zusammenschau mit den Ergebnissen von Yang und Kollegen liegt der Schluss nahe, dass AKT1 nach Import in die Mitochondrien die Aktivität von Complex V auf posttranslationaler Ebene durch Phosphorylierung stimuliert, was sich auf das Phosphokreatin/ATP-Verhältnis auswirkt und somit die myokardiale Bioenergetik beeinflusst. Ein stimulatorischer AKT-Effekt auf Complex V würde sich im experimentellen Setting dieser Arbeit am ehesten an einer veränderten state 3-Respiration zeigen, da diese sowohl von der Kapazität für Substratoxidation als auch von der ATP-Umsetzung abhängt. Voraussetzung für eine veränderte state 3-Respiration durch eine erhöhte Complex V-Aktivität ist allerdings, dass die Complex V-Aktivität der limitierende Faktor der state 3-Respiration ist.

In dieser Arbeit lagen die iCM-AKT1-KOs in der state 3-Respiration unter allen Substraten etwa auf Höhe der Wildtypen. Dies spricht dafür, dass die von Yang und Kollegen an globalen AKT1-KOs beobachtete Reduktion der Complex V-Aktivität entweder in intakten Mitochondrien unter Kopplung von Substratoxidation und ATP-Umsetzung funktional nicht relevant ist, oder auf Effekte des globalen AKT1-KOs zurückzuführen ist und in einem kardiomyozytär spezifischen AKT1-KO nicht vorliegt. Bei den iCM-AKT2-KOs wurden in dieser Arbeit unter Complex II- und Complex IV-Substrat nicht-signifikante Tendenzen zu einer verminderten Respiration im state 3 und state 3u gemessen. Die Veränderungen im state 3 könnten theoretisch auf einer verminderten Complex V-Stimulation durch AKT beruhen. Dagegen spricht allerdings, dass die basale Complex V-Aktivität bei globalen AKT1-KOs, aber nicht bei globalen AKT2-KOs vermindert ist (Yang et al., 2013). Außerdem resultiert eine verminderte state 3u-Respiration aus einer reduzierten Kapazität zur Substratoxidation, wodurch ebenfalls

Veränderungen im state 3 verursacht werden können. Die Doppel-KOs zeigten unter allen Substraten eine verminderte state 3u-Respiration, während die state 3-Respiration nur unter Palmitoyl-l-carnitin/Malat signifikant vermindert war. Dies spricht dafür, dass sich der Verlust beider AKT-Isoformen mehr auf die Substratoxidation als auf die ATP-Umsetzung auswirkt. Somit ist es unwahrscheinlich, dass die mitochondriale Dysfunktion der iCM-AKT1/2-DKOs auf eine reduzierte Stimulation von Complex V durch AKT zurückzuführen ist.

4.1.2 Effizienz der oxidativen Phosphorylierung

Die *P/O-Ratio* ist ein Maß für die Effizienz der oxidativen Phosphorylierung und steht für die Anzahl phosphorylierter ADP-Moleküle pro an Complex IV reduziertem Sauerstoff-Atom (Layec et al., 2016). Bevor die in dieser Arbeit gemessenen *P/O-Ratios* der iCM-AKT1/2-Einzel- und Doppel-KOs diskutiert werden, soll im Folgenden der biochemische Hintergrund dieses Parameters beleuchtet werden.

Die mitochondriale Substratoxidation, welche sich aus Substrat-Import, Substrat-Verarbeitung sowie der durch Reduktionsäquivalente vermittelten Übertragung von Elektronen über die Elektronentransportkette auf Sauerstoff zusammensetzt, ist über die Atmungskettenkomplexe I, III und IV an die Translokation von Protonen von der Matrix in den Intermembranraum gekoppelt (Brand and Nicholls, 2011). Dadurch wird ein Protonengradient Δp zwischen dem Intermembranraum und der mitochondrialen Matrix erzeugt, der sich aus einem elektrischen Gradienten $\Delta \psi$ und einem chemischen Gradienten ΔpH zusammensetzt (Nicholls and Ferguson, 2013, Bioenergetics, p.4), wobei in Mitochondrien die elektrische Komponente den größten Teil von Δp ausmacht (Nicholls and Ferguson, 2013, Bioenergetics, p.5). In Abwesenheit eines Protonenstroms vom Intermembranraum in die mitochondriale Matrix würde sich ein thermodynamisches Gleichgewicht zwischen den Prozessen der Substratoxidation und dem Protonengradienten Δp einstellen, sodass in Analogie zu einem offenen Stromkreis kein weiterer Protonenstrom von der Matrix zum Intermembranraum und somit auch kein Netto-Elektronen-Transport zwischen den Substraten und Sauerstoff mehr stattfände (Nicholls and Ferguson, 2013, Bioenergetics, p.54f). In einem solchen Zustand würde der mitochondriale Sauerstoffverbrauch auf null sinken (Nicholls and Ferguson, 2013, Bioenergetics, p.54). Findet mitochondriale Respiration statt, muss es also Prozesse geben, die effektiv zu einem Wiedereinstrom von Protonen in die mitochondriale Matrix führen. Bei diesen Prozessen unterscheidet man zwischen der ATP-Synthese und dem *Proton-Leak* (Brand and Nicholls, 2011). Complex V ist eine ATP-hydrolysierende Protonenpumpe, die in Abhängigkeit vom Protonengradienten und dem Verhältnis der Konzentrationen von ADP und Phosphat zu ATP entweder ATP synthetisiert oder hydrolysiert. Je stärker der Protonengradient ist, desto mehr wird dieses Verhältnis zum ATP hin verschoben (Nicholls and Ferguson, 2013, Bioenergetics, p.33ff, p.197). Insgesamt ist an der inneren Mitochondrienmembran also die Substratoxidation über

den Protonengradienten an die Phosphorylierung von ADP gekoppelt. Diese Kopplung zwischen Oxidation und Phosphorylierung wird als oxidative Phosphorylierung bezeichnet.

Complex V besteht aus einer F_1 -Domäne auf der Matrix-Seite und einer membranständigen F_0 -Domäne. Die F_1 -Domäne besteht aus drei α - und drei β -Untereinheiten, die einen Ring bilden, in dessen Zentrum die Untereinheit γ sitzt, welche über δ und ϵ mit der F_0 -Domäne verbunden ist (Jonckheere et al., 2012). Die F_0 -Domäne besteht aus einem c-Ring sowie den Untereinheiten a, b, d, F6, OSCP und e, f, g und A6L (Jonckheere et al., 2012). Funktional bilden die α - und β -Untereinheiten mit a, b, d, F6 und OSCP den Stator und der c-Ring sowie γ , δ und ϵ den Rotor (Jonckheere et al., 2012). Protoneneinstrom durch die F_0 -Domäne versetzt den Rotor in Bewegung. Jede Rotation der γ -Untereinheit um 120° gegenüber dem $\alpha\beta$ -Ring führt zu einer Konformationsänderung der Nukleotid-Bindungsstelle jeder β -Untereinheit des Rings. Während der ATP-Synthese bewirkt eine Rotation um 360° , dass alle drei Nukleotid-Bindungsstellen sukzessive die drei Konformationen β_E (leer), β_{DP} (ADP) und β_{TP} (ATP) durchlaufen, sodass insgesamt drei ATP synthetisiert werden (Nakamoto et al., 2008). Jede Untereinheit des c-Rings besitzt einen Glutamat-Rest, der während des Protonentransports erst protoniert und dann wieder deprotoniert wird, was die Rotation des Rotors auslöst (Watt et al., 2010). Daraus folgt, dass die Anzahl an Protonen, die einströmen müssen, um eine volle Drehung des Rotors herbeizuführen, der Anzahl der Untereinheiten des c-Rings entspricht. Watt und Kollegen zeigten, dass Rinder einen c-Ring aus 8 Untereinheiten besitzen, was wahrscheinlich auf die meisten Säugetiere übertragbar ist (Watt et al., 2010). Für die folgende theoretische Kalkulation der *P/O-Ratio* wird daher von einem c-Ring aus 8 Untereinheiten ausgegangen.

Für eine Synthese von drei ATP ist ein Einstrom von 8 Protonen durch die F_0 -Domäne notwendig. Der Import eines Phosphats über den Phosphat-Carrier sowie der Export von ATP über die Adeninnukleotid-Translokase (ANT) führt zusätzlich zum Netto-Import von einem Proton. Somit ergibt sich eine *H⁺/ATP-Ratio* von $11H^+/3ATP=3,67$ (Nicholls and Ferguson, 2013, Bioenergetics, p.272). Pro Elektronenpaar, das ausgehend von NADH über Complex I zu Sauerstoff geleitet wird, werden gemäß aktueller Konvention 10 H^+ -Ionen (*H⁺/O-Ratio*=10) von der Matrix in den Intermembranraum gepumpt. Pro Elektronenpaar, das auf anderem Weg zu Ubichinon gelangt, werden 6 H^+ -Ionen (*H⁺/O-Ratio*=6) aus der Matrix exportiert (Brand and Nicholls, 2011). Daraus ergibt sich eine theoretische *P/O-Ratio* (*H⁺/O-Ratio* geteilt durch *H⁺/ATP-Ratio*) von $10/3,67=2,73$ für Complex I-Substrat und eine theoretische *P/O-Ratio* von $6/3,67=1,63$ für Complex II-Substrat. Da das zur Herbeiführung von state 3-Respiration hinzugegebene ADP nahezu vollständig zu ATP phosphoryliert wird, kann die *P/O-Ratio* praktisch als Verhältnis der zugegebenen Stoffmenge an ADP zum kumulativen Sauerstoffverbrauch im state 3 berechnet werden (Nicholls and Ferguson, 2013, Bioenergetics, p.65).

Die iCM-AKT1/2-DKO zeigt unter Complex I-Substrat, Complex II-Substrat sowie unter Palmitoyl-l-carnitin/Malat eine signifikante Abnahme der *P/O-Ratio*, was auf eine verminderte Effizienz der oxidativen Phosphorylierung hinweist. Bei den iCM-AKT1/2-Einzel-KOs zeigte sich eine nicht-signifikante Tendenz zu einer verminderten *P/O-Ratio*, die hinsichtlich der relativen Abweichung von den Wildtypen etwas geringer ausgeprägt war als bei den Doppel-KOs.

Eine Abnahme der *P/O-Ratio* unter Oxidation desselben Substrats kann theoretisch aus einer Abnahme der *H⁺/O-Ratio*, einer Zunahme der *H⁺/ATP-Ratio* oder einer verminderten Kopplung zwischen Substratoxidation und ATP-Umsetzung resultieren. Da weithin Einigkeit darüber herrscht, dass das stöchiometrische Verhältnis zwischen Elektronentransport bzw. ADP-Phosphorylierung einerseits und Protonen-Translokation andererseits als konstant angenommen werden kann (Brand et al., 1994; Divakaruni and Brand, 2011; Nicholls and Ferguson, 2013, Bioenergetics, p.4), ist die in dieser Arbeit beobachtete Abnahme der *P/O-Ratio* bei den iCM-AKT-KOs ein Hinweis auf verminderte Kopplung zwischen Substratoxidation und ATP-Umsetzung.

