

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

**Veränderungen der Signaltransduktion, des Glukosetransports und der  
kardialen Erregungsleitung in der Maus nach kardiomyozytenspezifischem  
AKT1/2-Knockout**

Dissertation

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

vorgelegt von  
Phil-Torben Müller

2024

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

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

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Björn Stork

*Für meine Eltern*

## Zusammenfassung deutsch

AKT ist eine ubiquitär exprimierte Proteinkinase mit vielfältigen Funktionen, die für verschiedene, unter anderem kardiovaskuläre Erkrankungen von Bedeutung ist. Im Herzen sind vor allem die Isoformen AKT1 und AKT2 exprimiert.

Zur genaueren Untersuchung der kardiovaskulären Funktion von AKT und dessen Rolle bei der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen wurden im Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie Mäuse mit induzierbarem, kardiomyozytenspezifischem AKT1/2-Knockout (iCM-AKT1/2-KO) erzeugt. Nach Induktion des iCM-AKT1/2-KOs in den adulten Mäusen kommt es zur Ausbildung einer Herzinsuffizienz und Herztrophie und zum Tod der Tiere nach durchschnittlich 24,4 Tagen. Mäuse mit iCM-AKT1- oder iCM-AKT2-Einzel-KO zeigen keine reduzierte Lebensdauer und keine deutlichen kardialen Funktionseinschränkungen (Gödecke et. al in Vorbereitung).

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung und Beschreibung verschiedener möglicher Mechanismen der auftretenden Herzinsuffizienz und Herztrophie nach iCM-AKT1/2-KO.

Ein Aspekt war die Untersuchung der Phosphorylierung verschiedener AKT-abhängig phosphorylierter Proteine an Tag 7 nach Induktion des iCM-AKT-KOs im Western Blot. An d7 wurde noch keine ausgeprägte kardiale Funktionsminderung gemessen (Gödecke et. al in Vorbereitung), sodass frühe Veränderungen der Phosphorylierungsmuster Hinweise auf Mechanismen der Entstehung der Funktionseinschränkungen geben könnten.

In dieser Arbeit wurden ausgeprägte Einschränkungen der AKT-abhängigen Phosphorylierung verschiedener Proteine des mTORC1- und GSK3 $\beta$ -Signalwegs nachgewiesen, als Hinweis auf frühe Beeinträchtigung der von diesen Signalwegen vermittelten Proteinbiosynthese bzw. Glykogensynthese. In iCM-AKT1- und iCM-AKT2-KO-Hezen zeigten sich ebenfalls Einschränkungen der AKT-abhängigen Phosphorylierungen der oben genannten Signalwege, jedoch jeweils in geringerer Ausprägung als bei den iCM-AKT1/2-KO Herzen. Dies zeigt, dass die Phosphorylierung der untersuchten Substrate in Kardiomyozyten nicht streng isoformspezifisch erfolgt.

Das Herz bezieht einen großen Teil seiner Energie aus der Verstoffwechslung von Glukose. Die wichtigsten kardialen Glukosetransporter sind der konstitutiv an der Plasmamembran lokalisierte GLUT1-Transporter und der GLUT4-Transporter, der nach Insulinstimulation AKT-abhängig von intrazellulären Vesikeln an die Plasmamembran gelangt und über den der Großteil der Glukose aufgenommen wird. Nach iCM-AKT1/2-KO ist demnach eine verminderte GLUT4-vermittelte Glukoseaufnahme zu erwarten. Die Analyse von mRNA-Microarrays zeigte eine vermehrte Expression des GLUT1-Transporters bei unveränderter GLUT4-Expression nach iCM-AKT1/2-KO. Durch Western Blot-Analysen wurde auch auf Proteinebene eine vermehrte GLUT1-Expression nach iCM-AKT1/2-KO nachgewiesen. Dies könnte ein Hinweis auf eine mögliche Teilkompensation vermindert insulinabhängiger Glukoseaufnahme durch vermehrten GLUT1-vermittelten Glukosetransport sein. In kommenden Projekten könnte die Messung der Glukoseaufnahme z.B. in Kardiomyozyten insulinstimulierter iCM-AKT1/2-KO Mäuse, erfolgen.

Es ist bekannt, dass Connexin43, das prädominante ventrikuläre Gap junction Protein, AKT-abhängig phosphoryliert wird, wodurch größere Gap junctions gebildet werden. Bei AKT-Inhibition kommt es zum Verlust von Gap junctions (Solan and Lampe, 2014). Darauf aufbauend war das dritte Ziel der Arbeit, den Einfluss von AKT auf die kardiale Erregungsleitung zu untersuchen. Dazu wurden Oberflächen-EKGs von WT-Mäusen nach Insulinstimulation analysiert und EKGs von unstimulierten WT- und iCM-AKT1/2-KO Mäusen im Zeitverlauf miteinander verglichen. Es zeigte sich keine im Oberflächen-EKG messbare Veränderung der Erregungsleitung im WT nach Insulinstimulation. Im iCM-AKT1/2-KO kam es zum Verlust der J-Welle ab d14 als Hinweis auf Veränderungen der frühen Repolarisation. Mögliche Ursache ist eine in mRNA-Microarray-Transkriptomanalysen nachgewiesene veränderte Expression einer Vielzahl kardialer Kalium-Kanäle nach iCM-AKT1/2-KO. Um in kommenden Projekten Veränderungen der kardialen Depolarisation und Repolarisation nach iCM-AKT1/2-KO präziser zu charakterisieren, könnte die Erregungsleitung in iCM-AKT1/2-KO-Hezen mittels ventrikulärem Mapping untersucht werden.

## Summary

AKT is an ubiquitous protein kinase with diverse functions and plays a major role in the genesis of different diseases, for example cardiovascular diseases. AKT1 and AKT2 are the most important isoforms expressed in the heart.

To investigate the cardiovascular function of AKT and its role in the genesis of cardiovascular diseases, mice with inducible cardiomyocyte-specific knockout of AKT1 and AKT2 (iCM-AKT1/2-KO) were generated in the Institute of Cardiovascular Physiology. After the induction of the iCM-AKT1/2-KO in adult mice they develop heart insufficiency and heart atrophy and die after 24,4 days on average. Mice with cardiomyocyte-specific knockout of only AKT1 or AKT2 show a normal life expectancy and do not develop impaired cardiac function.

It was the aim of this thesis to investigate and describe potential mechanisms leading to heart failure and heart atrophy in iCM-AKT1/2-KO mice.

One aspect was to investigate the phosphorylation of different AKT-target proteins at day 7 after induction of the iCM-AKT1/2-KO by Western blot. As the heart function of iCM-AKT1/2-KO mice was not impaired at that timepoint (Gödecke et. al in preparation), changes in phosphorylation of AKT-substrates at day 7 could suggest possible mechanisms for the development of cardiac functional impairment.

Strong disturbances of the AKT-dependent phosphorylation of different proteins involved in the mTORC1- and GSK3 $\beta$ -signalling pathways suggest an early impairment of protein synthesis and glycogen synthesis mediated by these pathways.

Disturbances of AKT-dependent phosphorylation of these pathways were also measurable but less pronounced in hearts of iCM-AKT1- or iCM-AKT2-KO mice. This indicates that phosphorylation of the observed proteins in cardiomyocytes is not strictly carried out in an isoform-specific manner.

The heart generates a substantial part of its energy production through the metabolisation of glucose. The most important cardiac glucose transporters are GLUT1, which is constitutively located at the plasma membrane and GLUT4, which is translocated from intracellular vesicles to the plasma membrane in an AKT-dependent manner after insulin stimulation. The biggest part of glucose gets into the cell via GLUT4. After iCM-AKT1/2-KO a decrease in cellular glucose uptake via GLUT4 is to be expected. mRNA-Microarrays showed an increased expression of GLUT1 after iCM-AKT1/2-KO, with unchanged expression of GLUT4. An increased amount of GLUT1 protein was measured in Western blots after iCM-AKT1/2-KO. This could point to a possible partial compensation of decreased insulin dependent glucose uptake via GLUT4 through increased GLUT1-mediated glucose transport. In following projects, measurement of glucose uptake, for instance in isolated cardiomyocytes of iCM-AKT1/2-KO mice stimulated with insulin, could be informative.

Connexin43, the predominant ventricular gap junction protein, is phosphorylated by AKT, leading to the formation of bigger gap junctions. AKT-inhibition results in the loss of gap junctions (Solan and Lampe, 2014). Therefore, the third aim of this thesis was to investigate the impact of AKT on cardiac electrical conduction. Surface-ECGs of WT-mice were analysed after insulin stimulation, and ECGs of WT- and iCM-AKT1/2-KO mice were compared at different time points after induction of the knockout. No changes of the surface-ECG were measurable after insulin stimulation of WT-mice. In iCM-AKT1/2-KO mice the J-wave was missing from day 14 onwards, indicating changes in early repolarization. The altered expression of various cardiac potassium channels in iCM-AKT1/2-KO mice could be a possible cause of this. In following projects changes of cardiac depolarisation and repolarisation could be analysed more precisely by examination of cardiac electrical conduction of iCM-AKT1/2-KO mice via optical mapping.

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
4E-BP	4E-binding proteind
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-activated protein kinase
ANOVA	analysis of variance
AP	Aktionspotential
APS	Ammoniumpersulfat
AS160	Akt substrate of 160 kDa
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure (Bicinchonic acid)
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca	Calcium
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CAMKKβ	calmodulin-dependent protein kinase kinase β
cDNA	complementary DNA
CK2	Casein kinase 2
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Cre	causes recombination
Cu <sup>2+</sup>	Kupfer
Cx	Connexin
d	Tag
ddH <sub>2</sub> O	double-distilled water
DEPTOR	DEP domain-containing mTOR-interacting protein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EF	Ejektionsfraktion
eIF4E	eukaryotic translation initiation factor 4E
eIF4G	Eukaryotic translation initiation factor 4 G
EKG	Elektrokardiogramm
ERK1/2	Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2
g	Gramm
GLUT1	Glucose transporter type 1
GLUT4	Glucose transporter type 4
GS	Glykogensynthase
GSK3	Glykogensynthase-Kinase 3
GSV	GLUT4 storage vesicle
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HCl	Chlorwasserstoff
HF	Herzfrequenz
HGF	hepatocyte growth factor
HIF1α	Hypoxia-inducible factor 1-alpha
Hsp	heat shock protein
I	Strom
I.E.	Internationale Einheit
iCM	induzierbarer kardiomyozytärer

IGF	insulin-like growth factor
IL2	Interleukin-2
IRS	insulin receptor substrate
K <sup>+</sup>	Kalium
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KO	Knockout
LKB1	Liver kinase B1
mg/ml	Milligramm pro Milliliter
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
min	Minute
mLST8	mammalian lethal with SEC13 protein 8
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MRI	Magnetic Resonance Imaging
mRNA	messenger RNA
ms	Millisekunde
mTOR	mammalian target of Rapamycin
mTORC1	mTOR complex 1
mTORC2	mTOR complex 2
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NRF2	Nuclear factor-erythroid factor 2-related factor 2
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OH-Txf-	4-OH-Tamoxifen
p	phospho
p90RSK	p90 ribosomal S6 kinase
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCr	Phospho-Kreatin
PDGF	plateled-derived growth factor
PDK1	3-phosphoinositide-dependent protein kinase
pH	Potential hydrogenii
PH-Domäne	Pleckstrin-Homologie-Domäne
PHLPP	PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase
PIKK	phosphatidylinositol 3-kinase-like protein kinase
PIP2	Phosphatidylinositol(3,4)bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)trisphosphat
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PP2	protein phosphatase 2
PRAS40	40-kDa proline-rich Akt substrate
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
Rags	Ras-related GTPases
Raptor	regulatory-associated protein of mTOR
Rheb	Ras homologue enriched in brain

RNA	.....	Ribonukleinsäure
rpm	.....	runs per minute
s	.....	Sekunde
SDS	.....	Natriumdodecylsulfat
Ser	.....	Serin
SH2	.....	src homology 2
SREBP1c	.....	Sterol regulatory element-binding transcription factor 1
STK11	.....	Serine/threonine kinase 11
TAC	.....	Transverse aortic constriction
TBC1D7	.....	Tre2-Bub2-Cdc16-1 domain family member 7
TBS	.....	tris-buffered saline
TEMED	.....	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Thr	.....	Threonin
TNF $\alpha$	.....	tumor necrosis factor alpha
TSC1	.....	tuberous sclerosis complex 1
TSC2	.....	tuberous sclerosis complex 2
Txf	.....	Tamoxifen
Tyr	.....	Tyrosin
UV	.....	Ultraviolettstrahlung
V	.....	Volt
VEGF	.....	vascular endothelial growth factor
WT	.....	Wildtyp

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1. Definition und Funktionen von AKT .....	1
1.2 Struktur und Isoformen von AKT .....	1
1.3 Rolle von AKT im Herz-Kreislaufsystem .....	2
1.4 AKT-Aktivierung durch Insulin/ IGF-1 und Unterschiede der Wirkung von Insulin/ IGF1 in vivo .....	2
1.5 Regulation der AKT-Aktivität.....	3
1.6 mTORC1-Signalweg .....	6
1.7 GSK3 $\beta$ -Signalweg.....	7
1.8 AMPK .....	9
1.9 Kardiale Energieversorgung – Glukoseaufnahme.....	10
1.10 AKT im Zusammenhang mit kardialer Erregungsleitung und EKG der Maus.....	11
1.10.1 Aktionspotential der Maus mit zugrundeliegenden Strömen.....	11
1.10.2 Morphologie des Oberflächen-EKGs und Normwerte.....	13
1.10.3 Einfluss von AKT auf Connexin 43 in kardialen Gap junctions der Maus .....	15
1.11 Phänotyp des iCM-AKT1/2-, des iCM-AKT1- und des iCM-AKT2-KO .....	16
1.12 Ziele der Arbeit .....	17
<b>2. Material &amp; Methoden .....</b>	<b>19</b>
2.1 Tierversuchsgenehmigung.....	19
2.2 Geräte/ Materialien.....	19
2.3 Verwendete Chemikalien .....	20
2.4 Kits und Reagenzien.....	21
2.5 Puffer .....	21
2.6 Western Blot Gele .....	22
2.7 Antikörper .....	23
2.7.1 Primäre Antikörper.....	23
2.7.2 Sekundäre Antikörper .....	24
2.8 Transgenes Mausmodell.....	24
2.9 Insulinstimulation und Organentnahme .....	26
2.9.1 Intraperitoneale Stimulation.....	26
2.9.2 Organentnahme .....	26
2.9.3 Kardiale Perfusion mit Insulin und IGF1 nach Langendorff .....	26
2.10 Untersuchung der Proteinphosphorylierung im Western Blot .....	27

2.10.1 Proteinaufbereitung aus Gewebe.....	27
2.10.2 BCA-Assay .....	27
2.10.3 SDS-PAGE.....	28
2.10.4 Quantifizierung der Gesamt-Proteinmenge mittels TGX.....	29
2.10.5 Western Blot.....	29
2.10.6 Immunodetektion und Signalquantifizierung.....	30
2.10.7 Auswertung der Western Blot-Versuchsreihen.....	30
2.11 Bedeutung von AKT für die kardiale Erregungsleitung .....	31
2.11.1 Aufzeichnung der EKGs .....	31
2.11.2 Auswertung eines EKGs .....	32
2.11.3 Versuchsreihen.....	33
2.11.4 Microarray-Analysen .....	33
2.12 Statistik.....	33
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>35</b>
3.1 Kontrolle des iCM-AKT-KOs und der Insulinstimulation .....	35
3.2 Phosphorylierung von AKT-Substraten an d7 nach Induktion des iCM-AKT-KOs .....	37
3.2.1 Phosphorylierung von AKT-Substraten im iCM-AKT1/2-KO nach in vivo Insulinstimulation.....	37
3.2.1.1 mTORC/ p70S6K-Signalweg - Regulation der Proteinbiosynthese .....	37
3.2.1.2 GSK3 $\beta$ -Signalweg und AMPK .....	41
3.2.1.3 Phosphorylierung des Upstream-AKT-Regulators PTEN.....	43
3.2.2 Phosphorylierung von AKT-Substraten in iCM-AKT1- und iCM-AKT2-Einzel-KOs nach in vivo Insulinstimulation .....	43
3.2.2.1 mTORC/ p70S6K-Signalweg - Regulation der Proteinbiosynthese .....	44
3.2.2.2 GSK3 $\beta$ -Signalweg .....	46
3.2.3 IGF1-/ insulinstimulierte Phosphorylierung kardialer AKT-Substrate nach iCM-AKT1/2-KO – Perfusion nach Langendorff.....	47
3.2.3.1. mTORC/ p70S6K-Signalweg - Insulinstimulation .....	47
3.2.3.2 GSK3 $\beta$ -Signalweg - Insulinstimulation .....	49
3.2.3.3 mTORC/ p70S6K-Signalweg - IGF1-Stimulation .....	50
3.2.3.4 GSK3 $\beta$ -Signalweg - IGF1-Stimulation .....	52
3.3 GLUT-Transporter .....	54
3.3.1 GLUT1-Proteinmenge in WT und KO .....	54
3.3.2 GLUT4-Proteinmenge in WT und KO .....	54
3.4. Bedeutung von AKT für die kardiale Erregungsleitung der Maus .....	56