Eine verminderte Kopplung der oxidativen Phosphorylierung bedeutet, dass ein größerer Anteil der Respiration auf einen Einstrom von Protonen zurückzuführen ist, der nicht an die Synthese von ATP gekoppelt und somit nicht Complex V-vermittelt ist (Brand and Nicholls, 2011). Neben Complex V gibt es eine Reihe weiterer Prozesse, die zu einem Protoneneinstrom führen. Dazu zählen der Austausch von ATP und ADP, der Phosphat-Import, die Aktivität der Transhydrogenase, einiger mitochondrialer Substrat-Transporter und des im braunen Fettgewebe exprimierten *uncoupling protein 1* (UCP1), welches über einen vermehrten Protoneneinstrom die chemischen Reaktionen der Substratoxidation beschleunigt, wodurch Wärme erzeugt wird (Divakaruni and Brand, 2011; Nicholls, 2021). Auch nach Berücksichtigung dieser Prozesse sowie Inhibition der UCP-Aktivität bleibt ein endogenes *Proton-Leak* bestehen (Nicholls, 2021). Dieses lässt sich nur zu einem geringen Teil auf die Lipidzusammensetzung der inneren Mitochondrienmembran zurückführen und wird wahrscheinlich durch Proteine dieser Membran vermittelt (Nicholls, 2021). Das endogene *Proton-Leak* verhält sich nicht-ohmsch zum Protonengradienten Δp und steigt bei Zunahme von Δp überproportional stark an (siehe Abb. 24) (Divakaruni and Brand, 2011). Durch diese Kinetik ist der Beitrag des *Proton-Leaks* zur gesamten Respiration in Situationen eines hohen ATP-Umsatzes (state 3-ähnliche Bedingungen) minimal und in Situationen eines geringen ATP-Umsatzes (state 4-ähnliche Bedingungen) maximal (Nicholls, 2021). Ein Durchbruch in der Erforschung des Ursprungs des *Proton-Leaks* wurde erzielt, als es Bertholet und Kollegen gelang, mittels Patch-Clamp Ionenströme an Mitoplasten in Anwesenheit eines variablen Membranpotentials direkt zu messen. Diese Arbeitsgruppe identifizierte die Adeninnukleotid-Translokase (ANT) als wichtigsten Protonen-Transporter in Geweben wie dem Myokard, wo kein UCP1 exprimiert wird.

In den Experimenten dieser Arbeitsgruppe schien der Protonenstrom via ANT mit dem Nukleotid-Transport zu konkurrieren, was gut mit der soeben beschriebenen Kinetik des endogenen *Proton-Leaks* vereinbar ist (Bertholet et al., 2019).

Die Tatsache, dass in dieser Arbeit keine signifikant erhöhte state 4-Respiration bei den iCM-AKT-KOs gemessen wurde, steht scheinbar im Widerspruch zu den verringerten *P/O-Ratios*. Hier muss allerdings berücksichtigt werden, dass die Messung der state 4-Respiration ohne gleichzeitige Messung des mitochondrialen Membranpotentials keinen eindeutigen Schluss auf die Protonenleitfähigkeit der inneren Mitochondrienmembran zulässt (Bouillaud et al., 2016; Divakaruni and Brand, 2011). Zur Verdeutlichung ist in Abbildung 24 die Kinetik des *Proton-Leaks* in Abhängigkeit vom Membranpotential $\Delta\psi$ dargestellt. Eine erhöhte state 4-Respiration kann durch Stimulation der Substratoxidation ($\Delta\psi$ steigt) oder Entkopplung ($\Delta\psi$ sinkt) begründet sein (Bouillaud et al., 2016). Eine erniedrigte state 4-Respiration kann umgekehrt aus Inhibition der Substratoxidation ($\Delta\psi$ sinkt) oder einer niedrigeren Protonenleitfähigkeit der Membran ($\Delta\psi$ steigt) resultieren (Bouillaud et al., 2016). Eine konstante state 4-Respiration kann mit einer erhöhten Protonenleitfähigkeit vereinbar sein, wenn gleichzeitig eine eingeschränkte Kapazität zur Substratoxidation vorliegt (siehe Abb. 24B). Wie bereits beschrieben wurde, weisen die kardialen Mitochondrien der iCM-AKT1/2-DKOs eine reduzierte Substratoxidationskapazität auf. Eine gleichzeitige Messung der state 4-Respiration und des mitochondrialen Membranpotentials ist daher ein interessanter Ansatz für zukünftige Experimente und könnte den aufgrund der reduzierten *P/O-Ratios* bestehenden Verdacht auf eine verringerte Kopplung der oxidativen Phosphorylierung der iCM-AKT1/2-DKOs untermauern.

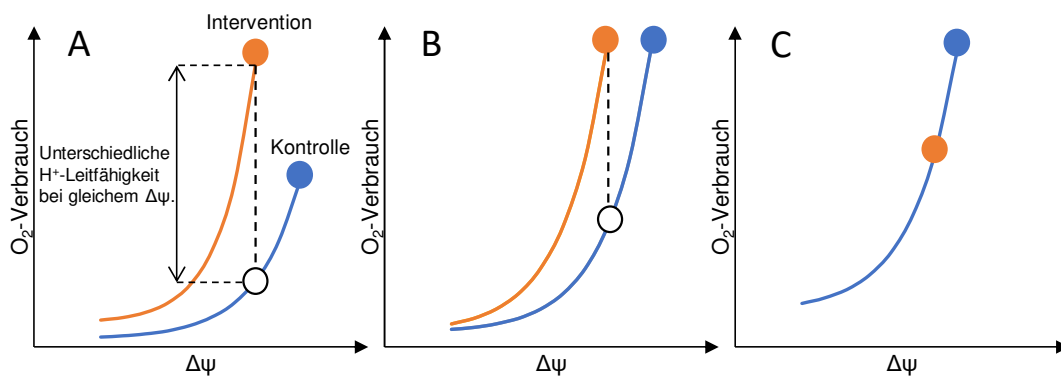


Abb. 24: Kinetik des Proton-Leaks. Gemessen wird der Sauerstoffverbrauch isolierter Mitochondrien unter state 4-Bedingungen. Ausgehend von der nicht-inhibierten state 4-Respiration (blau- bzw. orange-gefärbter Punkt) wird durch Titration eines Inhibitors der ETC die Proton-Leak-Respiration für verschiedene Werte von $\Delta\psi$ gemessen. Blau=Kontrollgruppe, Orange=Interventionsgruppe. A) Die Intervention erhöht die Protonenleitfähigkeit. Die Respiration steigt und $\Delta\psi$ sinkt. B) Die Intervention erhöht die Protonenleitfähigkeit und hemmt die Substratoxidation. Die Respiration bleibt gleich und $\Delta\psi$ sinkt. C) Die Intervention inhibiert die Substratoxidation und hat keinen Einfluss auf die Protonenleitfähigkeit. Modifiziert nach Divakaruni und Brand, 2011.

Die *Proton-Leak*-assoziierte Respiration macht schätzungsweise 20 bis 38% des Grundumsatzes bei Ratten aus (Brand et al., 1994; Stuart et al., 1999), was darauf hinweist, dass das

Proton-Leak eine wichtige physiologische Funktion erfüllt. Neben der Thermogenese durch Beschleunigung der chemischen Reaktionen der Substratoxidation dient das *Proton-Leak* der Regulation der mitochondrialen Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) (Divakaruni and Brand, 2011; Nicholls, 2021; Nicholls and Ferguson, 2013, Bioenergetics, p.296). Mitochondrien sind eine Hauptquelle von reaktiven Sauerstoffspezies wie Superoxid (Murphy, 2009). Diese entstehen, wenn Elektronen ausgehend von Dehydrogenase-Enzymen sowie den Complexen I und III der Atmungskette verfrüht auf Sauerstoff übertragen werden, was als Elektron-*Leaking* bezeichnet wird (Brand, 2016). Die Produktionsrate reaktiver Sauerstoffspezies in den Mitochondrien hängt ab vom Redox-Zustand derjenigen Bestandteile der Substratoxidation, welche anfällig für das Elektron-*Leaking* sind (Brand, 2016). Strömen weniger Protonen zurück in die Matrix, weil der ATP-Umsatz sinkt, so wird der Protonengradient Δp stärker und die Atmungskette sowie die stromaufwärts gelegenen Dehydrogenasen werden vermehrt reduziert, was die ROS-Produktion begünstigt (Bouillaud et al., 2016). Eine partielle Entkopplung über das *Proton-Leak* hält dagegen die Respiration (und damit die Re-Oxidation aller Bestandteile der Substratoxidation) auch bei geringem ATP-Umsatz aufrecht und vermindert dadurch die ROS-Produktion (Bouillaud et al., 2016). Durch die nicht-ohmsche Kinetik des *Proton-Leaks* ergibt sich ein Mechanismus, der bei niedrigem ATP-Umsatz und hohem Δp vor oxidativem Stress schützt und bei hohem ATP-Umsatz und niedrigem Δp weniger aktiv ist, wodurch die Effizienz der oxidativen Phosphorylierung normalerweise nur gering beeinträchtigt wird (Nicholls, 2021; Nicholls and Ferguson, 2013, Bioenergetics, p.296). Unter starkem oxidativem Stress kann das *Proton-Leak* jedoch stimuliert werden. Es wurde beobachtet, dass ein Anstieg von Superoxid das *Proton-Leak* in verschiedenen Geweben stimuliert (Echtay et al., 2002). Lipidperoxidationsprodukte wie 4-Hydroxy-2-nonenal können im Myokard ANT-vermittelt die Protonenleitfähigkeit der Membran deutlich steigern (Bertholet et al., 2019; Echtay, 2003). Die Beobachtungen dieser Arbeitsgruppen deuten darauf hin, dass oxidativer Stress zu einer vermehrten Entkopplung und somit zu einer Abnahme der Effizienz der oxidativen Phosphorylierung führen könnte.