3.4.1 Einfluss einer Insulinstimulation auf das EKG der WT-Maus .....	56
3.4.1.1 Einfluss der Insulinstimulation auf die EKG-Morphologie der WT-Maus.....	56
3.4.1.2 Einfluss der Insulinstimulation auf die Herzfrequenz .....	57
3.4.1.3 Einfluss der Insulinstimulation auf EKG-Intervalle .....	58
3.4.2 Einfluss des iCM-AKT1/2-KOs auf das murine Oberflächen-EKG.....	59
3.4.2.1 Einfluss des iCM-AKT1/2-KOs auf die EKG-Morphologie .....	59
3.4.2.2 Einfluss des iCM-AKT1/2-KOs auf die Herzfrequenz .....	61
3.4.2.3 Einfluss des iCM-AKT1/2-KOs auf EKG-Wellen und -Intervalle .....	61
3.4.3 Expression kardialer Kalium- und Calciumkanäle nach iCM-AKT1/2-KO.....	63
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>67</b>
4.1 Überprüfung von iCM-AKT-KO und Stimulation.....	67
4.2 Zelluläre Signaltransduktion in iCM-AKT-KO-Herzen .....	68
4.2.1 Signaltransduktion in iCM-AKT1/2-KO-Herzen .....	68
4.2.1.1 mTORC1-Signaltransduktion.....	68
4.2.1.2 GSK3 $\beta$ -Signaltransduktion .....	69
4.2.1.3 Thr172-Phosphorylierung der AMPK.....	70
4.2.1.4 Phosphorylierung von PTEN .....	71
4.2.2 Signaltransduktion in iCM-AKT1- und iCM-AKT2-KO-Herzen .....	71
4.2.3 AKT-abhängige Substratphosphorylierung bei Insulin- und IGF-Stimulation isolierter, nach Langendorff perfundierter Herzen an d7 nach iCM-AKT1/2-KO .....	72
4.3 Kardiale GLUT1- und GLUT4-Proteinmenge nach iCM-AKT1/2-KO .....	73
4.4 Einfluss von AKT auf die kardiale Erregungsleitung .....	74
4.4.1 Einfluss von Insulinstimulation auf Oberflächen-EKGs wildtypischer Mäuse .....	74
4.4.2 Veränderungen muriner Oberflächen-EKGs nach AKT-Deletion.....	74
4.5 Schlussfolgerung .....	77
<b>5. Literatur- und Quellenverzeichnis .....</b>	<b>78</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: AKT-Aktivierung und Signalling.....	5
Abb. 2: Ventrikuläres Aktionspotential muriner und humaner Kardiomyozyten .....	13
Abb. 3: Schematische Darstellung von EKG-Komplexen von Mensch und Maus .....	15
Abb. 4: Schematische Darstellung des kardiomyozytenspezifischen, Cre-LoxP vermittelten AKT-Knockouts.....	25
Abb. 5: Exemplarischer EKG-Komplex einer basalen WT-Maus.....	33
Abb. 6: Western Blots zur Kontrolle von iCM-AKT-KO und Überprüfung der Aktivierung des Insulin-Signalwegs .....	36
Abb. 7: AKT-vermittelte Regulation der Proteinbiosynthese via mTORC1-Signalweg. Schematische Darstellung. ....	38
Abb. 8: Einfluss des iCM-AKT1/2-KOs auf die AKT-vermittelte Regulation der Proteinbiosynthese	39
Abb. 9: Einfluss des iCM-AKT1/2-KOs auf die Phosphorylierung von 4E-BP1 .....	41
Abb. 10: AKT-vermittelte Regulation der Glykogensynthese. Schematische Darstellung. ....	41
Abb. 11: Einfluss des iCM-AKT1/2-KOs auf die AKT-vermittelte Regulation des Glykogen- und Glukosestoffwechsels.....	42
Abb. 12: Einfluss des iCM-AKT1/2-KOs auf die stimulierte Phosphorylierung von PTEN. ....	43
Abb. 13: Effekt des iCM-AKT1- und des iCM-AKT2-Einzel-KOs auf die AKT-vermittelte Regulation der Proteinbiosynthese. ....	44
Abb. 14: Effekt des iCM-AKT1- und des iCM-AKT2-Einzel-KOs auf die Phosphorylierung von 4E-BP1.....	45
Abb. 15: Effekt des iCM-AKT1- und des iCM-AKT2-Einzel-KOs auf die AKT-vermittelte Regulation der Glykogensynthese. ....	47
Abb. 16: Einfluss des iCM-AKT1/2-KOs auf die AKT-vermittelte Regulation der Proteinbiosynthese. Insulinstimulation von nach Langendorff perfundierten Herzen. ....	48
Abb. 17: Effekt des iCM-AKT1/2-KOs auf die Phosphorylierung von 4E-BP1. Insulinstimulation von nach Langendorff perfundierten Herzen. ....	49
Abb. 18: Einfluss des iCM-AKT1/2-KOs auf die AKT-vermittelte Regulation der Glykogensynthese. Insulinstimulation von nach Langendorff perfundierten Herzen. ....	50
Abb. 19: Einfluss des iCM-AKT1/2-KOs auf die AKT-vermittelte Regulation der Proteinbiosynthese. IGF1-Stimulation von nach Langendorff perfundierten Herzen.....	51
Abb. 20: Effekt des iCM-AKT1/2-KOs auf die Phosphorylierung von 4E-BP1. IGF1-Stimulation von nach Langendorff perfundierten Herzen. ....	52
Abb. 21: Einfluss des iCM-AKT1/2-KOs auf die AKT-vermittelte Regulation der Glykogensynthese. IGF1-Stimulation von nach Langendorff perfundierten Herzen.....	53
Abb. 22: GLUT1- und GLUT4-Proteinmenge in iCM-AKT1/2-KO und WT zu verschiedenen Zeitpunkten nach KO-Induktion. ....	55
Abb. 23: Untersuchung des Effekts der Insulinstimulation auf das WT-EKG .....	56

Abb. 24: Morphologie der EKG-Kurve einer basalen (PBS-behandelten) und einer insulinstimulierten WT-Maus. ....	57
Abb. 25: Mittlere Herzfrequenz im Zeitverlauf. ....	58
Abb. 26: P-Welle, PR-Intervall und QRS-Intervall im Zeitverlauf .....	59
Abb. 27: EKG-Komplexe von je einer WT- und iCM-AKT1/2-KO-Maus im Zeitverlauf. ....	60
Abb. 28: Mittlere Herzfrequenz im Zeitverlauf. ....	61
Abb. 29: Bestimmung der QRS-Dauer bei fehlender J-Welle. ....	62
Abb. 30: P-Welle, PR-Intervall und QRS-Intervall im Zeitverlauf.....	63

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Genexpression von K <sup>+</sup> -Kanälen in iCM-AKT1/2-KO Herzen .....	65
Tabelle 2: Genexpression von Ca <sup>2+</sup> -Kanälen in iCM-AKT1/2-KO Herzen.....	66

# **Einleitung**

## **1.1. Definition und Funktionen von AKT**

Die 57 kDa (Kilodalton) Ser-/Thr- Proteinkinase AKT, auch genannt PKB, wurde erstmals 1987 von Stephen Staal als vAKT-Onkogen des AKT8 transformierenden Retrovirus identifiziert und beschrieben (Manning and Toker, 2017).

Durch Serin- und/ oder Threonin-Phosphorylierung verschiedener Substrate reguliert AKT viele zelluläre Prozesse, inklusive Metabolismus, Proliferation, Zellüberleben, Wachstum und Angiogenese (Hers et al., 2011). Auf Grund ihrer Reversibilität und Vielseitigkeit hat sich die Phosphorylierung evolutionär als wichtige posttranslationale Modifikation entwickelt (Hunter, 2012). Es sind über 100 AKT-Substrate bekannt. AKT phosphoryliert Proteine verschiedener funktioneller Klassen, wie Protein- und Lipidkinasen, Transkriptionsfaktoren, Regulatoren kleiner G-Proteine, metabolische Enzyme, Zellzyklusregulatoren und viele weitere (Manning and Toker, 2017).

Die minimale Erkennungssequenz für die Phosphorylierung von Substraten durch AKT ist RXXRXX (pSer/pThr) Ψ. Dabei steht R für Arginin, X für einen beliebigen Aminosäurerest, p-Ser/ p-Thr für Phosphoserin/ Phosphothreonin und Ψ für einen sperrigen hydrophoben Rest (Hers et al., 2011; Obata et al., 2000).

Phosphorylierung von Substraten durch AKT kann verschiedene Effekte haben, wie Hemmung oder Förderung der Aktivität, veränderte subzelluläre Lokalisation oder verändertes Bindungsverhalten des Substrats (Vasudevan and Garraway, 2010). Während die Phosphorylierung vieler AKT-Substrate eine definierte physiologische Konsequenz hat, kontrolliert AKT auch wichtige Signalschnittstellen, über die viele zelluläre Funktionen weitreichend über weitere Signaltransduktionsmoleküle wie Proteinkinasen und -phosphatasen, Acetylasen ect. reguliert werden. AKT-Substrate werden nicht exklusiv durch AKT reguliert sondern können beispielsweise auch durch andere Kinasen moduliert werden (Manning and Toker, 2017).

## **1.2 Struktur und Isoformen von AKT**

Es gibt drei Isoformen von AKT in Säugern (AKT1/2/3 oder PKB $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ ), die im Laufe der Evolution durch Genduplikationen entstanden sind. AKT2 und AKT3 zeigen 83 bzw. 81% übereinstimmende Aminosäuresequenzen zu AKT1. Alle AKT-Isoformen teilen einen ähnlichen Aufbau und besitzen eine N-terminale PH-Domäne, eine Kinase-Domäne und eine C-terminale regulatorische Domäne (Vanhaesebroeck and Alessi, 2000).

AKT1 und AKT2 sind ubiquitär exprimiert (Schultze et al., 2011). AKT1 ist vor allem verantwortlich für Zellwachstum und Zellüberleben, AKT2 ist prädominant in insulinresponsivem Gewebe wie Muskel und Adipozyten exprimiert und scheint vor allem metabolische Funktionen auszuüben (Hers et al., 2011) AKT3 ist in Gehirn, Testis, Lunge, Milchleiste und Fett zu finden (Dummler and Hemmings, 2007; Yang et al., 2003).

Im Herzen finden sich nur sehr geringe Proteinmengen von AKT3 (Easton et al., 2005).

AKT1, AKT2 und AKT3 können sowohl redundante als auch spezifische Funktionen in verschiedenen Geweben haben (Manning and Toker, 2017). Die verschiedenen Phänotypen, die bei Knockout von AKT1, AKT2 und AKT3 auftreten, weisen auf isoformspezifische Funktionen von AKT hin (Schultze et al., 2011). So kommt es bei globalem AKT1-KO zu Wachstumsretardierung und eingeschränktem Überleben, bei AKT2-KO zu einem Diabetes-ähnlichen Syndrom und bei AKT3-KO zu einer verminderten Hirngröße. Ein globaler AKT1-/ AKT2-Doppel-KO führt bereits neonatal zum Tod (Manning and Toker, 2017; Dummler and Hemmings, 2007) .

Da die Expression der AKT-Isoformen in vielen Organen überlappend ist, lassen sich die beobachteten Phänotypen nicht allein durch abweichende Genexpression erklären, sondern zum Teil durch Substratselektivität der AKT-Isoformen (Manning and Toker, 2017; Schultze et al., 2011). Während der Großteil der AKT-Substrate von allen drei AKT-Isoformen phosphoryliert und funktionell reguliert wird, wurden einige Substrate identifiziert, die nur von AKT1, AKT2 oder AKT3 beeinflusst werden. Mechanismen, die wahrscheinlich zur AKT-Isoformspezifität für Downstream-Substrate beitragen, umfassen molekulare Eigenschaften individueller Isoformen, subzelluläre Verteilung und relative Expression im jeweiligen Setting, sowie kontextabhängige selektive Aktivierung spezifischer AKT-Isoformen (Manning and Toker, 2017; Reinartz et al., 2014).

### **1.3 Rolle von AKT im Herz-Kreislaufsystem**

AKT spielt eine definierte Rolle für die Funktion verschiedener Zellen des kardiovaskulären Systems, wie Kardiomyozyten, Thrombozyten und Endothelzellen. Dabei reguliert AKT1 zum Beispiel das kardiale Wachstum sowie die kontraktile Funktion und Koronarangiogenese (Hers et al., 2011).

Veränderungen des AKT-Signallings spielen eine wichtige Rolle in vielen pathologischen kardiovaskulären Prozessen wie zum Beispiel bei Atherosklerose, kardialer Hypertrophie und vaskulärem Remodelling (Abeyrathna and Su, 2015). AKT kann über verschiedene Mechanismen vor kardiovaskulärer Krankheit schützen (Herzwachstum, endotheliale NO-Produktion) oder zu deren Fortschreiten beitragen (Plättchenaktivierung, Leukozytentransmigration) (Hers et al., 2011).

### **1.4 AKT-Aktivierung durch Insulin/ IGF-1 und Unterschiede der Wirkung von Insulin/ IGF1 in vivo**

Die AKT-Isoformen werden durch Insulin, Wachstumsfaktoren wie IGF, PDGF, VEGF, HGF und Zytokine wie TNF $\alpha$  und IL2, aber auch durch Umweltstressoren wie Hitzeschock, Hypoxie und oxidativen Stress aktiviert (Schultze et al., 2011).

In vielen Zelltypen besitzen die „Insulin-like Growth Factors“ IGF1 und IGF2 vielfältige Bioaktivitäten wie die Induktion von Wachstum oder Differenzierung von Zielzellen oder die Steigerung des Zellüberlebens. Insulin ist strukturell dem IGF1 ähnlich und vermittelt anabole metabolische Aktivität wie gesteigerte Glukose- und Aminosäureaufnahme, Induktion der Glykogen-, Protein- und Lipidsynthese und eine Inhibition der Glukoneogenese, Lipolyse und des Proteinabbaus. IGF1 bewirkt überwiegend Langzeiteffekte, die das Zellschicksal bestimmen, während Insulin vor allem metabolische Aktivität besitzt.

Infolge dieser funktionellen Unterschiede stellt sich die Frage, wie sich die Signaltransduktion von IGF1 und Insulin unterscheidet, da sie prinzipiell dieselben Signalwege aktivieren können (Hakuno and Takahashi, 2018).