In der Literatur gibt es einige Hinweise darauf, dass eine Störung des Insulin-AKT-Signalwegs zu einer verringerten Effizienz der oxidativen Phosphorylierung und zu oxidativem Stress führt. Herzen aus Mausmodellen für Diabetes mellitus Typ 1 und Typ 2 weisen einen erhöhten Sauerstoffverbrauch auf (How et al., 2006; Mazumder et al., 2004), was die Autoren teils auf die in diabetischen Herzen stärker ausgeprägte Fettsäureoxidation (die *P/O-Ratio* von Fettsäuren ist etwas niedriger als die von Glucose), aber auch auf die Möglichkeit einer Entkopplung durch freie Fettsäuren aus dem Blut oder aus intrazellulären Speichern (Mazumder et al., 2004) zurückführen. Tatsächlich wurde gezeigt, dass erhöhte Fettsäure-Spiegel im Blut zu einem erhöhten kardialen Sauerstoffverbrauch führen (Mjøs, 1971) und dass bei Typ 2 Diabetikern das Phosphokreatin/ATP-Verhältnis im Myokard invers mit der Fettsäure-Konzentration im Blut

korreliert (Scheuermann-Freestone et al., 2003). Boudina und Kollegen beobachteten, dass kardiale Mitochondrien aus einem Mausmodell für Diabetes mellitus Typ 2 eine erhöhte ROS-Produktion sowie erhöhte Konzentrationen an Lipidperoxidationsprodukten aufweisen und dass die Protonenleitfähigkeit kardialer Mitochondrien dieser Mäuse unterhalb eines Membranpotentials von 150mV gegenüber der Kontrolle deutlich erhöht ist. Permeabilisierte Kardiomyozyten der diabetischen Mäuse zeigten unter Palmitoyl-l-carnitin/Malat eine erhöhte state 4-Respiration, eine verringerte *P/O-Ratio* und eine verminderte ATP-Syntheserate (Boudina et al., 2007). Um zwischen systemischen Effekten des diabetischen Phänotyps und den isolierten Auswirkungen eines gestörten kardialen Insulin-Signalwegs differenzieren zu können, untersuchte die gleiche Arbeitsgruppe daraufhin Mäuse mit perinatalem kardiomyozytärem Insulin-Rezeptor-*Knockout* (CIRKO) (Boudina et al., 2009). In Langendorff-Experimenten unter Glucose-Perfusion zeigten die CIRKO-Herzen eine verringerte kardiale Effizienz bei gleichem Sauerstoffverbrauch. Permeabilisierte Fasern aus den CIRKO-Herzen zeigten unter Palmitoyl-l-carnitin/Malat eine verminderte respiratorische Kapazität sowie eine geringere ATP-Synthese-Rate und *P/O-Ratio*. Isolierte Mitochondrien aus CIRKO-Herzen wiesen unter Palmitoyl-l-carnitin/Malat eine um 30% erhöhte Respiration in Anwesenheit von Oligomycin (state 4_{oligo}) und eine Abnahme der ATP-Syntheserate und der *P/O-Ratio* auf (Boudina et al., 2009). Außerdem zeigten die CIRKO-Mäuse Hinweise auf oxidativen Stress. Die mitochondriale H₂O₂-Produktion in CIRKO-Herzen war erhöht und die ROS-sensitive Aconitase-Aktivität deutlich vermindert. Durch Behandlung der Mäuse mit MnTBAP (Stimulator der Superoxiddismutase) konnte sowohl die Aconitase-Aktivität als auch die erhöhte state 4_{oligo}-Respiration normalisiert werden (Boudina et al., 2009). Diese Daten legen nahe, dass eine Störung des Insulin-Signalwegs zu einem Zustand reduzierter myokardialer bioenergetischer Effizienz und oxidativem Stress führt. Die reduzierte bioenergetische Effizienz könnte durch ein verstärktes *Proton-Leak* über die innere Mitochondrienmembran vermittelt werden. Aus diesen Publikationen geht allerdings nicht hervor, inwieweit eine verminderte AKT-Aktivität an diesem Zustand beteiligt sein könnte. Eine andere Arbeitsgruppe beobachtete, dass in globalen AKT1-KOs die myokardiale *P/O-Ratio* im Vergleich zum Wildtyp reduziert ist (Yang et al., 2013). Deng und Kollegen beobachteten an Kardiomyozyten mit transduziertem konstitutiv aktivem mitochondrialem AKT1 (Ad-mito-AKT1) eine reduzierte basale Respiration sowie eine erhöhte ATP-Produktion. Transduktion von dominant negativem mitochondrialem AKT (mdnAKT) hatte einen inversen Effekt und erhöhte den basalen Sauerstoffverbrauch und senkte die ATP-Produktion (Deng et al., 2014). Zusätzlich wurde beobachtet, dass Transduktion von mdnAKT unter basalen Bedingungen die ROS-Produktion erhöht und zur Depolarisation der IMM führt. Unter Ischämie/Reperfusion verstärkte mdnAKT die ROS-Produktion, die Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials und die Apoptose-Rate, während Ad-mito-AKT1 diese Effekte gegenüber der Kontrolle deutlich verringerte (Deng et al., 2014). In einer weiteren Studie wurde beobachtet, dass IGF1 in hypoxischen Kardiomyozyten zu vermehrter mitochondrialer

Translokation von phosphoryliertem AKT führt und der Hypoxie-induzierten ROS-Produktion und Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials entgegenwirkt (Song et al., 2018).

Die Ergebnisse dieser Arbeitsgruppen legen nahe, dass eine verminderte Aktivität des Insulin-AKT-Signalwegs zu oxidativem Stress und einer reduzierten Effizienz der oxidativen Phosphorylierung führen könnte.

In Zusammenschau mit den Beobachtungen verschiedener Arbeitsgruppen, wonach oxidativer Stress Entkopplung herbeiführt (Bertholet et al., 2019; Echtay, 2003; Echtay et al., 2002), stellt sich die Frage, ob der Insulin-AKT-Signalweg in die zellulären und mitochondrialen Schutzmechanismen gegen oxidativen Stress involviert ist. Es wurde gezeigt, dass Insulin die myokardiale Peroxynitrit-Produktion reduziert, zu einem Anstieg der Aktivität der Superoxid-dismutase führt und die gp91^{phox}-Expression (Bestandteil der NADPH-Oxidase) vermindert. Dieser kardioprotektive und antioxidative Effekt von Insulin wurde durch den PI3K-Inhibitor Wortmannin gehemmt (Ji et al., 2010) und könnte somit AKT-abhängig sein. Eine andere Arbeitsgruppe zeigte, dass Insulin über Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs in Kardiomyozyten, welche mechanischem Stress ausgesetzt wurden, den Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies unterdrücken, das mitochondriale Membranpotential aufrechterhalten und Apoptose sowie Nekrose reduzieren kann (Teshima et al., 2010). Außerdem wurde gezeigt, dass Insulin PI3K-abhängig zur Aktivierung von Nrf2 führt, welches über das *Antioxidant Response Element* (ARE/EpRE) die Transkription antioxidativer Enzyme reguliert (Tan et al., 2011). Eine andere Möglichkeit, durch die der Wegfall von AKT zu oxidativem Stress führen könnte, ist eine veränderte Expression von Komponenten der Substratoxidation (siehe 4.1.1): Falls sich durch den Wegfall der AKT-Aktivität in den iCM-AKT-KOs das stöchiometrische Verhältnis zwischen einzelnen Komponenten der Substratoxidation verändert, kann dadurch auch der Redox-Zustand einzelner Komponenten beeinflusst werden, was wiederum zu einer veränderten ROS-Produktion führen kann (Brand, 2016). Ein interessanter Ansatz für zukünftige Experimente wäre eine Messung der Superoxid- und H₂O₂-Produktion an kardialen Mitochondrien aus iCM-AKT-KOs.

Insgesamt weisen die in dieser Arbeit gemessenen verminderten *P/O-Ratios* der iCM-AKT1/2-DKOs auf eine Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung hin, was sich bei gleicher Respiration negativ auf die ATP-Syntheserate auswirkt. Da bei den iCM-AKT1/2-DKOs wie unter 4.1.1 beschrieben zudem die respiratorische Kapazität deutlich vermindert ist, liegt der Schluss nahe, dass die kardialen Mitochondrien der Doppel-KOs in ihrer ATP-Synthesekapazität massiv limitiert sind. Da Energie-Mangel ein entscheidender Faktor in der Genese und Progression von Herzinsuffizienz ist (Lopaschuk et al., 2021), könnte die mitochondriale Dysfunktion der iCM-AKT1/2-DKOs der Kardiomyopathie, die diese Mäuse innerhalb von drei Wochen nach KO-Induktion entwickeln, zugrunde liegen.

4.1.3 Mitochondriale Respiration nach Insulinstimulation

Insulin ist ein bedeutender Regulator diverser Prozesse im Myokard und stimuliert die Glucose-Aufnahme via GLUT4 sowie die Glykolyse und bewirkt einen *Substrate-Switch* im Myokard von Fettsäureoxidation zu Glucoseoxidation (Bertrand et al., 2008), wodurch die respiratorische Effizienz (ATP-Produktion im Verhältnis zum Sauerstoffverbrauch) steigt (Karwi et al., 2018). Zahlreiche Studien weisen auf eine Bedeutung des Insulin-Signalwegs für die myokardiale Bioenergetik hin. So führt der perinatale Verlust des kardiomyozytären Insulin-Rezeptors in CIRKO-Mäusen zu einer verringerten Expression vieler in die Substratoxidation involvierter mitochondrialer Proteine, was mit einer reduzierten Kapazität der oxidativen Phosphorylierung einhergeht (Boudina et al., 2009). Die Arbeitsgruppe von Yang und Kollegen zeigte, dass auf Insulinstimulation hin phosphoryliertes AKT innerhalb weniger Minuten in die Mitochondrien transloziert, was mit einer deutlich erhöhten Complex V-Aktivität einhergeht (Yang et al., 2009). Vorherige Arbeiten in unserem Institut haben zudem ergeben, dass AKT mit Complex V interagiert (Blasberg, 2015) und diesen phosphorylieren kann (Lachmann, 2018). Diese Ergebnisse werfen die Frage auf, ob Insulin die Funktion intakter Mitochondrien akut stimuliert. In dieser Arbeit wurde daher der akute Effekt von Insulin auf isolierte kardiale Mitochondrien aus Wildtyp-Mäusen sowie iCM-AKT1-KOs und iCM-AKT2-KOs untersucht. Die Mäuse der drei Genotypen wurden jeweils in eine +Ins Gruppe und eine -Ins Gruppe eingeteilt.

Unter allen verwendeten Substraten ergab sich in den +Ins Gruppen ein Trend zu einem höheren Sauerstoffverbrauch im state 3 und im state 3u gegenüber den korrespondierenden -Ins Gruppen. Dieser Trend war bei den iCM-AKT1-KOs unter Complex I-Substrat im state 3 am stärksten ausgeprägt. Bei den iCM-AKT2-KOs lag die state 3u-Respiration in der +Ins Gruppe unter Complex II-Substrat aufgrund niedriger Standardabweichungen signifikant über der -Ins Gruppe. Aufgrund des Anstiegs der state 3-Respiration stieg insbesondere unter Complex I-Substrat die RCR der Einzel-KOs an, wohingegen die RCR der Wildtypen aufgrund einer nicht-signifikanten Zunahme der state 4-Respiration nahezu konstant blieb. In der state 4-Respiration sowie in der *P/O-Ratio* zeigten sich keine Veränderungen in den +Ins Gruppen. Eine Steigerung der state 3u-Respiration resultiert aus einer erhöhten Kapazität der Enzymsysteme für Substratoxidation (Transporter, Dehydrogenasen und ETC-Proteine), während eine gesteigerte state 3-Respiration auch aus einer beschleunigten ATP-Umsetzung (ANT, Phosphat-Carrier, Complex V) resultieren kann (Brand and Nicholls, 2011). Die beobachtete Tendenz zu einer erhöhten Respiration der +Ins Gruppen im state 3 und state 3u weist also darauf hin, dass eine akute Insulinstimulation die mitochondriale Substratoxidation (Veränderungen im state 3u) und vielleicht auch die ATP-Umsetzung beschleunigen könnte.