Die Unterschiede zwischen IGF- und Insulinaktivität spiegeln zunächst die unterschiedliche Expression der jeweiligen Rezeptoren in Zellen und Gewebe wider. Die Expression des IGF1-Rezeptors ist im Embryonalgewebe und in verschiedenen Geweben mit Ausnahme von Leber und Adipozyten des Erwachsenen ausgeprägt. In Leber-, Muskel- und Fettgewebe ist der Insulinrezeptor stark exprimiert (Hakuno and Takahashi, 2018). Obwohl der IGF1- und der Insulinrezeptor hochgradig homolog sind, ist die Homologie ihrer C-terminalen Regionen gering. Verschiedene Studien legen nahe, dass der Insulin- und IGF1-Rezeptor nicht austauschbar sind und dass spezifische Regionen innerhalb der C-terminalen Domäne wichtig für die Kontrolle unterschiedlicher Funktionen sind (Hakuno and Takahashi, 2018). Der IGF1-Rezeptor besitzt eine hohe Affinität für IGF1 und IGF2 und bindet Insulin mit 50-100-fach geringerer Affinität. Umgekehrt bindet der Insulinrezeptor Insulin mit hoher und IGFs mit geringer Affinität. Dieser Unterschied spielt eine wichtige Rolle bei der Vermittlung verschiedener Bioaktivitäten von IGFs und Insulin (Hakuno and Takahashi, 2018).

Der Unterschied zwischen den IGF-vermittelten Langzeiteffekten und der vorwiegend metabolischen insulinvermittelten Aktivität kann auch durch Unterschiede in der Sekretion von IGF1 und Insulin erklärt werden. Während Insulin transient nach Nahrungsaufnahme sezerniert wird, ist die IGF-Sekretion konstant. Insulin hat eine Halbwertszeit von ca. 10 Minuten und IGFs haben eine Halbwertszeit von über 15 Stunden (Hakuno and Takahashi, 2018).

### **1.5 Regulation der AKT-Aktivität**

Der kanonische Weg der AKT-Aktivierung wird initiiert durch Stimulation von Rezeptortyrosinkinasen oder G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, was zur Plasmamembranrekrutierung und Aktivierung einer oder mehrerer Isoformen der Klasse I Phosphoinositid-3-Kinase-Familie (PI3K) führt (Manning and Toker, 2017).

Abb. 1 veranschaulicht die Aktivierung von AKT via PI3K nach Insulin- oder IGF1-Stimulation mit den nachgeschalteten Signalwegen, die in den folgenden Abschnitten beschrieben werden.

Der Insulin- und IGF1-Rezeptor sind hochgradig homologe Tyrosinkinase-Rezeptoren. Es handelt sich um tetramere Proteine bestehend aus zwei extrazellulären  $\alpha$ -Untereinheiten und 2 transmembran- $\beta$ -Untereinheiten, die über Disulfidbrücken verbunden sind. Bindung eines Liganden an die  $\alpha$ -Untereinheit aktiviert die Tyrosinkinaseaktivität der  $\beta$ -Untereinheit, was in der Autophosphorylierung verschiedener Tyrosinreste resultiert (u.a. Tyr1131, Tyr1135, Tyr1136 des IGF1-Rezeptors) (Hernández-Sánchez et al., 1995).

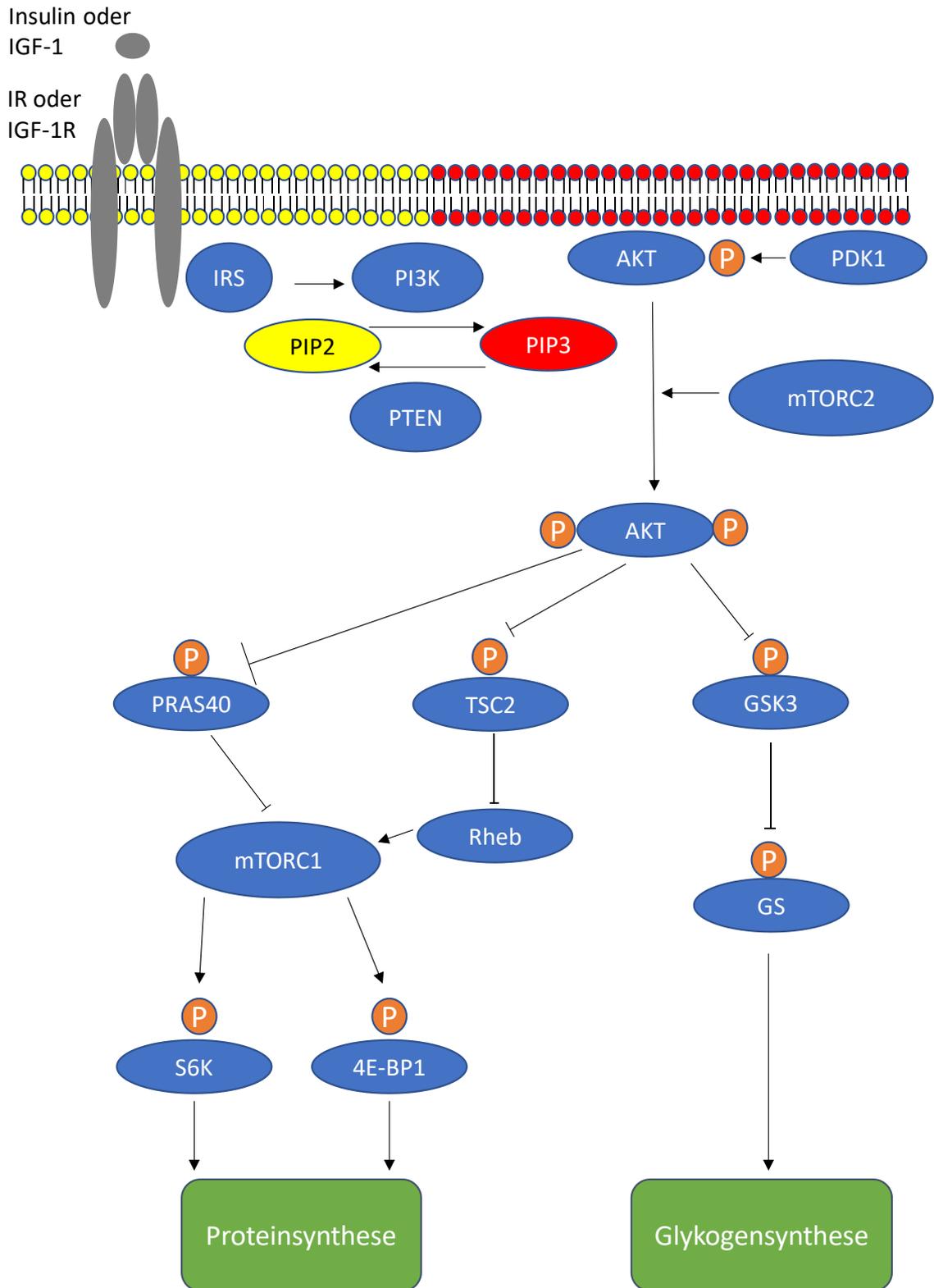
Die Phosphorylierung der  $\beta$ -Untereinheit verstärkt die Kinaseaktivität und erlaubt die Rekrutierung von Rezeptorsubstraten wie verschiedenen IRS (Insulin Rezeptor Substrate). IRS-Proteine werden an die Membran rekrutiert und dort von den aktivierten Rezeptoren an multiplen Tyrosinresten phosphoryliert,

die dann Bindungsstellen für intrazelluläre Moleküle formen, die Src-Homologie (SH2)-Domänen besitzen, wie die PI3K. Bindung der regulatorischen Untereinheiten der PI3K über ihre SH2-Domänen an tyrosinphosphorylierte IRS resultiert in der Aktivierung der katalytischen Untereinheit der PI3K, die  $\text{PIP}_2$  phosphoryliert, so dass der Lipid-Second-Messenger  $\text{PIP}_3$  (Phosphatidylinositoltriphosphat) in der Membran entsteht.  $\text{PIP}_3$  rekrutiert AKT an die Membran. Interaktion der PH-Domäne von AKT mit 3-Phosphoinositiden induziert eine Konformationsänderung von AKT und ermöglicht die Phosphorylierung an Thr308 in der Aktivierungs- oder T-Schleife durch die co-rekrutierte *3-phosphoinositide-dependent protein kinase* (PDK1), wodurch die AKT-Aktivität etwa 100-fach gesteigert wird (Hers et al., 2011). Außerdem erfolgt eine Phosphorylierung von Ser473 in dem C-terminalen hydrophoben Motiv durch mTORC2 (mammalian target of Rapamycin Complex 2). Die Phosphorylierung von Ser473 stabilisiert die Thr308-Phosphorylierung und den Aktivierungsstatus von AKT (Manning and Toker, 2017). Die korrespondierenden Aminosäurereste zu Thr308 und Ser473, die für die Regulation von AKT1 gelten, sind Thr309 und Ser474 von AKT2 bzw. Thr305 und Ser472 von AKT3. Für die maximale Kinaseaktivität von AKT ist die Phosphorylierung jeweils beider Aminosäurereste erforderlich (Manning and Toker, 2017).

Die AKT-Signaltransduktion wird durch Dephosphorylierung an Thr308 und Ser473 durch die Proteinphosphatase 2 (PP2) und PHLPP (PH domain leucine rich phosphatase) beendet (Hers et al., 2011).

Neben der obligaten Thr308- und Ser473-Phosphorylierung werden Aktivierung, Inaktivierung und zelluläre Lokalisation von AKT durch weitere posttranslationale Modifikationen feinreguliert. Beispielsweise steigert Phosphorylierung an Ser219 durch die CK2 die katalytische Aktivität von AKT und  $\text{GSK3}\alpha$ -vermittelte Phosphorylierung von Thr312 hemmt diese.

Der PI3K-AKT-Pathway unterliegt negativer Feedback-Regulation, vermittelt unter anderem von mehreren AKT-Substraten. Dabei spielt mTORC1 eine wichtige Rolle für die akute Feedback-Inhibition von AKT. Es findet eine Kreuzregulation zwischen dem PI3K-AKT-Pathway und anderen wichtigen Signalwegen wie dem RAS-ERK- oder dem AMPK-Pathway statt, wobei es sowohl stimulierende, als auch inhibierende Wechselwirkungen zwischen den Signalwegen gibt. Beispielsweise können AKT und AMPK die Glukoseaufnahme in metabolischen Geweben stimulieren durch Phosphorylierung der RAB-GAPs TBC1D1 und TBC1D4 und haben demgegenüber entgegengesetzte Effekte auf den mTORC1-Signalweg, Protein-, Lipid- und Glykogensynthese sowie die Autophagieinduktion (Manning and Toker, 2017).



**Abb. 1: AKT-Aktivierung und Signalling**

Schematische Darstellung der AKT-Aktivierung nach IGF1- oder Insulinstimulation und der nachgeschalteten mTORC1- und GSK3-Signalwege.

(Modifiziert nach Boucher et. al, 2014, Manning and Toker, 2017).

## **1.6 mTORC1-Signalweg**

mTOR, eine Ser-/Thr-Proteinkinase der PIKK-Familie (*PI3K related kinase*), bildet die katalytische Untereinheit der Proteinkomplexe mTORC1 und mTORC2. mTOR koordiniert Zellwachstum und Metabolismus von Eukaryoten mit dem umgebendem Milieu aus beispielsweise Wachstumsfaktoren und Nährstoffen (Saxton and Sabatini, 2017).

Der mTORC1-Proteinkomplex besteht aus den drei Kernkomponenten mTOR, Raptor und mLST8 und beinhaltet zudem die beiden inhibitorischen Untereinheiten PRAS40 (*proline-rich substrate of AKT of 40kDa*) und DEPTOR (Saxton and Sabatini, 2017).

Die Förderung des Zellwachstums durch die PI3K und AKT nach Wachstumsfaktorstimulation wird größtenteils durch die AKT-vermittelte Aktivierung von mTORC1 reguliert (Manning and Toker, 2017). mTORC1 spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation der Steigerung der Protein-, Lipid- und Nucleotidbiosynthese und der gleichzeitigen Suppression kataboler Signalwege, wie zum Beispiel der Autophagie. mTORC1 kontrolliert somit die Balance zwischen Anabolismus und Katabolismus als Antwort auf Umweltbedingungen (Saxton and Sabatini, 2017).

Der Aktivierungsstatus von mTORC1 unterliegt einer integrierten Regulation unabhängiger Signale auf Rheb und eine andere Gruppe kleiner GTPasen, den Rags (Manning and Toker, 2017). AKT aktiviert mTORC1 primär durch Phosphorylierung und Inhibition von TSC2 (*tuberous sclerosis complex 2*), das mit TSC1 und TBC1D7 den TSC-Komplex bildet. TSC2 wirkt als GAP (GTPase aktivierendes Protein) spezifisch für die GTPase Rheb, die in ihrer GTP-gebundenen Form ein essenzieller Aktivator von mTORC1 ist. TSC2 fördert durch die Rheb-GAP Aktivität die Umwandlung von Rheb-GTP zu Rheb-GDP und ist so ein potenter Inhibitor der mTORC1 Aktivität. Phosphorylierung von TSC2 durch AKT hemmt dessen inhibitorische Aktivität auf mTORC1 und führt so zur mTORC1-Stimulation. PRAS40, ein weiteres AKT-Substrat, das an der Regulation von mTORC1 beteiligt ist, ist ein Protein mit inhibitorischer Aktivität gegenüber mTORC1. AKT phosphoryliert PRAS40 an Thr246 und inhibiert dadurch dessen inhibitorische Aktivität gegenüber mTORC1. Die Phosphorylierung von PRAS40 an Thr246 ist ein verlässlicher Marker der AKT-Aktivität. Die Bedeutung der PRAS40-Phosphorylierung bei der Vermittlung des AKT-Signals auf mTORC1 ist noch nicht vollständig geklärt. Verschiedene Arbeiten legen nahe, dass der TSC-Rheb-Weg bei der AKT-vermittelten mTORC1-Regulation gegenüber PRAS40 dominant ist (Manning and Toker, 2017).

Bei Aktivierung wird mTOR an verschiedenen Aminosäureresten phosphoryliert, inklusive Ser2481 und Ser2448 (Vazquez-Martin et al., 2012). Verschiedene Studien zeigten, dass mTOR an Ser2448 in mTORC1 und mTORC2 von der p70S6K downstream von mTORC1 phosphoryliert wird (Saxton and Sabatini, 2017) Diese p70S6K-vermittelte Ser2448-Phosphorylierung dient im Rahmen eines negativen Feedback-Loops der Feinregulierung der mTOR-Aktivität und wird nicht von AKT direkt vermittelt (Figueiredo et al., 2017). Wachstumsfaktoren wie Insulin stimulieren die Autophosphorylierung von mTOR an Ser2481 in mTORC1 und mTORC2 PI3K-abhängig (Vazquez-Martin et al., 2012).

mTORC1 fördert die Proteinsynthese durch die Phosphorylierung der zwei Schlüsseffektoren p70S6-

Kinase 1 (S6K1) und *eIF4E Binding protein* (4E-BP). mTORC1 phosphoryliert die p70S6K direkt am hydrophoben Motiv an Thr389 und ermöglicht so die folgende Phosphorylierung und Aktivierung durch die PDK1 (Saxton and Sabatini, 2017). Die p70S6K wirkt auf viele Substrate, wie Transkriptionsfaktoren, das ribosomale Protein S6, RNA Helikasen und andere Proteinsubstrate, die an der Translationsinitiation und Elongation beteiligt sind (Mendoza et al., 2011). Multiple Phosphorylierung von S6 ist eine Voraussetzung für gesteigerte Raten der Initiation der Proteinsynthese und des folgenden Zellwachstums als Antwort auf Mitogene und Wachstumsfaktoren. S6 wird am Carboxyl-Terminus an Ser235, Ser236, Ser240, Ser244 und Ser247 phosphoryliert (Ferrari et al., 1991).