Wie eingangs beschrieben führt Insulinstimulation innerhalb weniger Minuten zu einer Translokation von phosphoryliertem AKT in die Mitochondrien und steigert die Complex V-Aktivität

(Yang et al., 2009). Beide Effekte werden durch PI3K-Inhibition aufgehoben, sodass die Complex V-Stimulation wahrscheinlich AKT-vermittelt stattfindet (Yang et al., 2009). Ein globaler AKT1-*Knockout* führt zu einer basal verminderten Complex V-Aktivität, welche durch akute Insulinstimulation unter kompensatorischer mitochondrialer Translokation von AKT2 normalisiert wird (Yang et al., 2013). Konstitutiv aktives AKT1 mit mitochondrialer Lokalisationssequenz (Ad-mito-AKT1) führt in Rattenmyokard zu einer gesteigerten Complex V-Aktivität und erhöht den ATP-Gehalt, den Phosphokreatin-Gehalt sowie das Phosphokreatin/ATP-Verhältnis in Kardiomyozyten (Yang et al., 2013). Diese Ergebnisse untermauern die These, dass AKT die Aktivität von Complex V regulieren kann. Die Erhöhung des Phosphokreatin- und ATP-Gehalts durch Ad-mito-AKT1 muss allerdings nicht zwangsläufig auf eine akute Stimulation von Complex V zurückzuführen sein, da diesen Messungen eine mehrtägige konstitutive mitochondriale AKT-Aktivität vorausging (Yang et al., 2013). Es wurde gezeigt, dass Ad-mito-AKT1 wahrscheinlich keinen Einfluss auf die Aktivität von AKT im Nucleus und im Zytosol hat (Su et al., 2012). Dennoch könnte eine mehrtägige konstitutive Aktivität von AKT zu zahlreichen Effekten führen, die über eine akute Insulinstimulation hinausgehen. Interessanter für die Beurteilung der physiologischen Relevanz der AKT-vermittelten Complex V-Stimulation und etwaiger weiterer akuter AKT-Effekte wäre daher die Messung des ATP- und Phosphokreatin-Gehalts im Myokard vor und nach Insulinstimulation.

Vorarbeiten im Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie haben gezeigt, dass AKT mit Complex V interagiert (Blasberg, 2015) und diesen auch an der α -Untereinheit phosphorylieren kann (Lachmann, 2018). Anhand von Immunpräzipitation mitochondrialer Proteine aus Leberzellen mit einem phospho-AKT-Substrat-Antikörper (dieser bindet an Proteine, die die AKT-Konsensus-Sequenz enthalten und an dieser phosphoryliert sind), Auftrennung mittels Flüssigchromatographie und anschließender Analyse der Banden durch Massenspektrometrie wurden in einer weiteren Studie ebenfalls die Complex V-Untereinheiten α und β als mögliche Substrate von AKT identifiziert (Li et al., 2013). Eine Immunpräzipitation mitochondrialer Proteine mit einem phospho-AKT-Substrat-Antikörper oder einem panAKT-Antikörper und anschließende Western Blot-Analyse unter Verwendung von Antikörpern gegen verschiedene Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe zeigte zudem eine Assoziation von AKT und der α -Untereinheit von Complex V (Li et al., 2013).

Eine Stimulation der Aktivität von Complex V durch AKT könnte, sofern die ATP-Synthese der limitierende Schritt der ATP-Umsetzung und die ATP-Umsetzung wiederum der limitierende Schritt der state 3-Respiration ist, die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete Tendenz zu einer Steigerung der state 3-Respiration in den +Ins Gruppen erklären. Allerdings ergaben sich hierbei einige Auffälligkeiten: Globale AKT1-KOs zeigten eine verminderte Complex V-Aktivität, die durch Insulin-vermittelte kompensatorische AKT2-Translokation in die Mitochondrien ausgeglichen werden konnte, während globale AKT2-KOs nur eine nicht-signifikante Tendenz zu

einer verminderten Complex V-Aktivität aufwiesen (Yang et al., 2013). In dieser Arbeit zeigten dagegen nur die iCM-AKT2-KOs einen Trend zu einer verminderten basalen state 3-Respiration unter Complex II- und Complex IV-Substrat, während die iCM-AKT1-KOs basal im state 3 auf Höhe der Wildtypen lagen. Wie bereits unter 4.1.1 diskutiert, könnte es sein, dass die von Yang und Kollegen gemessene Verminderung der Complex V-Aktivität entweder auf Effekten des globalen AKT1-KOs beruht oder in intakten Mitochondrien keine Auswirkungen auf die Respiration hat. Eine andere Möglichkeit wäre, dass die von Yang und Kollegen beobachtete verminderte Complex V-Aktivität in globalen AKT1-KOs auf einen anderen Mechanismus zurückzuführen ist als die akute Complex V-Stimulation über den Insulin-AKT-Signalweg. Da die +Ins Gruppen in dieser Arbeit auch eine Tendenz zu einem Anstieg im state 3u zeigten, was nicht durch eine Stimulation der ATP-Umsetzung erklärt werden kann, ist es wahrscheinlich, dass AKT neben Complex V noch weitere mitochondriale Proteine reguliert.

Ein mitochondriales Protein, das wahrscheinlich über den Insulin-AKT-Signalweg gesteuert wird, ist der Pyruvat-Dehydrogenase-Complex (PDC). Im Rahmen des glykolytischen Abbaus von Glucose entsteht Pyruvat, welches über den mitochondrialen Pyruvat-Carrier (MPC) in die mitochondriale Matrix transportiert wird (Karwi et al., 2018). Der PDC besteht aus den Komponenten E1 (Pyruvat-Dehydrogenase), E2 (Dihydroliponamid-Acetyltransferase) sowie E3 (Dihydroliponamid-Dehydrogenase) und katalysiert unter Gewinnung von NADH die Umsetzung von Pyruvat zu CO₂ und Acetyl-CoA (Patel et al., 2014). Der PDC ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Glucoseoxidation (Karwi et al., 2020). Eine Phosphorylierung an der E1 α -Untereinheit durch PDKs (Pyruvat Dehydrogenase Kinase) hemmt den PDC und eine Dephosphorylierung jener Untereinheit durch PDPs (Pyruvat Dehydrogenase Phosphatase) aktiviert den PDC (Griffin et al., 2016). Bei gleichzeitiger Verfügbarkeit von Fettsäuren und Glucose sowie in Abwesenheit von Insulin präferiert das Myokard Fettsäuren als anteilmäßig wichtigstes Substrat (Randle et al., 1963). Die Fettsäureoxidation liefert Acetyl-CoA, NADH und Citrat. Ein erhöhtes Verhältnis von Acetyl-CoA zu CoA und von NADH zu NAD⁺ führt zu einer erhöhten PDK-Aktivität und somit zur Inhibition des PDC, während Citrat das Schlüsselenzym der Glykolyse (PFK1) inhibiert (Griffin et al., 2016). Unter Insulinstimulation kommt es jedoch zu einem *Substrate-Switch* im Myokard: Insulin aktiviert PI3K-abhängig die PFK2, die über ihr Produkt Fructose-2,6-bisphosphat die PFK1 aktiviert, wodurch die Glykolyse stimuliert wird (Bertrand et al., 2008). Über eine AMPK-Inhibition und somit eine Disinhibition der Acetyl-CoA Carboxylase (ACC) erhöht Insulin den Gehalt an Malonyl-CoA, was die Fettsäure-Aufnahme in die Mitochondrien inhibiert (Lopaschuk et al., 2021). Zudem führt Insulin zu einer Translokation von phosphoryliertem AKT in die Mitochondrien, was mit einer signifikanten Abnahme der PDH-E1 α -Phosphorylierung, einer starken Abnahme der Fettsäureoxidation und einer Zunahme der Glucoseoxidation einhergeht (Karwi et al., 2020). Gezielte AKT-Inhibition neutralisiert diese Effekte, was für eine Regulation der PDC-Aktivität durch den Insulin-AKT-Signalweg spricht (Karwi et al., 2020). In einer weiteren Studie wurde gezeigt,

dass Insulinstimulation in Kardiomyozyten zu einer Assoziation von AKT1 und dem PDC sowie zu einer erhöhten PDC-Aktivität führt (Deng et al., 2014).

Die physiologische Relevanz dieses Signalwegs wird durch einige interessante Ergebnisse verdeutlicht. Der *Switch* von Fettsäureoxidation zu Glucoseoxidation führt zu einer erhöhten respiratorischen Effizienz (Karwi et al., 2018), was unter erhöhter Herzbelastung relevant sein könnte. So führt β -adrenerge Stimulation über einen PKA-vermittelten $[Ca^{2+}]$ - Anstieg zu einer Aktivierung der PDP1, welche den PDC aktiviert (Griffin et al., 2016). Insulinresistenz spielt zudem eine zentrale Rolle in der Entstehung und Progression von Herzinsuffizienz: Eine verminderte Glucoseoxidation könnte unter anderem durch verringerte respiratorische Effizienz und ATP-Produktion zu der für Herzinsuffizienz typischen myokardialen Energie-Depletion führen (Lopaschuk et al., 2021). Interessanterweise führt eine pharmakologische Stimulation der Glucoseoxidation mit dem PDK-Inhibitor Dichloroacetat sowohl in Tier-Modellen als auch an Herzinsuffizienz-Patienten zu einer Verbesserung der kardialen Effizienz und der Kontraktilität (Lopaschuk et al., 2021).

Eine Stimulation der PDC-Aktivität über den Insulin-AKT-Signalweg könnte die von uns beobachtete Tendenz zu einer gesteigerten Respiration der +Ins Gruppen im state 3 und state 3u unter Complex I-Substrat (Pyruvat, Glutamat, Malat) erklären und spräche in Anbetracht der Tatsache, dass diese Tendenz sowohl bei den iCM-AKT1-KOs als auch bei den iCM-AKT2-KOs gemessen wurde, eher gegen eine isoformspezifische Regulation des PDC durch AKT. In zukünftigen Experimenten könnte die Respiration unter Pyruvat als alleinigem Substrat mit und ohne Insulinstimulation gemessen werden, um einen etwaigen Insulin-AKT-PDC-Effekt auf intakte Mitochondrien stärker hervorzuheben.

In einer weiteren und bereits unter 4.1.1 diskutierten Studie wurde gezeigt, dass Kardiomyozyten unter Hypoxie eine verringerte Complex IV-Aktivität, ein vermindertes ATP/ADP-Verhältnis und eine Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials zeigen (Song et al., 2018). IGF1-Inkubation vor der Hypoxie wirkte diesen Effekten entgegen und Inkubation mit einem PI3K-Inhibitor vor der Hypoxie aggravierte diese Effekte (Song et al., 2018), woraus die Autoren folgern, dass AKT Complex IV aktivieren könnte. Ob es sich hierbei jedoch um akute Effekte handelt, ist unklar, da die Inkubation mit IGF1 bzw. dem PI3K-Inhibitor eine Stunde vor der Hypoxie begann und die Autoren nicht angeben, wie lange die Kardiomyozyten den hypoxischen Bedingungen ausgesetzt wurden. Ein akuter stimulatorischer Effekt des Insulin-AKT-Signalwegs auf Complex IV könnte zu den in dieser Arbeit beobachteten Trends zu einer erhöhten Respiration der +Ins Gruppen im state 3 und state 3u unter allen Substraten beitragen, da Complex IV stromabwärts aller eingesetzten Substrate arbeitet. Anhand von Einzelkomplex-Messungen könnte in zukünftigen Experimenten untersucht werden, ob kurzzeitige Insulinstimulation die Complex IV-Aktivität in kardialen Mitochondrien steigern kann.

4.2 Mögliche pathologische Effekte durch das Cre-loxP-System

In dieser Arbeit wurden iCM-AKT1/2-Einzel- und Doppel-KO-Mäuse verwendet. Der Knockout wurde mittels des Cre-loxP-Systems generiert und durch Tamoxifen induziert. Die Rekombinase Cre wurde erstmals in der Bakteriophage P1 entdeckt und führt an loxP-flankierten DNA-Sequenzen zu Rekombination (Hoess et al., 1982; Sternberg and Hamilton, 1981). Das Cre-loxP-System wird zur gezielten Deletion von Genen in Zellen sowie Tieren genutzt (Zhang et al., 1996). Die Cre-Expression kann unter die Kontrolle des α -MHC-Promotors gestellt werden und erlaubt somit Kardiomyozyten-spezifisches Gen-*Editing* (Sohal et al., 2001). Eine zeitliche Kontrolle der KO-Induktion kann zusätzlich durch Fusion von Cre mit der G525R-Mutante der Hormonbindungsdomäne des Östrogenrezeptors (*Mer=Mutated estrogen receptor*) erzielt werden. Als MerCreMer-Fusionsprotein verbleibt Cre gebunden an HSP-90 inaktiv im Zytoplasma, bis es durch die Gabe eines selektiven Östrogen-Rezeptor-Modulators wie Tamoxifen aktiviert wird (Asp et al., 2013). Um anhand des Cre-loxP-Systems die Auswirkung eines gezielten *Knockouts* auf die mitochondriale Funktion zu untersuchen, sollten weder die Tamoxifen-Behandlung noch die Cre-Aktivierung selbst zu einer beeinträchtigten Herzfunktion führen. Es gibt Hinweise darauf, dass konstitutiv aktives Cre Expressionslevel-abhängig zu einer dilatativen Kardiomyopathie führt (Buerger et al., 2006). Auch gibt es Hinweise auf eine Beeinträchtigung der Herzfunktion durch Tamoxifen (Asp et al., 2013). Wie gravierend die Auswirkungen der Aktivierung des Cre-loxP-Systems auf die Herzfunktion sind, wird im Folgenden diskutiert.

Sohal und Kollegen generierten durch Kopplung der MerCreMer-cDNA an den kardiomyozytär-spezifischen α -MHC-Promotor transgene Mäuse mit ausschließlich kardiomyozytär exprimierter Cre-Rekombinase. Behandlung der Mäuse mit Tamoxifen (20 mg/kg täglich i.p.) über fünf Tage führte zur Aktivierung Cre-vermittelter Rekombination (Sohal et al., 2001). In dieser Studie konnte kein pathologischer Effekt auf die kardiale Funktion durch die Tamoxifen-induzierte Aktivierung von MerCreMer nachgewiesen werden (Sohal et al., 2001). Eine weitere Arbeitsgruppe zeigte jedoch, dass Aktivierung von MerCreMer durch Tamoxifen-Behandlung (40 mg/kg täglich, i.p.) über fünf Tage zu einer transienten systolischen Dysfunktion sowie Depletion des mitochondrialen ATP-Gehalts führt. Die systolische Dysfunktion normalisierte sich unter Entstehung einer linksventrikulären Hypertrophie. MerCreMer-negative Mäuse zeigten nach identischer Tamoxifen-Behandlung keine systolische Dysfunktion (Hall et al., 2011). Koitabashi und Kollegen beobachteten an α -MHC-MerCreMer-Mäusen nach Tamoxifen-Behandlung über fünf Tage (80 mg/kg täglich i.p.) eine schwere Kardiomyopathie und eine Mortalität von 60 %. Bei Verabreichung der gleichen Dosis oral über sieben Tage kam es in geflochten und nicht-geflochten α -MHC-MerCreMer-Mäusen zu einer transienten dilatativen Kardiomyopathie, von der MerCreMer-negative Mäuse bei gleicher Tamoxifen-Behandlung nicht betroffen waren (Koitabashi et al., 2009). Behandlung mit dem selektiven

Östrogen-Rezeptor-Modulator Raloxifen (160 mg/kg täglich p.o.) für 21 Tage führte in α -MHC-MerCreMer-Mäusen zu effizienter Rekombination ohne Auftreten einer transienten Kardiomyopathie, was darauf schließen lässt, dass die Aktivierung von MerCreMer nicht allein für den unter Tamoxifen beobachteten Phänotyp verantwortlich sein kann. Die Autoren beobachteten zudem, dass Tamoxifen-Behandlung in Anwesenheit von MerCreMer zu 4-fach erhöhten Tamoxifen-Konzentrationen im Nucleus führt, was erklären könnte, warum eine Tamoxifen-Behandlung MerCreMer-negativer Mäuse keine Kardiomyopathie zur Folge hatte (Koitabashi et al., 2009).

Die Ergebnisse von Koitabashi zeigen, dass aktives MerCreMer nicht allein verantwortlich für den beobachteten kardialen Phänotyp sein kann, da dieser unter Raloxifen-induzierter Aktivierung von MerCreMer nicht auftrat (Koitabashi et al., 2009). Inwieweit Tamoxifen unabhängig von MerCreMer die Herzfunktion beeinträchtigen könnte, wurde von einer weiteren Arbeitsgruppe untersucht. Tamoxifen reduzierte akut die Kontraktilität, verlangsamte die Relaxation und senkte die Amplitude des Calcium-Anstiegs in Kardiomyozyten aus Ratten (Asp et al., 2013). 4-OH-Tamoxifen hatte bei gleicher Konzentration ähnliche Auswirkungen auf Kontraktilität, Relaxationszeit und Calcium-Amplitude wie Tamoxifen, obwohl 4-OH-Tamoxifen eine deutliche höhere Affinität zum Östrogen-Rezeptor (ER) aufweist als Tamoxifen (Asp et al., 2013). Dies deutet darauf hin, dass der akute Effekt von Tamoxifen und 4-OH-Tamoxifen auf die Kardiomyozyten nicht ER-vermittelt ist (Asp et al., 2013). In dieser Studie wurde nur der akute Effekt der Behandlung mit SERMs auf die Funktion von Kardiomyozyten untersucht und es erfolgte keine Untersuchung der transkriptionellen Effekte von Tamoxifen und 4-OH-Tamoxifen auf die Expression kardialer Proteine. Dennoch werfen die Ergebnisse von Asp und Kollegen die Frage auf, ob die unerwünschten Nebenwirkungen der MerCreMer-Aktivierung vermieden werden könnten, wenn anstelle von Tamoxifen eine reduzierte Dosis des potentere 4-OH-Tamoxifens zur *Knockout*-Induktion verwendet würde. Im Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie wurde die Auswirkung der MerCreMer-Aktivierung durch 4-OH-Tamoxifen auf die Herzfunktion überprüft (Heinen et al., 2021). α -MHC-MerCreMer-Mäuse erhielten täglich intraperitoneal 20 mg/kg 4-OH-Tamoxifen für fünf bzw. zehn Tage. Beide Protokolle führten zu einer effizienten Cre-vermittelten Rekombination. Vor und nach der 4-OH-Tamoxifen-Behandlung wurden die Mäuse über einen Zeitraum von sechs Wochen echokardiographisch untersucht. In keiner der beiden Gruppen wurde eine transiente oder permanente kardiale Dysfunktion beobachtet. MRT-Untersuchungen über einen Zeitraum von 19 Tagen ab Beginn der Behandlung mit 4-OH-Tamoxifen zeigten keine Verschlechterung der Parameter EF (Ejektionsfraktion), EDV (Enddiastolisches Volumen) und CO (*Cardiac Output*). ^{31}P -Magnetresonanzspektroskopie zeigte zudem keine Veränderung des kardialen Phosphokreatin/ATP-Verhältnisses während und nach der 4-OH-Tamoxifen-Behandlung (Heinen et al., 2021).

Insgesamt scheint das in dieser Arbeit verwendete Protokoll zur *Knockout*-Induktion mittels durch 4-OH-Tamoxifen (20 mg/kg täglich für fünf Tage, i.p.) aktivierter Cre-Rekombinase weder zu gravierenden Veränderungen der Herzfunktion noch der myokardialen Bioenergetik zu führen, sodass die gemessenen Veränderungen in den iCM-AKT1/2-Einzel- und Doppel-KO-Mäusen wahrscheinlich auf das fehlende AKT und nicht auf unspezifische Effekte des 4-OH-Tamoxifen-MerCreMer-Systems zurückzuführen sind.

4.3 Schlussfolgerung

Der Verlust beider kardiomyozytärer AKT-Isoformen führt zu einer reduzierten respiratorischen Kapazität der Mitochondrien und außerdem zu einer verringerten Effizienz der oxidativen Phosphorylierung. Der Verlust von jeweils einer der beiden kardiomyozytären AKT-Isoformen führt im Falle von AKT2 zu einer tendenziell verringerten respiratorischen Kapazität, im Falle von AKT1 jedoch nicht. Beide Einzel-KOs zeigen einen Trend zu einer verringerten Effizienz der oxidativen Phosphorylierung. Insulinstimulation führt tendenziell zu einer gesteigerten respiratorischen Kapazität der Mitochondrien aus beiden Einzel-KOs und den Wildtypen. Insgesamt zeigen die in dieser Arbeit erhobenen Daten, dass die Proteinkinase AKT eine Rolle in der Regulation der myokardialen Bioenergetik spielt, die höchstwahrscheinlich weit über eine posttranslationale Regulation von Complex V hinausgeht.