Die Aktivität von eIF4E (= *eukaryotic Initiation factor 4E*) ist ein Schlüssel für die Kontrolle der Genexpression. 4E-BP1 ist ein translationaler Repressor, der an eIF4E spezifisch bindet und so dessen Interaktion mit eIF4G inhibiert. Die Aktivität von 4E-Bindungsproteinen wird durch Phosphorylierung reguliert. Es sind sieben Phosphorylierungsstellen von 4E-BP1, dem am besten charakterisierten 4E-BP, bekannt, die in der 4E-BP1 Sequenz von Nagetieren den Aminosäureresten Thr36, Thr45, Ser64, Thr69, Ser82, Ser100 und Ser111 entsprechen. mTORC1 phosphoryliert 4E-BP1 an Thr36, Thr45, Ser64 und Thr69, was zu einer Freisetzung von 4E-BP1 von eIF4E führt (Ayuso et al., 2010). Die Dissoziation von eIF4E von 4E-BP1 ermöglicht die Translation 5'-cap-abhängiger mRNA. Akute mTOR-Inhibition betrifft mRNAs der meisten an der Proteinsynthese beteiligten Gene (Saxton and Sabatini, 2017).

Die Phosphorylierung von 4E-BP1 folgt einem hierarchischen Muster wobei Thr69, Thr 36/45 und Ser64 nacheinander phosphoryliert werden. Der individuelle Beitrag der einzelnen Phosphorylierungsstellen von 4E-BP1 zur Kontrolle der eIF4E-Bindung wird noch diskutiert. Die unterschiedlich phosphorylierten Formen von 4E-BP1 sind in der eindimensionalen Gelelektrophorese unterschiedlich mobil und werden daher in dieser in 3 Banden, genannt  $\alpha$ ,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Form, aufgetrennt. Hyperphosphoryliertes 4E-BP1 wird als  $\gamma$ -Form bezeichnet, ist am wenigsten elektrophoretisch mobil und wird im Western Blot durch die oberste der drei Banden repräsentiert. Die mittlere Bande repräsentiert als  $\beta$ -Form bezeichnetes phosphoryliertes 4E-BP1 und die untere Bande als  $\alpha$ -Form bezeichnetes un- oder hypophosphoryliertes 4E-BP1, das die höchste elektrophoretische Mobilität der 3 Formen aufweist (Ayuso et al., 2010). Somit ergeben Unterschiede in der geelktrophoretischen Mobilität von 4E-BP1 Aufschluss über den Aktivitäts- bzw. Dissoziationsgrad von 4E-BP1 von eIF4E.

## **1.7 GSK3 $\beta$ -Signalweg**

Die Glykogen Synthase Kinase 3 ist eine Ser-/ Thr- Proteinkinase, die zur CMCG-Familie der *Prolin-directed* Kinasen gehört. In Säugetieren gibt es zwei paraloge Formen der GSK3, die GSK3 $\alpha$  und die GSK3 $\beta$ . GSK3 $\alpha$  und GSK3 $\beta$  sind zu insgesamt 85% sequenzhomolog und haben innerhalb der Kinasedomäne zu 98% übereinstimmende Aminosäuresequenzen. Die GSK3-Isoenzyme weichen vor allem im Bereich der C- und N-terminalen Region voneinander ab. Sowohl GSK3 $\alpha$  als auch GSK3 $\beta$  finden sich in praktisch allen Geweben von Säugetieren (Kaidanovich-Beilin and Woodgett, 2011). Die Isoenzyme sind teilweise funktionell redundant, es wurden jedoch auch isoformspezifische Funktionen in einzelnen Geweben identifiziert (Manning and Toker, 2017). Die vielen Substrate der GSK3 $\alpha$  und GSK3 $\beta$

beinhalten Regulatoren des zellulären Metabolismus und Proteine, die zelluläres Wachstum und Differenzierung kontrollieren (Patel and Woodgett, 2017).

Die GSK3 besitzt eine hohe Kinaseaktivität in Zellen unter Ruhe- und unstimulierten Bedingungen. Sie ist eine der wenigen Proteinkinasen, die durch extrazelluläre Signale inhibiert wird. Diese induzieren einen schnellen und reversiblen Anstieg der Ser9-/ 21-Phosphorylierung der GSK3, was zu einer Abnahme ihrer enzymatischen Aktivität führt (Kaidanovich-Beilin and Woodgett, 2011). GSK3-Inhibition ist eine Schlüsselkomponente der zellulären Antwort auf Wachstumsfaktoren und Insulin, die die PI3K aktivieren, so die AKT-Aktivität steigern und durch die folgende Phosphorylierung die GSK3 hemmen (Hermida et al., 2017). Die inhibitorische Ser-Phosphorylierung der GSK3 kann neben AKT auch von anderen Kinasen wie p90RSK und PKA vermittelt werden. Sie führt zu einer mäßigen (ca. 50%) Reduktion der messbaren Kinaseaktivität und Substratphosphorylierung der GSK3. Aus diesem Grund scheinen Wachstumsfaktoren und Insulin eher Modifikatoren der GSK3-Funktion zu sein als deren Schlüsselregulatoren (Hermida et al., 2017).

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die Aktivität der GSK3 auch unabhängig von der inhibitorischen N-terminalen Phosphorylierung sein kann, wie bei der Regulation hepatischer Genexpression, kardialem Stress-Remodelling und kardialer ischämischer Präkonditionierung (Hermida et al., 2017). Die GSK3 ist verschiedenen wichtigen Signalwegen wie dem PI3K-Pathway, dem Wnt-Pathway, dem Hedgehog-Signalling und Notch nachgeschaltet (Kaidanovich-Beilin and Woodgett, 2011). In Signalwegen wie dem Wnt- $\beta$ -Catenin-Pathway geht man davon aus, dass die GSK3-Regulation unabhängig von der Regulation durch Wachstumsfaktor-Signalling über PI3K/ AKT ist (Manning and Toker, 2017). Voraussetzung für eine starke Kinaseaktivität der GSK3 auf Ser- oder Thr-Reste von Substraten ist die als Priming bezeichnete Phosphorylierung eines 4 Aminosäuren weiter C-terminal gelegenen Ser- oder Thr-Rests des jeweiligen Substrats. Die Kontrolle über das Priming ist spezifisch für individuelle Substrate und scheint oft die prädominante Form der Regulation der GSK3-Funktion zu sein (Hermida et al., 2017).

Die Regulation von Signalwegen, an denen GSK3 beteiligt ist, erfolgt neben der inaktivierenden N-terminalen Phosphorylierung der GSK3 und der Inaktivierung von Kinasen, die über das Priming von GSK3-Substraten wirken, über Veränderungen der subzellulären Kompartimentierung der GSK3 $\alpha$  oder GSK3 $\beta$  und Veränderungen der Phosphorylierung von Tyr279 der GSK3 $\alpha$  und Tyr216 der GSK3 $\beta$ . Anders als die Ser-Phosphorylierung hat die Tyr-Phosphorylierung der GSK3 aktivierende Wirkung (Patel and Woodgett, 2017).

GSK3 reguliert ein breites Spektrum funktionell verschiedener direkter Downstream-Targets, von denen die meisten nach Phosphorylierung durch die GSK3 inhibiert oder degradiert werden (Manning and Toker, 2017). Beim Wachstumsfaktorsignalling werden GSK3-Substrate durch AKT-vermittelte Phosphorylierung und Inhibition der GSK3 in der Regel positiv reguliert (Manning and Toker, 2017). Die über 100 bekannten GSK3-Substrate können in verschiedene Gruppen von Proteinen, Transkriptionsfaktoren und regulatorischen Enzymen klassifiziert werden, die an Prozessen wie Metabolismus,

zellulärer Architektur, Genexpression, neurobiologischen Prozessen, der Immunantwort, zirkadianer Rhythmik und zellulärem und neuronalem Überleben beteiligt sind (Kaidanovich-Beilin and Woodgett, 2011). GSK3 phosphoryliert auch einige Komponenten des PI3K-AKT-mTOR-Signalnetzwerks. Eine Rolle der GSK3 in der Feedback-Regulation des PI3K-/AKT-Signallings ist wahrscheinlich (Hermida et al., 2017).

GSK3 reguliert den zellulären Metabolismus sowohl direkt durch Phosphorylierung und Inhibition metabolischer Enzyme wie der Glykogen Synthase (GS) als auch indirekt durch inhibitorische Regulation von Transkriptionsfaktoren, die spezifische metabolische Programme global regulieren, wie c-Myc, SREBP1c, HIF1 $\alpha$  und NRF2 (Manning and Toker, 2017).

Insulin stimuliert die Glykogen Synthase (GS), das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Glykogensynthese, durch Reduktion ihrer Phosphorylierung an einem Cluster C-terminaler Reste (Ser641, Ser645, Ser649 und Ser653). Diese Reste werden von der GSK3 $\alpha$  und GSK3 $\beta$  phosphoryliert wodurch die GS gehemmt wird. Insulin führt indirekt durch AKT-vermittelte Inhibition von GSK3 $\alpha$  und GSK3 $\beta$  zur Stimulation der GS-Aktivität und vermehrten Glykogenbildung. Die Untersuchungen von Mora et al. legen nahe, dass die GSK3-Isoformen die Hauptenzyme sind, die Ser641 und Ser645 der GS phosphorylieren und ihre Aktivität als Antwort auf Insulin im Herzmuskel regulieren (Mora et al., 2005).

## **1.8 AMPK**

Die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) spielt eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung der Energiehomöostase in eukaryotischen Zellen und für die Regulation des Gesamtkörper-Energiemetabolismus in mehrzelligen Organismen (Carling, 2017). Aktivierung der AMPK durch steigende zelluläre AMP- bzw. ADP-Level relativ zu ATP führt durch AMPK-vermittelte Phosphorylierung verschiedener Substrate zu einer gesteigerten Rate kataboler (ATP-produzierender) und einer abnehmenden Rate anaboler (ATP-verbrauchender) Stoffwechselwege (Carling, 2017).

Die AMPK ist zusammengesetzt aus einer katalytischen ( $\alpha$ ) und zwei regulatorischen Untereinheiten ( $\beta$  und  $\gamma$ ). Es gibt verschiedene Isoformen jeder Untereinheit, deren Expression zwischen den Organen variiert. Es gibt zwei Isoformen der katalytischen  $\alpha$ -Untereinheit, und die AMPK $\alpha$ 2 ist die häufigste katalytische Untereinheit in Kardiomyozyten (Bertrand et al., 2020). AMPK-Substrate werden ohne Unterschied von den Isoformen AMPK $\alpha$ 1 und AMPK $\alpha$ 2 phosphoryliert (Bertrand et al., 2020). Die  $\alpha$ -Untereinheit besitzt einen kritischen Rest, Thr172, der von *Upstream*-Kinasen phosphoryliert wird (Herzig and Shaw, 2018). Für die volle Kinaseaktivität muss AMPK an Thr172 der katalytischen  $\alpha$ -Untereinheit phosphoryliert sein. Dies wird von Kinasen wie LKB1, STK11 und CAMKK $\beta$  vermittelt. AMPK-Aktivität und Thr172-Phosphorylierung sind abhängig vom zellulären AMP/ATP Verhältnis. AMP und ATP binden kompetitiv an die  $\gamma$ -Untereinheit der AMPK. Bei hohem AMP/ATP-Verhältnis führt Bindung von AMP an die AMPK zur allosterischen Aktivierung ihrer Kinaseaktivität und zu einer Konformationsänderung, die die Dephosphorylierung an Thr172 hemmt (Schultze et al., 2012).

Aktiviert AMPK phosphoryliert Substrate wie AS160, Glykogensynthase 1, Acetyl-CoA Carboxylase

$\alpha$  und Malonyl-CoA Decarboxylase und stimuliert so die Glukoseaufnahme, hemmt die Glykogensynthese, inhibiert die de novo Lipogenese und steigert die  $\beta$ -Oxidation. AMPK inhibiert auch indirekt mTORC1 und blockiert so die Proteinsynthese (Schultze et al., 2012).

AKT und AMPK haben sowohl redundante als auch entgegenwirkende Funktionen in der Regulation von zellulärem Metabolismus und Wachstum. Beide können die Glukoseaufnahme durch metabolische Gewebe durch Phosphorylierung und Inhibition von AS160 und eine dadurch gesteigerte Translokation von GLUT4 an die Plasmamembran erhöhen. AKT-Signalling stimuliert insgesamt anabole Prozesse, vor allem über die Aktivierung von mTORC1, während die aktivierte AMPK den anabolen Metabolismus hemmt und ATP-produzierende, katabole Prozesse fördert. Der Cross-Talk zwischen beiden Signalwegen ist wichtig für das adaptive Wechseln zwischen anabolem und katabolem Stoffwechsel (Manning and Toker, 2017).

### **1.9 Kardiale Energieversorgung – Glukoseaufnahme**

Das Herz verbraucht mehr Energie als jedes andere Organ und kann verschiedene metabolische Substrate als Energiequelle nutzen (Szablewski, 2017). Feinregulierte Energiehomöostase ist essentiell für die Aufrechterhaltung optimaler Herzfunktion. Der Großteil der kardialen Energie wird durch mitochondriale Substratoxidation produziert. Kohlenhydrate und Fettsäuren sind die hauptsächlich vom Herz genutzten Substrate. Für optimierte Energieproduktion wechselt das Herz in Abhängigkeit von der Substratverfügbarkeit und dem hormonalen Status ständig zwischen verschiedenen Metaboliten (Bertrand et al., 2020). Über die Fettsäureoxidation wird mindestens 60% des myokardialen ATPs produziert. Glukose generiert ca. 25-30% der Gesamtenergie. Unter anoxischen Bedingungen wird zur ATP-Produktion primär Glukose über anaerobe Glykolyse verstoffwechselt (Szablewski, 2017).

Glukose ist ein hydrophiles Molekül, das die lipophile Zellmembran nicht passieren kann (Bertrand et al., 2020). Daher wird der Glukosetransport über die Plasmamembran von Glukosetransportern vermittelt (Szablewski, 2017). Kardialer Glukosetransport wird vor allem durch Glukosetransporter der GLUT-Familie vermittelt. GLUTs sind Uniporter, die erleichterte Diffusion von Glukose entlang des Konzentrationsgradienten ermöglichen. Von den 14 existierenden GLUTs, die hinsichtlich gewebespezifischer Expression, Substratspezifität und -affinität variieren, sind GLUT1 und GLUT4 die prädominanten im Herz exprimierten Isoformen. (Bertrand et al., 2020).

GLUT4, dessen Expression nach der Geburt hochreguliert wird, ist der am stärksten exprimierte Glukosetransporter in adulten Kardiomyozyten. Unter unstimulierten Bedingungen ist er vor allem in intrazellulären Vesikeln, sogenannten *GLUT4-storage-vesicles* (GSV), lokalisiert, weshalb die basale Glukoseaufnahme relativ gering ist (Bertrand et al., 2020). Die Translokation von GLUT4 an die Zelloberfläche wird beispielsweise durch Ischämie, Insulin und Katecholamine induziert. Die zwei Hauptstimuli für gesteigerte kardiale Substrataufnahme sind zirkulierendes Insulin und gesteigerte kontraktile Aktivität (Szablewski, 2017).

Das gesunde Herz ist stark insulinsensibel, und Insulin führt zu einer schnellen Steigerung der

Glukoseaufnahme in adulten Kardiomyozyten. Der erste und wichtigste Schritt für die Translokation von GSVs downstream von Insulin wird vom PI3K/AKT-Pathway vermittelt (Bertrand et al., 2020). AS160 ist AKT-Substrat und negativer Regulator der GLUT4-Translokation. Für die GLUT4-Translokation ist daher die Inhibition von AS160 erforderlich. Nach Insulinstimulation kommt es zur Phosphorylierung von AS160 und dessen Dissoziation von GLUT4-Speichervesikeln, wodurch deren Translokation gefördert wird (Szablewski, 2017). Katecholamine und gesteigerte Herzarbeit sind eng verknüpft mit gesteigertem Metabolismus und induzieren ebenfalls GLUT-Translokation und Glukoseaufnahme. Die Stimulation der Kontraktion aktiviert die AMPK in isolierten Kardiomyozyten, und es wurde gezeigt, dass  $\beta$ -adrenerge Agonisten die AMPK aktivieren (Bertrand et al., 2020). Ähnlich wie Insulin stimuliert die AMPK die Glukoseaufnahme durch Förderung der GLUT4-Translokation, da AS160 auch ein AMPK-Target in Skelettmuskel und Kardiomyozyten ist. AMPK steigert außerdem den GLUT4-Gehalt an der Plasmamembran durch Inhibition von dessen endozytotischem Recycling (Bertrand et al., 2020).