5 Literaturverzeichnis

- Abeyrathna, P., Su, Y., 2015. The critical role of Akt in cardiovascular function. *Vascul. Pharmacol.* 74, 38–48. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2015.05.008>
- Ackah, E., Yu, J., Zoellner, S., Iwakiri, Y., Skurk, C., Shibata, R., Ouchi, N., Easton, R.M., Galasso, G., Birnbaum, M.J., Walsh, K., Sessa, W.C., 2005. Akt1/protein kinase B α is critical for ischemic and VEGF-mediated angiogenesis. *J. Clin. Invest.* 115, 2119–2127. <https://doi.org/10.1172/JCI24726>
- Anderson, E.J., Lustig, M.E., Boyle, K.E., Woodlief, T.L., Kane, D.A., Lin, C.-T., Price, J.W., Kang, L., Rabinovitch, P.S., Szeto, H.H., Houmard, J.A., Cortright, R.N., Wasserman, D.H., Neuffer, P.D., 2009. Mitochondrial H₂O₂ emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans. *J. Clin. Invest.* 119, 573–581. <https://doi.org/10.1172/JCI37048>
- Antal, C.E., Newton, A.C., 2013. Spatiotemporal Dynamics of Phosphorylation in Lipid Second Messenger Signaling. *Mol. Cell. Proteomics* 12, 3498–3508. <https://doi.org/10.1074/mcp.R113.029819>
- Asp, M.L., Martindale, J.J., Metzger, J.M., 2013. Direct, Differential Effects of Tamoxifen, 4-Hydroxytamoxifen, and Raloxifene on Cardiac Myocyte Contractility and Calcium Handling. *PLoS ONE* 8, e78768. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078768>
- Barrientos, A., 2002. In vivo and in organello assessment of OXPHOS activities. *Methods* 26, 307–316. [https://doi.org/10.1016/S1046-2023\(02\)00036-1](https://doi.org/10.1016/S1046-2023(02)00036-1)
- Basu, S., Totty, N.F., Irwin, M.S., Sudol, M., Downward, J., 2003. Akt Phosphorylates the Yes-Associated Protein, YAP, to Induce Interaction with 14-3-3 and Attenuation of p73-Mediated Apoptosis. *Mol. Cell* 11, 11–23. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00776-1](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00776-1)
- Bellacosa, A., Testa, J.R., Moore, Robert, Larue, L., 2004. A Portrait of AKT Kinases: Human Cancer and Animal Models Depict a Family with Strong Individualities. *Cancer Biol. Ther.* 3, 268–275. <https://doi.org/10.4161/cbt.3.3.703>
- Bertholet, A.M., Chouchani, E.T., Kazak, L., Angelin, A., Fedorenko, A., Long, J.Z., Vidoni, S., Garrity, R., Cho, J., Terada, N., Wallace, D.C., Spiegelman, B.M., Kirichok, Y., 2019. H⁺ transport is an integral function of the mitochondrial ADP/ATP carrier. *Nature* 571, 515–520. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1400-3>
- Bertrand, L., Horman, S., Beauloye, C., Vanoverschelde, J.-L., 2008. Insulin signalling in the heart. *Cardiovasc. Res.* 79, 238–248. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvn093>
- Bijur, G.N., Jope, R.S., 2003. Rapid accumulation of Akt in mitochondria following phosphatidylinositol 3-kinase activation: Translocation of Akt into mitochondria. *J. Neurochem.* 87, 1427–1435. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02113.x>
- Blasberg, N., 2015. Identifizierung Akt-spezifischer Funktionen im Herzen (Dissertation). Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Boudina, S., Bugger, H., Sena, S., O'Neill, B.T., Zaha, V.G., Ilkun, O., Wright, J.J., Mazumder, P.K., Palfreyman, E., Tidwell, T.J., Theobald, H., Khalimonchuk, O., Wayment, B., Sheng, X., Rodnick, K.J., Centini, R., Chen, D., Litwin, S.E., Weimer, B.E., Abel, E.D., 2009. Contribution of Impaired Myocardial Insulin Signaling to Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in the Heart. *Circulation* 119, 1272–1283. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.792101>
- Boudina, S., Sena, S., Theobald, H., Sheng, X., Wright, J.J., Hu, X.X., Aziz, S., Johnson, J.I., Bugger, H., Zaha, V.G., Abel, E.D., 2007. Mitochondrial Energetics in the Heart in Obesity-Related Diabetes: Direct Evidence for Increased Uncoupled Respiration and Activation of Uncoupling Proteins. *Diabetes* 56, 2457–2466. <https://doi.org/10.2337/db07-0481>
- Bouillaud, F., Alves-Guerra, M.-C., Ricquier, D., 2016. UCPs, at the interface between bioenergetics and metabolism. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res., Channels and transporters in cell metabolism* 1863, 2443–2456. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.04.013>

- Braccini, L., Ciruolo, E., Campa, C.C., Perino, A., Longo, D.L., Tibolla, G., Pregnolato, M., Cao, Y., Tassone, B., Damilano, F., Laffargue, M., Calautti, E., Falasca, M., Norata, G.D., Backer, J.M., Hirsch, E., 2015. PI3K-C2 γ is a Rab5 effector selectively controlling endosomal Akt2 activation downstream of insulin signalling. *Nat. Commun.* 6, 7400. <https://doi.org/10.1038/ncomms8400>
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Brand, M.D., 2016. Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling. *Free Radic. Biol. Med.* 100, 14–31. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.001>
- Brand, M.D., Chien, L.-F., Ainscow, E.K., Rolfe, D.F.S., Porter, R.K., 1994. The causes and functions of mitochondrial proton leak. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1187, 132–139. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(94\)90099-X](https://doi.org/10.1016/0005-2728(94)90099-X)
- Brand, M.D., Nicholls, D.G., 2011. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem. J.* 435, 297–312. <https://doi.org/10.1042/BJ20110162>
- Buerger, A., Rozhitskaya, O., Sherwood, M.C., Dorfman, A.L., Bisping, E., Abel, E.D., Pu, W.T., Izumo, S., Jay, P.Y., 2006. Dilated Cardiomyopathy Resulting From High-Level Myocardial Expression of Cre-Recombinase. *J. Card. Fail.* 12, 392–398. <https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2006.03.002>
- Calleja, V., Alcor, D., Laguerre, M., Park, J., Vojnovic, B., Hemmings, B.A., Downward, J., Parker, P.J., Larjani, 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>
- Catalucci, D., Latronico, M.V.G., Ceci, M., Rusconi, F., Young, H.S., Gallo, P., Santonastasi, M., Bellacosa, A., Brown, J.H., Condorelli, G., 2009. Akt Increases Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Cycling by Direct Phosphorylation of Phospholamban at Thr¹⁷. *J. Biol. Chem.* 284, 28180–28187. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.036566>
- Chance, B., Williams, G.R., 1955. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. III. The steady state. *J. Biol. Chem.* 217, 409–427.
- Chen, W.S., 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>
- Cho, H., Mu, J., Kim, J.K., Thorvaldsen, J.L., Chu, Q., Iii, E.B.C., Kaestner, K.H., Bartolomei, M.S., Shulman, G.I., Birnbaum, M.J., 2001. Insulin Resistance and a Diabetes Mellitus-Like Syndrome in Mice Lacking the Protein Kinase Akt2 (PKB β) 292, 5.
- Chu, N., Salguero, A.L., Liu, A.Z., Chen, Z., Dempsey, D.R., Ficarro, S.B., Alexander, W.M., Marto, J.A., Li, Y., Amzel, L.M., Gabelli, S.B., Cole, P.A., 2018. Akt Kinase Activation Mechanisms Revealed Using Protein Semisynthesis. *Cell* 174, 897-907.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.003>
- Clark, L.C., Wolf, R., Granger, D., Taylor, Z., 1953. *Continuous Recording of Blood Oxygen Tensions by Polarography*. *J. Appl. Physiol.* 6, 189–193. <https://doi.org/10.1152/jappl.1953.6.3.189>
- Compton, S.J., Jones, C.G., 1985. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal. Biochem.* 151, 369–374. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90190-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90190-3)
- DeBosch, B., Treskov, I., Lupu, T.S., Weinheimer, C., Kovacs, A., Courtois, M., Muslin, A.J., 2006. Akt1 Is Required for Physiological Cardiac Growth. *Circulation* 113, 2097–2104. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.595231>
- 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>
- Divakaruni, A.S., Brand, M.D., 2011. The Regulation and Physiology of Mitochondrial Proton Leak. *Physiology* 26, 192–205. <https://doi.org/10.1152/physiol.00046.2010>

- Dummler, B., Tschopp, O., Hynx, D., Yang, Z.-Z., Dirnhofer, S., Hemmings, B.A., 2006. Life with a Single Isoform of Akt: Mice Lacking Akt2 and Akt3 Are Viable but Display Impaired Glucose Homeostasis and Growth Deficiencies. *Mol. Cell. Biol.* 26, 8042–8051. <https://doi.org/10.1128/MCB.00722-06>
- 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 B in Attainment of Normal Brain Size. *Mol. Cell. Biol.* 25, 1869–1878. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.5.1869-1878.2005>
- Ebner, M., Lučić, I., Leonard, T.A., Yudushkin, I., 2017. PI(3,4,5)P₃ Engagement Restricts Akt Activity to Cellular Membranes. *Mol. Cell* 65, 416–431.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.12.028>
- Echtay, K.S., 2003. A signalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling. *EMBO J.* 22, 4103–4110. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg412>
- Echtay, K.S., Roussel, D., St-Pierre, J., Jekabsons, M.B., Cadenas, S., Stuart, J.A., Harper, J.A., Roebuck, S.J., Morrison, A., Pickering, S., Clapham, J.C., Brand, M.D., 2002. Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature* 415, 96–99. <https://doi.org/10.1038/415096a>
- Fiermonte, G., Dolce, V., Arrigoni, R., Runswick, M.J., Walker, J.E., Palmieri, F., 1999. Organization and sequence of the gene for the human mitochondrial dicarboxylate carrier: evolution of the carrier family. *Biochem. J.* 344 Pt 3, 953–960.
- Garfin, D.E., 1990. [33] One-dimensional gel electrophoresis, in: *Methods in Enzymology*. Elsevier, pp. 425–441. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)82035-Z](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)82035-Z)
- 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. *J. Clin. Invest.* 112, 13.
- Gnaiger, E., 2014. *Mitochondrial Pathways and Respiratory Control. An introduction to OXPHOS Analysis*, 4th ed. ed. OROBOROS MiPNet Publications, Innsbruck.
- Goedecke, S., Heinen, A., Moeller, F., Deenen, R., Koehler, K., Goedecke, A., 2017. AKT signaling is essential for functional and structural integrity of the heart. *FASEB J.* 31, lb149–lb149. https://doi.org/10.1096/fasebj.31.1_supplement.lb149
- Goo, C.K., Lim, H.Y., Ho, Q.S., Too, H.-P., Clement, M.-V., Wong, K.P., 2012. PTEN/Akt Signaling Controls Mitochondrial Respiratory Capacity through 4E-BP1. *PLoS ONE* 7, e45806. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045806>
- Griffin, T.M., Humphries, K.M., Kinter, M., Lim, H.-Y., Szweda, L.I., 2016. Nutrient sensing and utilization: Getting to the heart of metabolic flexibility. *Biochimie* 124, 74–83. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.10.013>
- Gupta, A., Houston, B., 2017. A comprehensive review of the bioenergetics of fatty acid and glucose metabolism in the healthy and failing heart in nondiabetic condition. *Heart Fail. Rev.* 22, 825–842. <https://doi.org/10.1007/s10741-017-9623-6>
- Hafner, R.P., Brown, G.C., Brand, M.D., 1990. Analysis of the control of respiration rate, phosphorylation rate, proton leak rate and protonmotive force in isolated mitochondria using the “top-down” approach of metabolic control theory. *Eur. J. Biochem.* 188, 313–319. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1990.tb15405.x>
- Hall, M.E., Smith, G., Hall, J.E., Stec, D.E., 2011. Systolic dysfunction in cardiac-specific ligand-inducible MerCreMer transgenic mice. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 301, H253–H260. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00786.2010>
- Heinen, A., Aldakkak, M., Stowe, D.F., Rhodes, S.S., Riess, M.L., Varadarajan, S.G., Camara, A.K.S., 2007a. Reverse electron flow-induced ROS production is attenuated by activation of mitochondrial Ca²⁺-sensitive K⁺ channels. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 293, H1400–H1407. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00198.2007>
- Heinen, A., Camara, A.K.S., Aldakkak, M., Rhodes, S.S., Riess, M.L., Stowe, D.F., 2007b. Mitochondrial Ca²⁺-induced K⁺ influx increases respiration and enhances ROS production while maintaining membrane potential. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 292, C148–C156. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00215.2006>

- Heinen, A., Gödecke, S., Flögel, U., Miklos, D., Bottermann, K., Spsychala, A., Gödecke, A., 2021. 4-hydroxytamoxifen does not deteriorate cardiac function in cardiomyocyte-specific MerCreMer transgenic mice. *Basic Res. Cardiol.* 116, 8. <https://doi.org/10.1007/s00395-020-00841-9>
- Hoess, R.H., Ziese, M., Sternberg, N., 1982. P1 site-specific recombination: nucleotide sequence of the recombining sites. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79, 3398–3402. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.11.3398>
- How, O.-J., Aasum, E., Severson, D.L., Chan, W.Y.A., Essop, M.F., Larsen, T.S., 2006. Increased Myocardial Oxygen Consumption Reduces Cardiac Efficiency in Diabetic Mice. *Diabetes* 55, 466–473. <https://doi.org/10.2337/diabetes.55.02.06.db05-1164>
- Hurst, S., Hoek, J., Sheu, S.-S., 2017. Mitochondrial Ca²⁺ and regulation of the permeability transition pore. *J. Bioenerg. Biomembr.* 49, 27–47. <https://doi.org/10.1007/s10863-016-9672-x>
- Ji, L., Fu, F., Zhang, Lihua, Liu, W., Cai, X., Zhang, Lei, Zheng, Q., Zhang, H., Gao, F., 2010. Insulin attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury via reducing oxidative/nitrative stress. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* 298, E871–E880. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00623.2009>
- 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>
- Karwi, Q.G., Uddin, G.M., Ho, K.L., Lopaschuk, G.D., 2018. Loss of Metabolic Flexibility in the Failing Heart. *Front. Cardiovasc. Med.* 5, 68. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2018.00068>
- Karwi, Q.G., Wagg, C.S., Altamimi, T.R., Uddin, G.M., Ho, K.L., Darwesh, A.M., Seubert, J.M., Lopaschuk, G.D., 2020. Insulin directly stimulates mitochondrial glucose oxidation in the heart. *Cardiovasc. Diabetol.* 19, 207. <https://doi.org/10.1186/s12933-020-01177-3>
- Kayser, E.-B., Sedensky, M.M., Morgan, P.G., Hoppel, C.L., 2004. Mitochondrial Oxidative Phosphorylation Is Defective in the Long-lived Mutant *clk-1*. *J. Biol. Chem.* 279, 54479–54486. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403066200>
- Kemi, O.J., Ceci, M., Wisloff, U., Grimaldi, S., Gallo, P., Smith, G.L., Condorelli, G., Ellingsen, O., 2008. Activation or inactivation of cardiac Akt/mTOR signaling diverges physiological from pathological hypertrophy. *J. Cell. Physiol.* 214, 316–321. <https://doi.org/10.1002/jcp.21197>
- Kirichok, Y., Krapivinsky, G., Clapham, D.E., 2004. The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature* 427, 360–364. <https://doi.org/10.1038/nature02246>
- Koitabashi, N., Bedja, D., Zaiman, A.L., Pinto, Y.M., Zhang, M., Gabrielson, K.L., Takimoto, E., Kass, D.A., 2009. Avoidance of Transient Cardiomyopathy in Cardiomyocyte-Targeted Tamoxifen-Induced MerCreMer Gene Deletion Models. *Circ. Res.* 105, 12–15. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.198416>
- Kolwicz, S.C., Purohit, S., Tian, R., 2013. Cardiac Metabolism and its Interactions With Contraction, Growth, and Survival of Cardiomyocytes. *Circ. Res.* 113, 603–616. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.302095>
- Kolwicz, S.C., Tian, R., 2011. Glucose metabolism and cardiac hypertrophy. *Cardiovasc. Res.* 90, 194–201. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvr071>
- Kunkel, M.T., Ni, Q., Tsien, R.Y., Zhang, J., Newton, A.C., 2005. Spatio-temporal Dynamics of Protein Kinase B/Akt Signaling Revealed by a Genetically Encoded Fluorescent Reporter. *J. Biol. Chem.* 280, 5581–5587. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411534200>
- Lachmann, E.S., 2018. Analyse kardialer mitochondrialer Proteinphosphorylierungen in Akt1 und Akt2 KO Mäusen (Dissertation). Heinrich-Heine-Universität.
- Lanza, I.R., Nair, K.S., 2009. Chapter 20: Functional Assessment of Isolated Mitochondria In Vitro, in: *Methods in Enzymology*. Elsevier, pp. 349–372. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)05020-4](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)05020-4)
- Latronico, M.V.G., Costinean, S., Lavitrano, M.L., Peschle, C., Condorelli, G., 2004. Regulation of Cell Size and Contractile Function by AKT in Cardiomyocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1015, 250–260. <https://doi.org/10.1196/annals.1302.021>

- Layec, G., Bringard, A., Le Fur, Y., Micallef, J.-P., Vilmen, C., Perrey, S., Cozzone, P.J., Bendahan, D., 2016. Mitochondrial Coupling and Contractile Efficiency in Humans with High and Low $\dot{V}O_2$ peaks: *Med. Sci. Sports Exerc.* 48, 811–821. <https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000000858>
- Li, C., Li, Y., He, L., Agarwal, A.R., Zeng, N., Cadenas, E., Stiles, B.L., 2013. PI3K/AKT signaling regulates bioenergetics in immortalized hepatocytes. *Free Radic. Biol. Med.* 60, 29–40. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.013>
- Li Chew, C., Lunardi, A., Gulluni, F., Ruan, D.T., Chen, M., Salmena, L., Nishino, M., Papa, A., Ng, C., Fung, J., Clohessy, J.G., Sasaki, J., Sasaki, T., Bronson, R.T., Hirsch, E., Pandolfi, P.P., 2015. In Vivo Role of INPP4B in Tumor and Metastasis Suppression through Regulation of PI3K-AKT Signaling at Endosomes. *Cancer Discov.* 5, 740–751. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-1347>
- 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. <https://doi.org/10.1093/nar/23.10.1686>
- Liu, S.-L., Wang, Z.-G., Hu, Y., Xin, Y., Singaram, I., Gorai, S., Zhou, X., Shim, Y., Min, J.-H., Gong, L.-W., Hay, N., Zhang, J., Cho, W., 2018. Quantitative Lipid Imaging Reveals a New Signaling Function of Phosphatidylinositol-3,4-Bisphosphate: Isoform- and Site-Specific Activation of Akt. *Mol. Cell* 71, 1092-1104.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.07.035>
- Lopaschuk, G.D., Karwi, Q.G., Tian, R., Wende, A.R., Abel, E.D., 2021. Cardiac Energy Metabolism in Heart Failure. *Circ. Res.* 128, 1487–1513. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.121.318241>
- Luiken, J.J.F.P., Coort, S.L.M., Koonen, D.P.Y., van der Horst, D.J., Bonen, A., Zorzano, A., Glatz, J.F.C., 2004. Regulation of cardiac long-chain fatty acid and glucose uptake by translocation of substrate transporters. *Pflüg. Arch.* 448, 1–15. <https://doi.org/10.1007/s00424-003-1199-4>
- Luongo, T.S., Lambert, J.P., Yuan, A., Zhang, X., Gross, P., Song, J., Shanmughapriya, S., Gao, E., Jain, M., Houser, S.R., Koch, W.J., Cheung, J.Y., Madesh, M., Elrod, J.W., 2015. The Mitochondrial Calcium Uniporter Matches Energetic Supply with Cardiac Workload during Stress and Modulates Permeability Transition. *Cell Rep.* 12, 23–34. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.06.017>
- Manning, B.D., Toker, A., 2017. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell* 169, 381–405. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.001>
- Masters, T.A., Tumbarello, D.A., Chibalina, M.V., Buss, F., 2017. MYO6 Regulates Spatial Organization of Signaling Endosomes Driving AKT Activation and Actin Dynamics. *Cell Rep.* 19, 2088–2101. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.05.048>
- Mazumder, P.K., O'Neill, B.T., Roberts, M.W., Buchanan, J., Yun, U.J., Cooksey, R.C., Boudina, S., Abel, E.D., 2004. Impaired Cardiac Efficiency and Increased Fatty Acid Oxidation in Insulin-Resistant ob/ob Mouse Hearts. *Diabetes* 53, 2366–2374. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.9.2366>
- Miyamoto, S., Howes, A.L., Adams, J.W., Dorn, G.W., Brown, J.H., 2005. Ca^{2+} Dysregulation Induces Mitochondrial Depolarization and Apoptosis: ROLE OF Na^+ / Ca^{2+} EXCHANGER AND AKT. *J. Biol. Chem.* 280, 38505–38512. <https://doi.org/10.1074/jbc.M505223200>
- Miyamoto, S., Rubio, M., Sussman, M.A., 2008. Nuclear and mitochondrial signalling Akt in cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.* 82, 272–285. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp087>
- Mjøs, O.D., 1971. Effect of Free Fatty Acids on Myocardial Function and Oxygen Consumption in Intact Dogs. *J. Clin. Invest.* 50, 1386–1389.
- Morita, M., Gravel, S.-P., Chénard, V., Sikström, K., Zheng, L., Alain, T., Gandin, V., Avizonis, D., Arguello, M., Zakaria, C., McLaughlan, S., Nouet, Y., Pause, A., Pollak, M., Gottlieb, E., Larsson, O., St-Pierre, J., Topisirovic, I., Sonenberg, N., 2013. mTORC1 Controls Mitochondrial Activity and Biogenesis through 4E-BP-Dependent Translational Regulation. *Cell Metab.* 18, 698–711. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.10.001>