Die Expression von GLUT4 wird durch Stimuli wie Insulindepletion, Fettsäuren und Schilddrüsenhormon reguliert (Szablewski, 2017). In Mäusen mit herzspezifischem GLUT4-KO ist kein schädlicher Effekt auf die kardiale Funktion unter stressfreien Bedingungen zu beobachten. Bei diesen Mäusen wurde eine moderate, physiologische Hypertrophie mit gesteigerter basaler Glukoseaufnahme beobachtet, die durch eine Hochregulation von GLUT1 erklärt werden könnte (Bertrand et al., 2020).

GLUT1 ist für den basalen kardialen Glukosetransport verantwortlich und hat einen Anteil von ca. 40% der kardialen Glukosetransporter (Szablewski, 2017). Es ist konstitutiv an der Plasmamembran lokalisiert (Bertrand et al., 2020).

GLUT1 wird vor allem während der embryonalen und frühen postnatalen Phase im Herzen exprimiert. Die Expression wird nach der Geburt herunterreguliert. Die Regulation von GLUT1 erfolgt vor allem auf transkriptioneller Ebene durch die Transkriptionsfaktoren SP1 (Aktivator) und SP3 (Repressor) (Bertrand et al., 2020). Im adulten Herz wird die GLUT1-Expression durch chronische Hypoxie und Langzeitfasten aktiviert (Szablewski, 2017).

## **1.10 AKT im Zusammenhang mit kardialer Erregungsleitung und EKG der Maus**

### **1.10.1 Aktionspotential der Maus mit zugrundeliegenden Strömen**

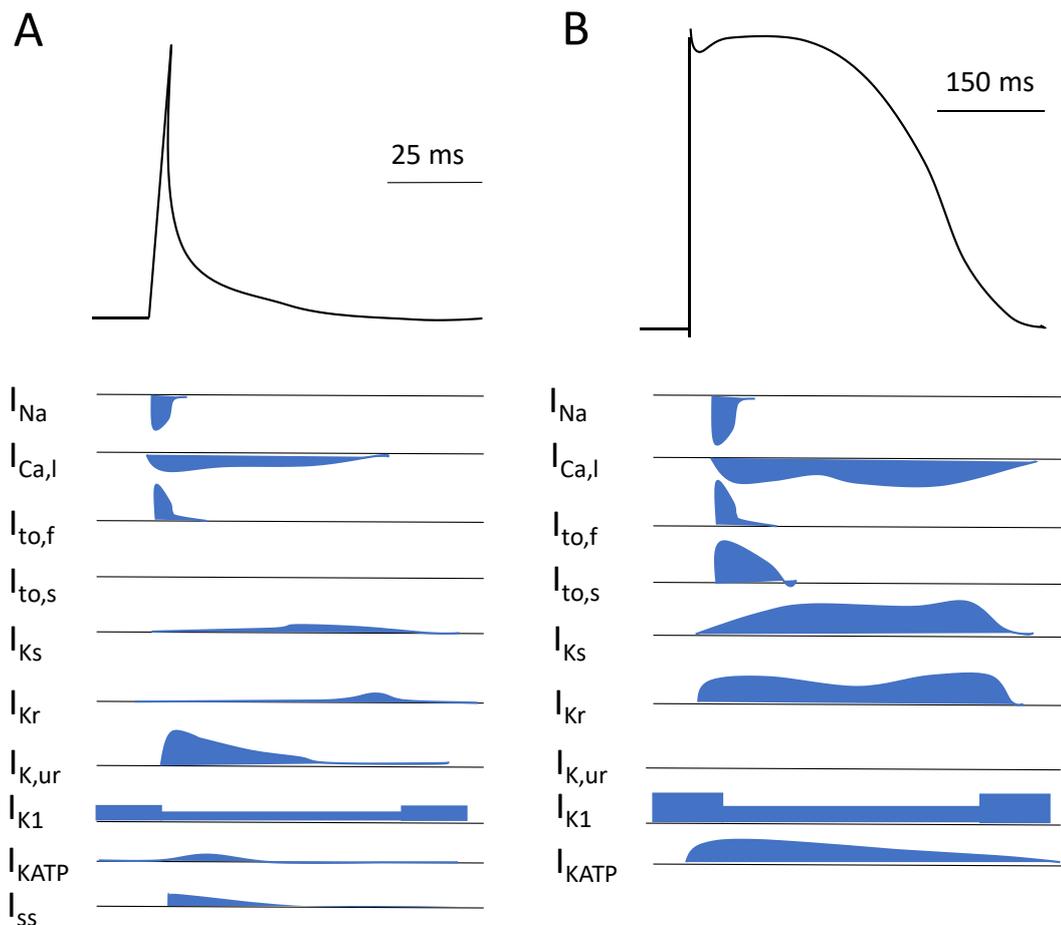
Die Maus ist ein wichtiges Tiermodell für die Untersuchung kardialer Elektrophysiologie und eignet sich als Modell für die Untersuchung kardialer Arrhythmiemechanismen des Menschen. Allerdings gibt es einige signifikante Unterschiede der Elektrophysiologie zwischen den Herzen von Menschen und Mäusen, zum Beispiel hinsichtlich der zu Depolarisation und Repolarisation des Aktionspotentials beitragenden Ionenströme (Kaese et al., 2013).

Im Allgemeinen steigt die Dauer kardialer Aktionspotentiale mit der Körpergröße einer Spezies an und

beträgt etwa 50 ms in Mausventrikeln im Vergleich zu 250 ms beim Menschen. Die Morphologie des Aktionspotentials resultiert aus dem Beitrag zahlreicher depolarisierender und repolarisierender Ströme. Der Unterschied der Aktionspotentialdauer zwischen Maus und Mensch führt dazu, dass die gleiche Art Ionenkanal in Mensch und Maus unterschiedlich zur Morphologie des Aktionspotentials beitragen kann (Kaese and Verheule, 2012).

Abbildung 2 zeigt schematisch ein murines und ein humanes ventrikuläres Aktionspotential mit den zugrunde liegenden Strömen. Das murine Aktionspotential beginnt mit einer schnellen Depolarisationsphase (Phase 0), dem AP-Upstroke, generiert vom großen, schnell aktivierten Natriumstrom  $I_{Na}$ . Die folgende Repolarisationsphase ist durch eine Balance zwischen verschiedenen depolarisierenden Strömen und repolarisierenden Kaliumströmen charakterisiert. Da der L-Typ  $Ca^{2+}$ -Strom ( $I_{Ca,L}$ ) im murinen Herz geringfügiger zum Aktionspotential beiträgt als beim Menschen, kennzeichnet das murine ventrikuläre Aktionspotential eher eine graduelle Repolarisation als eine deutliche Plateauphase wie beim Menschen. Im Mausventrikel sind die  $\alpha 1C$ -Kanäle primär für  $I_{Ca,L}$  verantwortlich. Die im Vergleich zum Menschen deutlich schnellere Repolarisation des Aktionspotentials in Mausventrikeln wird vermittelt von transienten Auswärts- $K^+$ -Strömen ( $I_{to}$ ) mit schneller ( $I_{to,f}$ ) und langsamer ( $I_{to,s}$ ) *recovery from inactivation*, einem langsam inaktivierenden  $K^+$ -Strom ( $I_{K,slow1} = I_{K,ur}$ ) und einem nicht inaktivierenden steady state Strom ( $I_{ss}$ ). Der einwärts gleichrichtende  $K^+$ -Kanal ( $I_{K1}$ ) spielt eine ähnliche Rolle bei der terminalen Repolarisation und der Stabilisierung des Ruhemembranpotentials in den Ventrikeln von Maus und Mensch (Kaese and Verheule, 2012). Die für die Repolarisation des Aktionspotentials in menschlichen Kardiomyozyten bedeutenden  $I_{Kr}$ - und  $I_{Ks}$ -Ströme spielen in murinen Kardiomyozyten eine vernachlässigbare Rolle (Boukens et al., 2014; Kaese and Verheule, 2012)

Aus den genannten, zum Aktionspotential muriner Kardiomyozyten beitragenden Ionenströmen, resultiert dessen trianguläre Form ohne die deutliche Plateauphase, die das menschliche ventrikuläre Aktionspotential kennzeichnet. Veränderungen spezifischer Ströme können elektrophysiologische Konsequenzen in einer Spezies haben, die in der anderen Spezies nicht auftreten (Boukens et al., 2014).



**Abb. 2: Ventrikuläres Aktionspotential muriner (A) und humaner (B) Kardiomyozyten**

Schematische Darstellung des Aktionspotentials eines murinen (A) und eines humanen (B) ventrikulären Myozyten mit den zugrundeliegenden Strömen. Auffällig ist die große initiale Repolarisationsphase und die fehlende Plateauphase im murinen Kardiomyozyten.

(modifiziert nach Nerbonne et al., 2001 und Boukens et al., 2014)

### **1.10.2 Morphologie des Oberflächen-EKGs und Normwerte**

Das Oberflächen-EKG der Maus weist auffällige Unterschiede zum menschlichen EKG auf, die den Vergleich von EKGs der beiden Spezies erschweren (Kaese and Verheule, 2012).

Abb. 3 zeigt einen typischen EKG-Komplex eines Maus-EKGs neben dem eines menschlichen EKGs. Zwischen verschiedenen Maus-Stämmen bestehen beträchtliche Unterschiede hinsichtlich der elektrokardiographischen Baseline-Parameter. Daher ist ein homogener genetischer Background wichtig, um die Rolle modifizierter Gene zu untersuchen. Mäuse haben eine Ruheherzfrequenz von 550 bis 725 Schlägen pro Minute, korrespondierend mit einer Sinus-Zykluslänge von 80-110 ms (Kaese and Verheule, 2012). Die maximale murine Herzfrequenz beträgt 725-815 Schläge pro Minute und wird durch die maximale *Crossbridge*-Frequenz der kontraktiven Filamente Aktin und Myosin (1000 bpm) limitiert (Kaese et al., 2013). Aus diesem Grund kann bei Mäusen, die ihre Herzfrequenz nur um etwa 30-40%

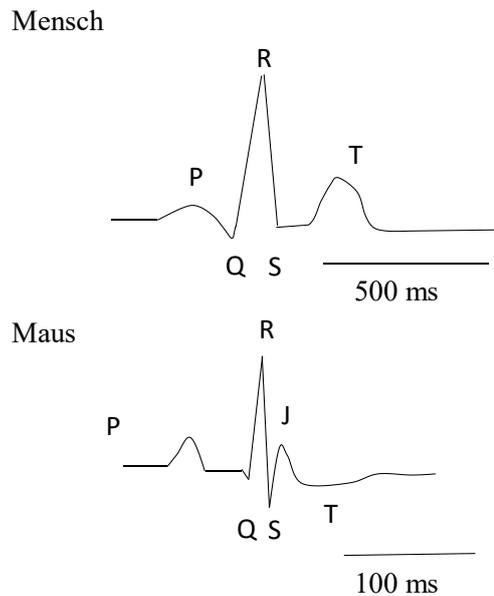
steigern können, im Vergleich zu Menschen, bei denen eine Steigerung um ca. 300% möglich ist, eine Steigerung der Herzfrequenz nur in geringerem Maße zu einem erhöhten kardialen Auswurf beitragen (Kaese and Verheule, 2012).

Isofluran hat komplexe Effekte auf einige kardiale Ionenkanäle. In den Experimenten von Speerschneider et al. ist unter Anästhesie mit 1,5% Isofluran die Herzfrequenz von Mäusen signifikant verlangsamt und die QT-Intervalle signifikant verlängert (Speerschneider and Thomsen, 2013). Dies muss bei der Auswertung von Oberflächen-EKGs im Rahmen dieser Arbeit berücksichtigt werden, für deren Aufzeichnung eine Narkose erforderlich war, welche mit Isofluran durchgeführt wurde.

Die P-Welle der Maus repräsentiert die atriale Depolarisation und hat eine ähnliche Morphologie wie die P-Welle des Menschen (Boukens et al., 2014). Das darauf folgende isoelektrische PQ-Intervall spiegelt die Impulsleitung von den Vorhöfen über den AV-Knoten und das His-Purkinje-System zu den Ventrikeln wieder und hat eine Referenzdauer von 30-56 ms (Kaese et al., 2013; Kaese and Verheule, 2012). Der QRS-Komplex repräsentiert die Depolarisation der Ventrikel und hat eine Dauer von 9-30 ms (Kaese and Verheule, 2012). Die Unterschiede zwischen Mensch und Maus hinsichtlich der Form des ventrikulären Aktionspotentials haben Konsequenzen für die Morphologie des Oberflächen-EKGs. Der auffälligste Unterschied zwischen den EKGs von Mensch und Maus sind das Vorhandensein einer J-Welle und das Fehlen eines isoelektrischen ST-Segments im Maus-EKG. Häufig wird der Schnittpunkt der S-Zacke mit der isoelektrischen Linie als Kriterium für das Ende des QRS-Komplexes genutzt. Dieser Schnittpunkt markiert auch den Beginn der J-Welle, die beim Übergang in die negative T-Welle endet. Die J-Welle repräsentiert die frühe Repolarisation und sollte daher nicht zum QRS-Komplex gezählt werden. Der murine QRS-Komplex endet bei verlangsamer ventrikulärer Leitung vor der vollständigen ventrikulären Aktivierung, was zum Teil durch Effekte früher Repolarisation bedingt ist. In einem solchen Szenario bewertet der QRS-Komplex die ventrikuläre Aktivierungszeit unter und ist kein akkurates Maß der ventrikulären Leitungsgeschwindigkeit (Boukens et al., 2014). Die T-Welle repräsentiert die Repolarisation (Boukens et al., 2014). Aufgrund der triangulären Form des murinen ventrikulären Aktionspotentials mit gradueller Repolarisation und ohne klare Plateauphase gibt es keinen eindeutigen Beginn der Repolarisation im Mausventrikel. Dies resultiert in einer oft schlecht sichtbaren T-Welle mit geringer Amplitude (Boukens et al., 2014; Kaese and Verheule, 2012). Das Fehlen einer klaren T-Welle behindert die Untersuchung der ventrikulären Repolarisation im murinen Oberflächen-EKG (Kaese and Verheule, 2012).

Kardiale Veränderungen, z.B. nach Interventionen wie TAC (transversale Aortenkonstriktion, entspricht Druckbelastung), können zu Veränderungen im Maus-EKG führen. Speerschneider und Thomsen beobachteten nach der Induktion einer Herzinsuffizienz bei Mäusen durch TAC signifikante Steigerungen der Herzfrequenz, QRS- und QT-Dauer sowie ein komplett negatives JT-Segment ohne klare Trennung

der J- und T-Wellen im Oberflächen-EKG (Speerschnieder and Thomsen, 2013).



**Abb. 3: Schematische Darstellung von EKG-Komplexen von Mensch und Maus**

Ableitung 2 nach Eindhoven. Auffällig ist die J-Welle im Maus-EKG, die eine frühe Repolarisation repräsentiert (modifiziert nach Boukens et al., 2014).

### **1.10.3 Einfluss von AKT auf Connexin43 in kardialen Gap junctions der Maus**

Die koordinierte Kontraktion des Herzens erfordert die elektrische und mechanische Kopplung der Kardiomyozyten. Die elektrische Kopplung wird vor allem durch die *Gap junctions* erreicht, spezialisierten Strukturen an den als Glanzstreifen bezeichneten Enden der Myozyten. Die *Gap Junctions* in Vertebraten sind aus Proteinen der Connexin-Genfamilie zusammengesetzt und erlauben die Passage von Ionen, Aminosäuren, Nukleotiden, Metaboliten und Second Messengern zwischen Zellen, während Makromoleküle nicht passieren können. Die Glanzstreifen beinhalten zudem Desmosomen und Adhärenz Junctions, die für mechanische Stabilität sorgen (Solan and Lampe, 2014).