- Murphy, M.P., 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* 417, 1–13. <https://doi.org/10.1042/BJ20081386>
- Nakamoto, R.K., Baylis Scanlon, J.A., Al-Shawi, M.K., 2008. The rotary mechanism of the ATP synthase. *Arch. Biochem. Biophys.* 476, 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.05.004>
- Neubauer, S., 2007. The Failing Heart — An Engine Out of Fuel. *N. Engl. J. Med.* 356, 1140–1151. <https://doi.org/10.1056/NEJMra063052>
- Ngo, H.B., Lovely, G.A., Phillips, R., Chan, D.C., 2014. Distinct structural features of TFAM drive mitochondrial DNA packaging versus transcriptional activation. *Nat. Commun.* 5, 3077. <https://doi.org/10.1038/ncomms4077>
- Nicholls, D.G., 2021. Mitochondrial proton leaks and uncoupling proteins. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1862, 148428. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2021.148428>
- Nicholls, D.G., Ferguson, S.J., 2013. *Bioenergetics*. Academic Press.
- Noordali, H., Loudon, B.L., Frenneaux, M.P., Madhani, M., 2018. Cardiac metabolism — A promising therapeutic target for heart failure. *Pharmacol. Ther.* 182, 95–114. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.08.001>
- Ojuka, E., Andrew, B., Bezuidenhout, N., George, S., Maarman, G., Madlala, H.P., Mendham, A., Osiki, P.O., 2016. Measurement of β -oxidation capacity of biological samples by respirometry: a review of principles and substrates. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* 310, E715–E723. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00475.2015>
- Parcellier, A., Tintignac, L.A., Zhuravleva, E., Hemmings, B.A., 2008. PKB and the mitochondria: AKTing on apoptosis. *Cell. Signal.* 20, 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.07.010>
- Patel, M.S., Nemeria, N.S., Furey, W., Jordan, F., 2014. The Pyruvate Dehydrogenase Complexes: Structure-based Function and Regulation. *J. Biol. Chem.* 289, 16615–16623. <https://doi.org/10.1074/jbc.R114.563148>
- Peng, X.-d., 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>
- Perevoshchikova, I.V., Quinlan, C.L., Orr, A.L., Gerencser, A.A., Brand, M.D., 2013. Sites of superoxide and hydrogen peroxide production during fatty acid oxidation in rat skeletal muscle mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* 61, 298–309. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.04.006>
- Piantadosi, C.A., Suliman, H.B., 2006. Mitochondrial Transcription Factor A Induction by Redox Activation of Nuclear Respiratory Factor 1 *. *J. Biol. Chem.* 281, 324–333. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508805200>
- Randle, P.J., Garland, P.B., Hales, C.N., Newsholme, E.A., 1963. THE GLUCOSE FATTY-ACID CYCLE ITS ROLE IN INSULIN SENSITIVITY AND THE METABOLIC DISTURBANCES OF DIABETES MELLITUS. *The Lancet* 281, 785–789. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(63\)91500-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(63)91500-9)
- Rasola, A., Bernardi, P., 2011. Mitochondrial permeability transition in Ca²⁺-dependent apoptosis and necrosis. *Cell Calcium* 50, 222–233. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2011.04.007>
- Raupach, A., 2011. Isoform-spezifische Funktionen der Proteinkinase Akt in Kardiomyozyten (Dissertation). Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Reinartz, M., Raupach, A., Kaisers, W., Gödecke, A., 2014. AKT1 and AKT2 Induce Distinct Phosphorylation Patterns in HL-1 Cardiac Myocytes. *J. Proteome Res.* 13, 4232–4245. <https://doi.org/10.1021/pr500131g>
- Sakaguchi, M., Cai, W., Wang, C.-H., Cederquist, C.T., Damasio, M., Homan, E.P., Batista, T., Ramirez, A.K., Gupta, M.K., Steger, M., Wewer Albrechtsen, N.J., Singh, S.K., Araki, E., Mann, M., Enerbäck, S., Kahn, C.R., 2019. FoxK1 and FoxK2 in insulin regulation of cellular and mitochondrial metabolism. *Nat. Commun.* 10, 1582. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09418-0>
- Santi, S.A., Douglas, A.C., Lee, H., 2010. The Akt isoforms, their unique functions and potential as anticancer therapeutic targets. *Biomol. Concepts* 1. <https://doi.org/10.1515/bmc.2010.035>

- 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>
- 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>
- Shimizu, I., Minamino, T., 2016. Physiological and pathological cardiac hypertrophy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 97, 245–262. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2016.06.001>
- Shiojima, I., Schiekofer, S., Schneider, J.G., Belisle, K., Sato, K., Andrassy, M., Galasso, G., Walsh, K., 2012. Short-Term Akt Activation in Cardiac Muscle Cells Improves Contractile Function in Failing Hearts. *Am. J. Pathol.* 181, 1969–1976. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.08.020>
- 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. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)
- 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. <https://doi.org/10.1161/hh1301.092687>
- Song, H.-P., Chu, Z.-G., Zhang, D.-X., Dang, Y.-M., Zhang, Q., 2018. PI3K–AKT Pathway Protects Cardiomyocytes Against Hypoxia-Induced Apoptosis by MitoKATP-Mediated Mitochondrial Translocation of pAKT. *Cell. Physiol. Biochem.* 49, 717–727. <https://doi.org/10.1159/000493037>
- Sternberg, N., Hamilton, D., 1981. Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J. Mol. Biol.* 150, 467–486. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(81\)90375-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(81)90375-2)
- Stuart, J.A., Brindle, K.M., Harper, J.A., Brand, M.D., 1999. Mitochondrial proton leak and the uncoupling proteins. *J. Bioenerg. Biomembr.* 31, 517–525. <https://doi.org/10.1023/a:1005456725549>
- Su, C.-C., Yang, J.-Y., Leu, H.-B., Chen, Y., Wang, P.H., 2012. Mitochondrial Akt-regulated mitochondrial apoptosis signaling in cardiac muscle cells. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 302, H716–H723. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00455.2011>
- Sugiyama, M.G., Fairn, G.D., Antonescu, C.N., 2019. Akt-ing Up Just About Everywhere: Compartment-Specific Akt Activation and Function in Receptor Tyrosine Kinase Signaling. *Front. Cell Dev. Biol.* 7, 70. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00070>
- Sussman, M.A., Völkers, M., Fischer, K., Bailey, B., Cottage, C.T., Din, S., Gude, N., Avitabile, D., Alvarez, R., Sundararaman, B., Quijada, P., Mason, M., Konstandin, M.H., Malhowski, A., Cheng, Z., Khan, M., McGregor, M., 2011. Myocardial AKT: The Omnipresent Nexus. *Physiol. Rev.* 91, 1023–1070. <https://doi.org/10.1152/physrev.00024.2010>
- Taegtmeyer, H., McNulty, P., Young, M.E., 2002. Adaptation and Maladaptation of the Heart in Diabetes: Part I: General Concepts. *Circulation* 105, 1727–1733. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000012466.50373.E8>
- Tan, Y., Ichikawa, T., Li, J., Si, Q., Yang, H., Chen, X., Goldblatt, C.S., Meyer, C.J., Li, X., Cai, L., Cui, T., 2011. Diabetic Downregulation of Nrf2 Activity via ERK Contributes to Oxidative Stress-Induced Insulin Resistance in Cardiac Cells In Vitro and In Vivo. *Diabetes* 60, 625–633. <https://doi.org/10.2337/db10-1164>
- Taylor, E.B., 2017. Functional Properties of the Mitochondrial Carrier System. *Trends Cell Biol.* 27, 633–644. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.04.004>

- Teshima, Y., Takahashi, N., Thuc, L.C., Nishio, S., Nagano-Torigoe, Y., Miyazaki, H., Ezaki, K., Yufu, K., Hara, M., Nakagawa, M., Saikawa, T., 2010. High-glucose condition reduces cardioprotective effects of insulin against mechanical stress-induced cell injury. *Life Sci.* 87, 154–161. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2010.06.006>
- van der Vusse, G., 2000. Cardiac fatty acid uptake and transport in health and disease. *Cardiovasc. Res.* 45, 279–293. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(99\)00263-1](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(99)00263-1)
- van Eunen, K., Simons, S.M.J., Gerding, A., Bleeker, A., Touw, C.M.L., Houten, S.M., Groen, B.K., Krab, K., Reijngoud, D.-J., Bakker, B.M., 2013. Biochemical Competition Makes Fatty-Acid β -Oxidation Vulnerable to Substrate Overload. *PLOS Comput. Biol.* 9, 8.
- Vega, R.B., Konhilas, J.P., Kelly, D.P., Leinwand, L.A., 2017. Molecular Mechanisms Underlying Cardiac Adaptation to Exercise. *Cell Metab.* 25, 1012–1026. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.04.025>
- Walz, H.A., Shi, X., Chouinard, M., Bue, C.A., Navaroli, D.M., Hayakawa, A., Zhou, Q.L., Nadler, J., Leonard, D.M., Corvera, S., 2010. Isoform-specific Regulation of Akt Signaling by the Endosomal Protein WDFY2. *J. Biol. Chem.* 285, 14101–14108. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.110536>
- Watt, I.N., Montgomery, M.G., Runswick, M.J., Leslie, A.G.W., Walker, J.E., 2010. Bioenergetic cost of making an adenosine triphosphate molecule in animal mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 16823–16827. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011099107>
- 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, P.-C., Mahmood, T., 2012. Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North Am. J. Med. Sci.* 4, 429. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>
- Yang, Z.-Z., Tschopp, O., Di-Poi, N., Bruder, E., Baudry, A., Dummler, B., Wahli, W., Hemmings, B.A., 2005. Dosage-Dependent Effects of Akt1/Protein Kinase B (PKB) and Akt3/PKB 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>
- Yao, H., Han, Xiangyang, Han, Xiuzhen, 2014. The Cardioprotection of the Insulin-Mediated PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway. *Am. J. Cardiovasc. Drugs* 14, 433–442. <https://doi.org/10.1007/s40256-014-0089-9>
- Yudushkin, I., 2019. Getting the Akt Together: Guiding Intracellular Akt Activity by PI3K. *Biomolecules* 9, 67. <https://doi.org/10.3390/biom9020067>
- Zhang, Y., Riesterer, C., Ayrall, A.-M., Sablitzky, F., Littlewood, T.D., Reth, M., 1996. Inducible Site-Directed Recombination in Mouse Embryonic Stem Cells. *Nucleic Acids Res.* 24, 543–548. <https://doi.org/10.1093/nar/24.4.543>
- Zoncu, R., Perera, R.M., Balkin, D.M., Pirruccello, M., Toomre, D., De Camilli, P., 2009. A Phosphoinositide Switch Controls the Maturation and Signaling Properties of APPL Endosomes. *Cell* 136, 1110–1121. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.032>
- Zor, T., Selinger, Z., 1996. Linearization of the Bradford Protein Assay Increases Its Sensitivity: Theoretical and Experimental Studies. *Anal. Biochem.* 236, 302–308. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0171>