Connexin43 ist das am weitesten verbreitete und am stärksten exprimierte Gap Junction Protein (Solan and Lampe, 2014). Es ist das prädominante ventrikuläre *Gap Junction* Protein und ist kritisch für die Aufrechterhaltung normaler kardialer elektrischer Leitung. Das Fehlen von Connexin43 in Mäuseherzen resultiert in plötzlichem arrhythmischen Tod (Danik et al., 2004).

Neben der Bereitstellung interzellulärer Kanäle interagiert Connexin43 mit vielen Signal- und Strukturmolekülen.

*Gap Junctions* sind dynamische Strukturen, die ständig umgebaut werden. Connexin43 hat eine Halbwertszeit von nur 3h (Solan and Lampe, 2014). Die *Gap Junction*-Dynamik und die Fähigkeit von Connexin43 zur Interaktion mit verschiedenen Proteinen scheinen durch Veränderungen der Connexin43-Phosphorylierung koordiniert zu werden. Connexin43 wird von einer Vielzahl von Kinasen

phosphoryliert, wie AKT, PKA, PKC, ERK1/2 und src. Immunoblots haben gezeigt, dass im Herzen normalerweise das gesamte Connexin43 phosphoryliert ist. Ischämie fördert die Dephosphorylierung von Connexin43, und dies führt zu Veränderungen der kardiomyozytären Kopplung (Solan and Lampe, 2014).

Dunn et. al beobachteten, dass die AKT-Aktivität die Stabilität von *Gap Junctions* kontrolliert und notwendig für die Bildung großer, stabiler *Gap Junctions* ist. AKT-Aktivierung führt zur Phosphorylierung von Connexin43 (Dunn et al., 2012).

Die AKT-vermittelte Phosphorylierung von Connexin43 an S373 führt zu einer Steigerung der Größe der *Gap junctions* und inhibiert die Connexin43-ZO-1 Interaktion. Die Interaktion von ZO-1 mit Connexin43 reguliert die Größe der *Gap Junctions* negativ, und AKT scheint die *Gap-Junction*-Größe durch S373-Phosphorylierung, die zur Hemmung dieser Interaktion führt, zu kontrollieren. Direkte Inhibition von AKT führt zum Verlust von *Gap junctions* (Solan and Lampe, 2014).

### **1.11 Phänotyp des iCM-AKT1/2-, des iCM-AKT1- und des iCM-AKT2-KO**

Um die Bedeutung der Proteinkinase AKT für verschiedene Aspekte kardialer Funktion und Pathologie zu untersuchen, wurden im Labor für Herz- und Kreislaufphysiologie Mäuse mit induzierbarem kardiomyozytenspezifischem AKT1/2-Doppel-KO erzeugt. Zudem wurden Mäuse mit iCM-AKT1- und iCM-AKT2-Einzel-KO verwendet. Der wissenschaftliche Hintergrund der Erzeugung des iCM-AKT-KOs wird im Abschnitt „Material& Methoden“ ausführlich beschrieben.

Der Phänotyp dieser Mäuse wurde bereits auf vielen Ebenen untersucht. Die bestehenden Erkenntnisse sollen hier kurz zusammengefasst werden:

Der zeitlich regulierbare, kardiomyozytenspezifische AKT-KO wurde durch Injektion von 4-OH-Tamoxifen an 5 aufeinanderfolgenden Tagen bei männlichen Tieren im Alter von 12 Wochen induziert. Nach 5d der 4OH-Tamoxifen-Applikation war die kardiale Proteinmenge von AKT1 auf 15% und von AKT2 auf 12% der Proteinmenge im WT reduziert. Die Restexpression ging vermutlich auf AKT1/AKT2 in nicht-Kardiomyozyten zurück.

Bei den iCM-AKT1/2-KO Mäusen kam es nach Induktion des Knockouts zu einer zunehmenden Herzinsuffizienz und Herztrophie. Im Durchschnitt starben die Tiere an d24,4 nach der ersten 4OH-Tamoxifen-Injektion und 28d nach dieser waren alle Tiere mit iCM-AKT1/2-KO verstorben.

An d7 nach der ersten 4OH-Tamoxifen-Injektion gab es noch keine deutlichen phänotypischen Veränderungen.

Ab d14 nach der ersten 4OH-Tamoxifen-Injektion zeigten echokardiographische Untersuchungen eine fortschreitende Abnahme der Herzfunktion. Es wurde unter anderem eine Zunahme des endsystolischen Volumens bei relativ konstantem enddiastolischem Volumen sowie eine Abnahme von Ejektionsfraktion, Cardiac output und Schlagvolumen gemessen. Druckmessungen zeigten einen verminderten maximalen und minimalen Aortendruck sowie einen reduzierten maximalen linksventrikulären Druck.

Zudem wurde ab d14 echokardiographisch eine Atrophie des linken Ventrikels mit reduzierter Ventrikeldicke sowie Abnahme der linksventrikulären Masse und des Verhältnisses von Herzgewicht zu

Körpergewicht gemessen. Die an isolierten Kardiomyozyten gemessene Kardiomyozytengröße war an d14 im iCM-AKT1/2-KO reduziert. Nach d10 gab es Hinweise auf Einschränkungen der Proteinbiosynthese (Translationsrate), sowie auf verstärkte Autophagie, die später inhibiert wird.

MRI-Untersuchungen des PCr/ATP-Verhältnisses wiesen auf eine fortschreitende energetische Verarmung der Herzen nach iCM-AKT1/2-KO hin. Die ab d10 nach Beginn der 4OH-Tamoxifen-Injektion messbare Zunahme freien Kreatins war ab d14 deutlich ausgeprägt. An d20 lag eine ausgeprägte energetische Verarmung vor.

Microarrayanalysen zeigten, dass es in den iCM-AKT1/2-KO-Herzen zu weitreichenden Veränderungen im Transkriptom kommt.

Nach iCM-AKT1 und iCM-AKT2-Einzel-KO war die Lebensdauer der Mäuse nicht reduziert und es lag keine Einschränkung der Herzfunktion vor. Zudem traten an d21 nach der ersten 4OH-Tamoxifen-Injektion nur geringe Transkriptionsveränderungen in Microarrayuntersuchungen auf.

Insgesamt legen die Messungen die Vermutung nahe, dass es infolge fortgeschrittener Einschränkungen der Energetik bei kombinierter AKT1/2-Defizienz zur Verschiebung der Balance von Proteinbiosynthese und -Abbau mit fortschreitender Atrophie kommt, die zum Pumpversagen führt (Gödecke et. al in Vorbereitung).

## **1.12 Ziele der Arbeit**

Ziel der Arbeit war es zu untersuchen, welche Veränderungen der AKT-abhängigen intrazellulären Signaltransduktion zum frühen Zeitpunkt, also schon vor den phänotypischen Veränderungen auftreten, um frühe, möglicherweise für die Entwicklung des Phänotyps ursächliche Effekte des iCM-AKT-KOs zu identifizieren. Dafür sollte die insulinstimulierte Phosphorylierung von Proteinen, die in direktem oder indirektem Zusammenhang mit der AKT-Signaltransduktion stehen betrachtet werden. Dazu wurden Herzen an d7 nach Beginn der 4OH-Tamoxifen-Injektion von iCM-AKT1/2- sowie von iCM-AKT1- und iCM-AKT2-KO untersucht. Der Fokus wurde auf die für zelluläres Wachstum und Metabolismus bedeutenden, AKT-abhängigen mTORC1- und GSK3 $\beta$ -Signalwege gelegt. Durch Vergleich von iCM-AKT1/2-KO-, iCM-AKT1-KO- und iCM-AKT2-KO-Herzen sollten beobachtete Veränderungen im Hinblick auf Isoformspezifität und auf Relevanz für die Entstehung des Phänotyps untersucht werden. Um die Bedeutung von IGF1 und Insulin für die AKT-abhängige Signaltransduktion in Kardiomyozyten zu analysieren, wurde die Phosphorylierung einiger Proteine der AKT-Signaltransduktion in isolierten, nach Langendorff perfundierten Herzen nach IGF1- und Insulin-Stimulation untersucht.

Das zweite Ziel der Arbeit war es, die kardialen GLUT1- und GLUT4-Transporter auf mRNA- und Proteinebene in WT- und iCM-AKT1/2-KO-Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion des KOs zu vergleichen, da eine Beeinträchtigung der AKT-vermittelten GLUT4-Translokation eine KO-bedingte verminderte Glukoseaufnahme bewirken und so zur beobachteten energetischen Depletion der Herzen führen könnte. Hierfür wurden von Frau Dr. S. Gödecke zur Verfügung gestellte mRNA-Microarrayanalysen des Transkriptoms von WT- und iCM-AKT1/2-KO-Mäusen hinsichtlich der Expression kardialer Glukosetransporter untersucht. Die kardiale GLUT-Proteinmenge wurde mittels

Western Blot untersucht. Es sollte überprüft werden, ob es Hinweise auf eine mögliche Kompensation durch vermehrten basalen Glukosetransport über GLUT1 gibt und inwiefern die GLUT4-Expression verändert ist (vgl. Abschnitt 1.9).

Das dritte Ziel der Arbeit war es, im EKG den Einfluss von AKT und des iCM-AKT1/2-KOs auf die kardiale Erregungsleitung zu untersuchen. Wie im Abschnitt 1.10.3 beschrieben, reguliert AKT durch Phosphorylierung von Connexin43 die Stabilität und Größe von *Gap Junctions*. In dieser Arbeit sollte darauf aufbauend untersucht werden, ob Insulinstimulation durch AKT-Aktivierung zu Veränderungen des EKGs von WT-Mäusen führt. Um den Einfluss des iCM-AKT1/2-KOs auf die Erregungsleitung zu untersuchen, sollten zudem zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn der KO-Induktion aufgezeichnete Oberflächen-EKGs von iCM-AKT1/2-KO- und WT-Mäusen vergleichend ausgewertet werden. Ergänzend sollten von Frau Dr. S. Gödecke zur Verfügung gestellte mRNA-Microarrayanalysen des Transkriptoms von WT- und iCM-AKT1/2-KO-Mäusen im Hinblick auf veränderte Expression kardialer Ionenkanäle untersucht werden.

## 2. Material & Methoden

### 2.1 Tierversuchsgenehmigung

Aktenzeichen des LANUV: 84-02.04.2014.A308

Antragsteller: Prof. Dr. Axel Gödecke

Datum: 17.03.2015

Organisationsnummer des ZETT für Organentnahmen: O16/04

### 2.2 Geräte/ Materialien

<b>Gerät und Bezeichnung (Typ):</b>	<b>Hersteller:</b>	<b>Ort:</b>
Blotpapier, Whatman gel blotting paper, Grade GB003	Whatman plc	Little Chalfont, Buckinghamshire, Vereinigtes Königreich
Dispergiergerät Ultraturrax IKA T18 basic	IKA-Works	Wilmington, North Carolina, USA (Hauptsitz Staufen, Deutschland)
Eismaschine	Ziegra Eismaschinen GmbH	Isernhagen, Deutschland
Gefrierschrank, -80 Grad Celsius,	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts, USA
Gefrierschrank, -20 Grad Celsius, Liebherr Premium NoFrost	Liebherr	Bulle, Schweiz
Gel Imaging System, Molecular Imager GelDoc XR+ System	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, California, USA
Gelkammer, Mini Protean 3 Cell Gelelectrophoresis System	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, California, USA
Gelkammer, Mini Protean Tetra Cell Gelelektrophoresis System	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, California, USA
Gelkammer, SE600 standard vertical protein electrophoresis unit	Hoefler, Inc.	Holliston, MA, USA
Glasplatten (Western Blot), 1mm-Mini Protean Short Plates	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, California, USA
Glasplatten, SE 6402 Glass Plates	Hoefler, Inc.	Holliston, MA, USA
Hamilton Microliter Syringe, Pipetten	Hamilton Company	Reno, Nevada, USA
Infrarot-Fluoreszenz-Bildgebungssystem, Odyssey 9120	LI-COR, Inc.	Lincoln, NE, USA
Inkubationsschüttler, Thermomixer comfort	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Inkubator, Typ B6120	Heraeus Instruments	Hanau, Deutschland
Kühlschrank, 4 Grad Celsius, Liebherr ProfiLine	Liebherr	Bulle, Schweiz
Magnetrührer RH basic	IKA	Staufen, Deutschland
Magnetrührer RCT basic	IKA	Staufen, Deutschland
Mini Wipptisch, Mini Rocking Plattform Typ WT14	Biometra GmbH	Göttingen, Deutschland
Niederspannungsnetzgerät, Standard PowerPack P25	Biometra GmbH	Göttingen, Deutschland
Niederspannungsnetzgerät, Power Supply 608	Fisherbrand, Thermo-Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts, USA
Nitrozellulosemembran, Amersham protran 0,45um NC	GE Healthcare Life Sciences	Chicago, Illinois, USA
Plattenphotometer, SpectraCount	Packard Instrument Company	Meriden, Connecticut, USA

Präzisionswaage Kern PCB 1000-2	Kern& Sohn GmbH	Balingen, Deutschland
Software Plattenphotometer, Packard Plate Reader Version3.0	PerkinElmer	Waltham, Massachusetts, USA
Vortexer Reax top	Heidolph Instruments GmbH & Co KG	Schwabach, Deutschland
Western Blotting Gerät, Pierce G2 Fast Blotter	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts, USA
Zentrifuge 5415R	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland

### **2.3 Verwendete Chemikalien**

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ort</b>	<b>Produktnummer</b>
Aminocapronsäure	SIGMA-Aldrich Co.	St. Louis, Missouri, USA	A2504-100G
APS	Roth	Karlsruhe, Deutschland	95922
Bromphenolblau	Roth	Karlsruhe, Deutschland	A512.1
BSA (Albumin)	Sigma	St. Louis, Missouri, USA	A6003
CaCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA	C3306-250G
D-(+)-Glucose	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA	16301-250G
Ethanol	Roth	Karlsruhe, Deutschland	9065.3
Glycerin	Roth	Karlsruhe, Deutschland	373.1
Glycerol	SIGMA-Aldrich Co.	St. Louis, Missouri, USA	G5516
Glycin	Roth (Carl Roth GmbH & Co KG)	Karlsruhe, Deutschland	3908.3
HCl (25%)	Merck	Burlington, Massachusetts, USA	100316
HCl (25%)	Roth	Karlsruhe, Deutschland	6331
Igepal	Sigma	St. Louis, Missouri, USA	i3021
KCl	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA	P5405-250G
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA	P5655-100G
MgSO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA	M1880-500G
NaCl	VWR	Radnor, Pennsylvania, USA	27.810.364
NaCl	Sigma	St. Louis, Missouri, USA	S5886
NaHCO <sub>3</sub>	Roth	Karlsruhe, Deutschland	8551.1
n-Butanol	Roth	Karlsruhe, Deutschland	7724.1
rac-Glycerol-1-phosphat disodium salt hydrate	Sigma	St. Louis, Missouri, USA	G2138

SDS	SERVA Electrophoresis GmbH	Heidelberg, Deutschland	20765.03
TEMED	Roth	Karlsruhe, Deutschland	2367
Tricin	Sigma	St. Louis, Missouri, USA	T0377
Tris	Roth (Carl Roth GmbH & Co KG)	Karlsruhe, Deutschland	AE15.3
Tween20, Detergenz	Sigma	St. Louis, Missouri, USA	9005-64-5
Acrylamid	Fluka (Sigma - Aldrich Co)	St. Louis, Missouri, USA	01700

## **2.4 Kits/ Reagenzien**

<b>Kit/ Reagenz:</b>	<b>Hersteller:</b>	<b>Ort:</b>	<b>Produktnummer:</b>
Halt Protease und Phosphatase Inhibitor	ThermoFisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA	78443
Insulin human, Insuman Rapid 40 I.E./ml Injektionslösung	Sanofi-Aventis	Paris, Frankreich	1843315
Human IGF-1	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach	130-093-887
Odyssey Blocking Buffer (TBS)	LI-COR, Inc.	Lincoln, NE, USA	927 50 000
PageRuler vorgefärbte Proteinleiter (10-180 kDa)	ThermoFisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts, USA	26616
PageRuler Plus vorgefärbte Proteinleiter (10-250 kDa)	ThermoFisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts, USA	26619
Pierce BCA Protein-Assay	ThermoFisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts, USA	23227
TGX Stain-Free Fast-Cast Acrylamide Kit 10%	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, California, USA	161-0183
TGX Stain-Free Fast-Cast Acrylamide Kit 7,5%	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, California, USA	161-0181
4-Hydroxytamoxifen	Sigma	St. Louis, Missouri, USA	6278

## **2.5 Puffer**

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung/ Rezept</b>
Anodenpuffer	300 mM Tris 100 mM Tricin pH 8,8
Kathodenpuffer	300 mM Aminocaprinsäure 30 mM Tris pH 8,7
Krebs-Henseleit-Puffer (Lisa)	118 mM NaCl 4,7 mM KCl

	1,2 mM MgSO <sub>4</sub> 1,25 mM CaCl <sub>2</sub> 1,2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 25 mM NaHCO <sub>3</sub> D-(+)-Glucose
Lämmli 4-fach	4-fach: 250 mM Tris-HCl, pH 6,8 8% (w/v) SDS 20% (v/v) Glycerol 50 mmol/l DTT 0,1 mg/ ml Bromphenolblau
Laufpuffer	25 mM Tris 250 mM Glycin, pH 8,3 0,1% (w/v) SDS
Lysispuffer	10mM Tris pH7,4 100mM NaCl 1% Igepal 1:100 Halt Protease und Phosphatase Inhibitor (kurz vor Verwendung zugegeben)
PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
TBS	150 mM NaCl 20 mM Tris pH 7,6
TBS Tween	TBS Tween20 0,1%

## 2.6 Western Blot Gele

<b>Geltyp</b>	<b>Rezept kleines Gel</b>	<b>Rezept großes Gel</b>
Sammelgel	1,85ml ddH <sub>2</sub> O 312,5µl 40% Acrylamid 312,5µl 1M Tris pH 6,8 25µl 10%SDS 5µl TEMED 7,5µl 10% APS	5,55ml ddH <sub>2</sub> O 937,5µl 40% Acrylamid 937,5µl 1M Tris pH 6,8 75µl 10% SDS 15µl TEMED 22,5µl 10% APS
Trenngel 7,5% TGX (MW nachzuweisendes Protein: 50-200 kD)	3ml FastCast Resolver A 3ml 7,5% TGX Stainfree Fast-Cast Resolver B 30µl 10% APS 3µl TEMED	6ml FastCast Resolver A 6ml 7,5% TGX Stainfree FastCast Resolver B 60µl 10% APS 6µl TEMED
Trenngel 10% TGX (MW nachzuweisendes Protein: 30-120 kD)	3ml FastCast Resolver A 3ml 10% Stainfree FastCast Resolver B 30µl 10% APS 3µl TEMED	6ml FastCast Resolver A 6ml 10% Stainfree FastCast Resolver B 60µl 10% APS 6µl TEMED
Trenngel 15% (MW nachzuweisendes Protein: 10-60 kD)	1,875ml ddH <sub>2</sub> O 1,875ml 40% Acrylamid 1,25ml 1,5M Tris pH 8,8 50µl 10% SDS	3,75ml ddH <sub>2</sub> O 3,75ml 40% Acrylamid 2,5ml 1,5 M Tris pH 8,8 100µl 10% SDS

	10µl TEMED 12,5µl 10% APS	20µl TEMED 25µl 10% APS
--	------------------------------	----------------------------

## **2.7 Antikörper**

### **2.7.1 Primäre Antikörper**

<b>Antikörper, Herkunft</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ort</b>	<b>Produktnummer</b>	<b>Verdünnung</b>
AKT1, Maus	Cell Signaling Technology	Danvers, Massachusetts, USA	2967	1:1000
AKT2, Kaninchen	Cell Signaling Technology	Danvers, Massachusetts, USA	3063	1:1000
AKT (pan), Maus	Cell Signaling Technology	Danvers, Massachusetts, USA	2920	1:2000
AMPK $\alpha$ , Maus	Cell Signaling Technology	Danvers, Massachusetts, USA	2793	1:1000
GLUT1, Kaninchen	Abcam	Cambridge, Vereinigtes Königreich	652	1:500
GLUT4, Kaninchen	Abcam	Cambridge, Vereinigtes Königreich	654	1:2000
GLUT4, Maus	Cell Signaling Technology	Danvers, Massachusetts, USA	2213	1:1000
GSK-3 $\beta$ , Kaninchen	Cell Signaling Technology	Danvers, Massachusetts, USA	9315	1:1000
mTOR, Kaninchen	Cell Signaling Technology	Danvers, Massachusetts, USA	2983	1:1000
Phospho-AKT (Thr308), Kaninchen	Cell Signaling Technology	Danvers, Massachusetts, USA	4056	1:1000
Phospho-AMPK $\alpha$ (Thr172), Kaninchen	Cell Signaling Technology	Danvers, Massachusetts, USA	2535	1:1000
Phospho-Glykogen Synthase (Ser641), Kaninchen	Cell Signaling Technology	Danvers, Massachusetts, USA	3891	1:1000
Phospho-GSK-3 $\beta$ , Maus	Cell Signaling Technology	Danvers, Massachusetts, USA	14630	1:1000
Phospho-IGF-1 Rezeptor $\beta$ (Tyr1131) /Insulin Rezeptor $\beta$ (Tyr1146), Kaninchen	Cell Signaling Technology	Danvers, Massachusetts, USA	3021	1:500

Phospho-mTOR (Ser2481), Kaninchen	Cell Signaling Technology	Danvers, Massachusetts, USA	2974	1:1000
Phospho-mTOR (Ser2448), Kaninchen	Cell Signaling Technology	Danvers, Massachusetts, USA	5536	1:1000
Phospho-PRAS40 (Thr246), Kaninchen	Cell Signaling Technology	Danvers, Massachusetts, USA	2997	1:1000
Phospho-PTEN (Ser380), Kaninchen	Cell Signaling Technology	Danvers, Massachusetts, USA	9551	1:1000
Phospho-p70 S6 Kinase (Thr389), Kaninchen	Cell Signaling Technology	Danvers, Massachusetts, USA	9234	1:1000
Phospho-S6 Ribosomales Protein (Ser235/236), Kaninchen	Cell Signaling Technology	Danvers, Massachusetts, USA	4858	1:1000
Phospho-4E-BP1 (Thr37/46), Kaninchen	Cell Signaling Technology	Danvers, Massachusetts, USA	2855	1:1000
PRAS40, Kaninchen	Cell Signaling Technology	Danvers, Massachusetts, USA	2691	1:1000

### **2.7.2 Sekundäre Antikörper**

<b>Antikörper, Herkunft</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ort</b>	<b>Produktnummer</b>	<b>Verdünnung</b>
IRDeye 680CW (RD?) Goat anti-Mouse IgG sekundärer Antikörper	LI-COR Biosciences	Lincoln, Nebraska, USA	926-68070	1:10000
IRDeye 800CW Goat anti-Rabbit IgG sekundärer Antikörper	LI-COR Biosciences	Lincoln, Nebraska, USA	926-32211	1:10000

### **2.8 Transgenes Mausmodell**

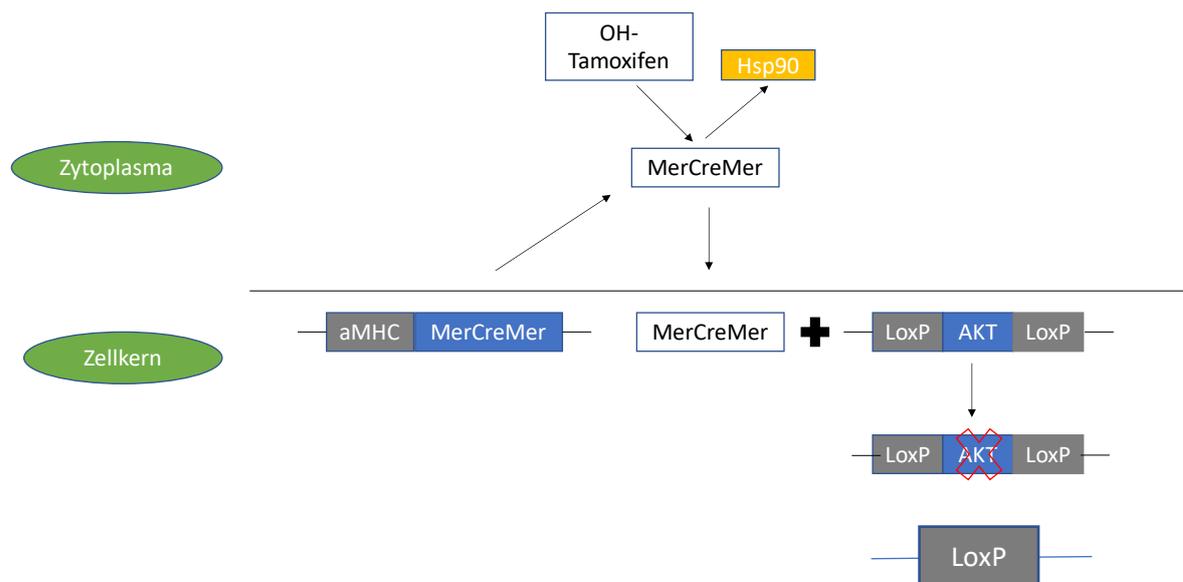
Für die durchgeführten Experimente wurden Mäuse mit induzierbarem kardiomyozytenspezifischem AKT-1/2-Doppel-KO (iCM-AKT1/2-KO), sowie Mäuse mit induzierbarem kardiomyozytenspezifischem AKT1- bzw. AKT2- Einzel-KO (iCM AKT1-KO, iCM-AKT2-KO) verwendet. Tierversuche wurden mit Genehmigung durchgeführt und es bestand freier Zugang zu Futter und Wasser (Aktenzeichen des LANUV: 84-02.04.2014.A308; Organisationsnummer des ZETT für Organentnahmen: O16/04).

Zur Deletion der Gene für AKT 1 und/oder AKT2 diente das Cre-LoxP-System. Durch das aus dem Bakteriophagen P1 stammende System können gezielt DNA-Sequenzen, die von zwei LoxP-Sites (LoxP für *locus of crossing over*) flankiert sind, mittels des Cre-Enzyms (Cre für *causes recombination*) durch Rekombination inaktiviert werden (Hoess et al., 1982; Sternberg and Hamilton, 1981).

Die Aktivität von Proteinen kann durch Verknüpfung mit Hormonbindungsdomänen von Steroidrezeptoren funktionell hormonabhängig gemacht werden (Littlewood et al., 1995). Die entstehenden Fusionsproteine sind in Abwesenheit des Liganden an HeatShock Proteine wie Hsp90 gebunden und dadurch inaktiviert. Durch Bindung des Liganden werden die Proteine aus den inhibitorischen Komplexen freigesetzt (Littlewood et al., 1995). Die an der Aminosäure 525 mutierte Hormonbindungsdomäne des murinen Östrogenrezeptors MOR G525R hat eine sehr geringe Affinität zu Östrogen, bindet aber mit hoher Affinität das synthetische Analogon 4-Hydroxy-Tamoxifen (Littlewood et al., 1995).

Wird das Cre-Enzym C- und N-Terminal mit der mutierten Hormonbindungsdomäne des Östrogenrezeptors (Mer) fusioniert (MerCreMer), kann die Cre-vermittelte Rekombination von LoxP-flankierten Genen von der Applikation des Liganden Tamoxifen oder 4OH-Tamoxifen abhängig gemacht werden, da erst nach Tamoxifen-Gabe das Cre-Fusionsprotein in den Kern translozieren kann (Zhang et al., 1996). Die Verwendung eines gewebespezifischen Promotors vor der MerCreMer cDNA ermöglicht, dass das induzierbare Fusionsprotein gewebespezifisch exprimiert wird (Zhang et al., 1996). Wird das MerCreMer Fusionsprotein unter die transkriptionelle Kontrolle des herzspezifischen  $\alpha$ MHC ( $\alpha$  myosin heavy chain)-Promotors gebracht, kann die Rekombination in vivo spezifisch in postnatalen Kardiomyozyten und zeitlich reguliert umgesetzt werden (Sohal et al., 2001).

Homozygote transgene Mäuse mit LoxP-flankierten Elementen der ATP-Bindestellen der AKT-Gene wurden mit  $\alpha$ MHCMerCreMer-Mäusen verpaart, um Tiere mit zeitlich regulierbarem, kardiomyozytenspezifischem KO zu erzeugen (S. Gödecke et al in Vorbereitung). Abbildung 4 veranschaulicht die Induktion des kardiomyozytenspezifischen, Cre-LoxP vermittelten AKT-Knockouts durch OH-Tamoxifen-Injektion. Zur Induktion des kardiomyozytenspezifischen Knockouts wurde männlichen Tieren jeweils 100  $\mu$ l 4OH-Txf gelöst in Erdnussöl (0,5mg/ 100 $\mu$ l) an 5 aufeinanderfolgenden Tagen im Alter von 12 Wochen intraperitoneal injiziert.



**Abb. 4: Schematische Darstellung des kardiomyozytenspezifischen, Cre-LoxP vermittelten AKT-Knockouts**

## **2.9 Insulinstimulation und Organentnahme**

### **2.9.1 Intraperitoneale Stimulation**

Für die Untersuchung verschiedener Effekte des iCM-AKT1/2-KOs wurden Mäuse intraperitoneal mit Insulin stimuliert. Wie in der Einleitung beschrieben, kommt es durch Insulinstimulation zur Phosphorylierung und Aktivierung von AKT in insulinsensitivem Gewebe. Gleichzeitig wurde zur Kontrolle einigen Tieren nur das Lösungsmittel PBS injiziert (basal).

Den Mäusen wurde, um eine nahrungsinduzierte endogene Insulinstimulation zu vermeiden, 4 Stunden vor Organentnahme das Futter entzogen. Es wurde mit PBS 1:100 verdünntes Insulin (*Konzentration Insulin unverdünnt: 40 I.E./ml*) körperrgewichtsadaptiert nach folgender Formel intraperitoneal injiziert:

Körpergewicht (g) / 0,139 = Insulindosis ( $\mu$ l); Insulin 1:100 vorverdünnt

Das entspricht einer Insulindosierung von 3 I.E./ kg Körpergewicht (0,1  $\mu$ g/g). Den Kontrolltieren („unstimuliert“/ „basal“) wurde nach gleicher Berechnung intraperitoneal PBS injiziert.

### **2.9.2 Organentnahme**

15 Minuten nach intraperitonealer Stimulation wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die Herzen (unter Abtrennung der Vorhöfe und der Ventilebene) entnommen.

Unmittelbar nach Entnahme wurden die Organe in PBS zur weitgehenden Entfernung von Blut „gewaschen“. Anschließend wurden sie in Flüssigstickstoff eingefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Aufbereitung gelagert.

### **2.9.3 Kardiale Perfusion mit Insulin und IGF1 nach Langendorff**

Die isolierte kardiale Perfusion nach Langendorff bietet die Möglichkeit, das Herz isoliert von anderen Organsystemen und exokriner Kontrolle zu untersuchen (Bell et al., 2011). Sie ist zudem ein geeignetes Mittel, um ungewollte Blutzellen und Proteine aus einem explantierten Herz vor dem Einfrieren zu entfernen (Bell et al., 2011). Die Aorta wird nach Entnahme des Organs cannuliert und retrograd perfundiert (Bell et al., 2011). Die Flüssigkeit fließt mit konstanter Flussrate oder konstantem hydrostatischem Druck (60-100 mmHg) retrograd entlang der Aorta (Sutherland and Hearse, 2000). Dadurch schließt die Aortenklappe, die Flüssigkeit perfundiert über die Koronarostien die gesamte ventrikuläre Masse und drainiert durch den Sinus Coronarius in den rechten Vorhof (Sutherland and Hearse, 2000). Somit fließt bei dieser Perfusion keine Flüssigkeit durch die Ventrikel. Der gebräuchlichste als Perfusat verwendete Bicarbonat-Puffer ist der Krebs-Henseleit-Puffer (Bell et al., 2011).

Um den Effekt des iCM-AKT1/2-KOs auf die stimulierte Phosphorylierung kardialer Proteine unabhängig von regulatorischen Faktoren und anderen Organsystemen zu untersuchen, wurden nach Langendorff perfundierte Herzen mit Insulin oder IGF1 stimuliert.

Nach Tötung einer Maus wurde das Herz zügig entnommen und ein mit einer stumpfen Kanüle

verbundener Ballon über die Mitralklappe in den linken Ventrikel eingebracht und dort fixiert. Die Verbindung des Ballons mit einem Druck-Transducer ermöglichte die kontinuierliche Messung des linksventrikulären Drucks. Anschließend wurde die eröffnete Aortenwurzel über eine stumpfe 21-G Kannüle gestülpt und fixiert. Das kannülierte Herz wurde im Perfusionsapparat fixiert und kontinuierlich mit oxygeniertem (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) Krebs-Henseleit-Puffer retrograd perfundiert. Dabei wurde die Temperatur mit Hilfe eines wassertemperierten Glasmantels bei 37°C konstant gehalten. Für die Insulinstimulation wurden die Herzen mit konstantem Druck von 80 mmHg perfundiert. Dabei wurde zunächst 20 Minuten zur Äquilibration (hier noch hoher Fluss, noch häufig Arrhythmien) und anschließend noch einmal 30 Minuten mit oxygeniertem Krebs-Henseleit-Puffer perfundiert. Darauf folgte eine 10-minütige Insulinstimulation, bei der Insulin in einer Endkonzentration von 6 nM per Spritze dem Krebs-Henseleit-Puffer zugegeben wurde. Bei den Experimenten mit IGF1- anstelle von Insulinstimulation erfolgte die Stimulation nach gleichem Muster mit einer IGF1-Endkonzentration von 15 nM. Nach der Stimulation wurden die Herzen sofort in Flüssigstickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

## **2.10 Untersuchung der Proteinphosphorylierung im Western Blot**

### **2.10.1 Proteinaufbereitung aus Gewebe**

Zur Aufbereitung der verwendeten Organe wurden diese, entweder unmittelbar nach der Organentnahme oder im eingefrorenen Zustand lysiert. Ein halbes Herz wurde jeweils in einem Rundbodenröhrchen mit 700µl Lysispuffer, dem kurz vor Gebrauch „Halt Protease/ Phosphatase Inhibitor“ im Verhältnis 1:100 zugegeben wurde (7µl), für ca. 20s mit Hilfe des Ultraturrax zerkleinert. Das so gewonnene Lysat wurde in einem 1,5ml-Eppendorf-Röhrchen für 5-10 Minuten (8 Minuten) bei 13000rpm/16000g und 4 Grad °C (Zentrifuge 5415R) zentrifugiert. Anschließend wurde der flüssige Überstand in ein neues 1,5ml Eppendorf-Röhrchen überführt und für die Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Assay verwendet.

### **2.10.2 BCA-Assay**

Smith et al beschrieben 1985 erstmalig, wie mit Hilfe von Bicinchoninsäure die Biuret-Reaktion genutzt werden kann, um die Proteinkonzentration in einer Lösung zu bestimmen. In einem alkalischen System, das Cu<sup>2+</sup> enthält, bilden sich farbige Komplexe zwischen den Kupferionen und den Peptidbindungen vorhandener Proteine aus (Biuret-Reaktion) (Smith et al., 1985). Bicinchoninsäure komplexiert die bei dieser Reaktion entstehenden Cu<sup>1+</sup>-Ionen im Verhältnis 2:1, wobei stabile, violette Chromophore mit einem Absorptionsmaximum bei 562nm entstehen (Smith et al., 1985). Die beobachtete Farbentwicklung steigt in einem breiten Konzentrationsbereich proportional zur Proteinkonzentration an (Smith et al., 1985). Die Proteinkonzentration von Proben kann durch photometrische Messung der Absorptionwerte und Vergleich mit den Absorptionswerten einer Standardreihe ermittelt werden (Smith et al.,

1985). Als Referenzstandard für die BCA-Methode eignet sich BSA (Smith et al., 1985).

Die BCA-Assays wurden unter Verwendung des Pierce BCA-Protein-Assay-Kits der Firma Thermo-Fisher Scientific durchgeführt. Zur Kalibrierung des BCA-Assays wurde neben den zu untersuchenden Proben eine BSA-Standardreihe mit BSA-Konzentrationen von 0,0625-2 mg/ ml in die Felder einer 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Die verwendeten Konzentrationen der BSA-Standardreihe sind: 2, 1,5, 1, 0,75, 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625 mg/ ml. In jedes für die BSA-Standardreihe verwendete Feld wurde 25µl BSA-Standard und 3µl Lysispuffer gegeben. In die Felder zur Probenbestimmung wurden je 25µl ddH<sub>2</sub>O sowie 3µl der Probe pipettiert. Dabei wurde für jede untersuchte Probe eine Dreifachbestimmung durchgeführt, um die Genauigkeit des Verfahrens zu erhöhen. In jedes Well wurden im Anschluss 200µl *BCA Working Reagent*, das Lösung A und Lösung B im Verhältnis 50:1 enthält, pipettiert. Danach wurde die Mikrotiterplatte für 30 Minuten bei 37°C inkubiert (Inkubator, Typ B6120). Nach der Inkubation wurde die Absorption bei 577 nm im Plattenphotometer (Spectra Count) mit Hilfe der Software „Packard Plate Reader Version 3.0“ ausgelesen. Durch die BSA-Standardreihe erhält man eine Standardkurve, anhand derer die Proteinmenge in den Proben bestimmt wird. Für die weitere Verarbeitung der Proben wurde jeweils der Mittelwert aus der Dreifachbestimmung der Proteinkonzentration verwendet.

### **2.10.3 SDS-PAGE**

Bei der diskontinuierlichen Gelelektrophorese mit SDS werden Proteine nach ihrem molekularen Gewicht getrennt (Laemmli, 1970). Das anionische Detergenz SDS bindet Proteine, bewirkt so eine negative Ladung dieser und spaltet nichtkovalente Bindungen, was zu einer Entfaltung der Makromoleküle führt. Disulfidreduzierende Substanzen wie 2-Mercaptoethanol oder Dithiothreitol führen zur weiteren Denaturierung von Proteinen. Proteine, die im Rahmen der SDS-PAGE mit DTT und SDS behandelt wurden, wandern während der Gelelektrophorese mit einer Geschwindigkeit, die umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres molekularen Gewichts ist, zur Anode. Folglich wandern Proteine mit geringerem Molekulargewicht schneller als schwerere Proteine. Bei der SDS-PAGE grenzt das sogenannte Sammelgel an das Trenngel. Im Sammelgel, das einen sauren pH-Wert (6,8) und große Poren besitzt, sammeln sich die Proteine in einer eng begrenzten Zone am Übergang zum Trenngel und treten so zeitgleich in das Trenngel ein. In den kleineren Poren des basischen (pH 8,8) Trenngels werden die Proteine auf Basis ihres molekularen Gewichts aufgetrennt (Garfin, 1990).

Für die SDS-PAGE wurden die Proben mit 4xLämmli-Puffer und Lysis-Puffer auf die gewünschte Konzentration von 1-2 mg/ml eingestellt und anschließend bei 95-99 °C für 5-10 Minuten im Thermomixer comfort erhitzt. Die Proben, die für die Western-Blot Analyse des GLUT1 und des GLUT4-Antikörpers verwendet wurden, wurden nicht erhitzt.

Während für das Sammelgel die Acrylamid-Konzentration unabhängig vom nachzuweisenden Protein konstant ist, wurde sie beim Trenngel in Abhängigkeit vom molekularen Gewicht des Proteins gewählt. Für kleinere Proteine wurde ein höher und für große Proteine ein geringer konzentriertes Trenngel verwendet. Um eine Proteinnormierung über das TGX Stainfree BioRad-System zu ermöglichen, wurde

für die Trenngele (7,5% und 10%) das entsprechende Acrylamid der Firma BioRAD genutzt. Die Gelslots wurden mit jeweils 30µg der untersuchten Probe beladen. Bei den größeren Gelen, die im Rahmen der Western Blots mit den iCM AKT1- und iCM AKT2-Einzel-KO Mäusen verwendet wurden, wurde je Gelslot 60 µg Probe verwendet. Um die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine molekularen Gewichten zuordnen zu können, wurde bei jedem Gel 1 Slot mit 5 µl des Proteinmarkers PageRuler bzw. PageRuler Plus für den Nachweis großer Proteine (MW> 150 kD) der Firma ThermoScientific beladen. Die Elektrophorese erfolgte zunächst bei einer Spannung von 100 V, während die Proben das Sammelgel durchlaufen, und anschließend bei 200 V und wurde bei Austritt der Lauffront aus dem Gel beendet. Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die TGX-Gele nach Abtrennung der Sammelgele im „BioRAD Molecular Imager GelDoc XR+“ aktiviert.

#### **2.10.4 Quantifizierung der Gesamt-Proteinmenge mittels TGX**

Um beim quantitativen Western Blotting Artefakte, die durch inakkurates Pipettieren, unpräzise Abschätzung der verwendeten Proteinmenge oder ungleichmäßigen Proteintransfer entstehen können, zu berücksichtigen, wird für gewöhnlich eine Ladekontrolle verwendet (Colella et al., 2012). Für die durchgeführten Experimente wurden die TGX Stain-Free Gele der Firma Bio-Rad verwendet, um die Gesamtmenge der beim Blot transferierten Proteine zu quantifizieren. Die Stain-Free Gele beinhalten Trihalo-Komponenten, die mit Tryptophanresten von Proteinen reagieren (Colella et al., 2012). Unter UV-Licht fügen Trihalokomponenten wie Trichlorethanol funktionelle Gruppen an den angeregten Indol-Ring von Tryptophan an. Das modifizierte Tryptophan emittiert unter UV-Licht sichtbare Fluoreszenz (Ladner et al., 2004).

Auf Grund der kovalenten Bindung der Trihalokomponente an die Proteine können diese nicht nur im Gel, sondern auch nach erfolgtem Western Blot auf der Membran detektiert werden (Moritz, 2017). Dabei steigt die messbare Fluoreszenz bei der Arbeit mit StainFree Gelen im Bereich von 5 µg bis 80-120 µg Gesamtproteinmenge linear mit steigender Proteinmenge an (Rivero-Gutiérrez et al., 2014). Die Aktivierung der beschriebenen Reaktion und Detektion der Gesamtproteinmenge im Gel unmittelbar nach der SDS-PAGE sowie auf der Membran nach erfolgtem Proteintransfer erfolgte mit dem Gel Imaging System Molecular Imager GelDoc XR+. Für die Quantifizierung der Gesamtproteinmenge der einzelnen Proben der Western Blots wurde das Programm ImageLab 6.0 der Firma BioRAD verwendet.

#### **2.10.5 Western Blot**

Beim Western Blot migrieren die negativ geladenen, im Gel enthaltenen Proteine durch ein senkrecht zum Gel orientiertes elektrisches Feld in Richtung der Anode auf eine Membran (Gavini and Parameshwaran, 2020). Die Blots wurden als „Semi-Dry“-Blots mit dem Pierce G2 Fast Blotter (ThermoScientific) durchgeführt. Dabei wurde für die meisten Zielproteine eine Blotdauer von 7,5 Minuten und für große Zielproteine eine Blotdauer von 15 Minuten gewählt. Für den Blot wurde das Gel nach Abtrennung des Sammelgels in einem „Sandwich“ zwischen kathodenseitig 2 Lagen mit Kathodenpuffer getränktem Blotpapier (Whatman) und anodenseitig mit Anodenpuffer getränkter

Nitrozellulosemembran (Amersham) sowie 2 Lagen mit Anodenpuffer getränktem Blotpapier (Whatman) platziert.

### **2.10.6 Immunodetektion und Signalquantifizierung**

Unmittelbar nach dem Proteintransfer im Pierce G2 Fastblotter wurde die Membran im Molecular Imager GelDoc XR+ zur Quantifizierung der Gesamtproteinmenge gescannt. Anschließend wurde sie für eine Stunde in Blocking Lösung (TBS ohne Tween + Odyssey Blocking Buffer 1:1) auf dem Wipptisch (Mini Mini Rocking Platform Typ WT14, Biometra) geschüttelt. Die Behandlung mit Blocking Lösung trägt dazu bei, dass der verwendete Antikörper nicht unspezifisch an freie Bindungsstellen der Membran bindet (Mahmood and Yang, 2012). Daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem in 5% BSA in TBS Tween verdünnten primären Antikörper gegen das jeweilige Zielprotein über Nacht bei 4 °C auf einem Kippschüttler. Am nächsten Tag wurde die Membran zunächst für 3 x 10 min in TBS Tween auf dem Kippschüttler gewaschen. Tween20 ist ein nichtionisches Detergens, das hilft, unspezifisch gebundene Proteine von der Membran zu entfernen (Gavini and Parameshwaran, 2020). Anschließend wurde die Membran für 45-60 Minuten in Dunkelheit mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Die Waschschrte sind entscheidend, um Hintergrundsignale in der Analyse zu reduzieren (Gavini and Parameshwaran, 2020). Die sekundären Antikörper „IRDeye 680CW Goat anti mouse IgG secondary antibody“ und „IRDeye 800CW Goat anti-rabbit IgG secondary antibody“ wurden im Verhältnis 1:10 000 verdünnt verwendet (in Blocking Buffer mit 0,1 % Tween). Nach Inkubation erfolgten zwei zehnmütige Waschschrte in TBS Tween sowie ein letzter fünfzehnmütiger Waschschrte in TBS, um das Tween zu entfernen. Die Detektion der sekundären Antikörper beruht auf der Messung ihrer infraroten Fluoreszenz im Infrarot-Fluoreszenz-Bildgebungssystem Odyssey Scanner. Dieser kann gleichzeitig Infrarotlicht mit Wellenlängen von 700 und 800 nm detektieren, sodass die Fluoreszenz der beiden Antikörper IRDeye 680CW Mouse und IRDye 800CW Rabbit gleichzeitig gemessen werden kann. Folglich können 2 Zielproteine, markiert durch jeweils einen der beiden sekundären Antikörper, auf einer Membran untersucht werden.

Der Western Blot ist eine semiquantitative Methodik, die den Vergleich des Proteingehalts verschiedener Proben auf derselben Membran, jedoch keine absolute Bestimmung der Proteinkonzentration erlaubt (Mahmood and Yang, 2012). Mit dem Programm Image Studio Lite (Version 5.2) wurde die Stärke der Fluoreszenz der einzelnen Banden quantifiziert. Um beim Vergleich der Intensitäten verschiedener Banden die beladene Gesamtproteinmenge zu berücksichtigen, wurde für die statistische Auswertung der Western Blots jeweils der Quotient aus dem Wert der Signalintensität einer Bande in Image Studio Lite und der in Image Lab ermittelten Gesamtproteinmenge der zugehörigen Spur gebildet.

### **2.10.7 Auswertung der Western Blot-Versuchsreihen**

Zur Untersuchung des Effekts des iCM-AKT1/2-KOs auf die AKT-abhängige stimulierte Phosphorylierung kardialer Proteine wurde in Western Blots jeweils der Phosphorylierungsgrad verschiedener Proteine in WT- und iCM-AKT1/2-KO-Herzen im stimulierten und basalen Zustand betrachtet. In diesem

Zusammenhang wurden 3 Versuchsreihen mit unterschiedlicher Stimulation durchgeführt. Die Tiere wurden in einer Versuchsreihe intraperitoneal mit Insulin stimuliert, während in den anderen Versuchsreihen eine Stimulation isolierter Herzen im Langendorff-Versuchsaufbau mit Insulin oder IGF1 erfolgte. Für jede Gruppe wurden n=4 Tiere verwendet. Um die vier Gruppen „WT stimuliert“, „WT basal“, „iCM-AKT1/2-KO stimuliert“ und „iCM-AKT1/2-KO basal“ hinsichtlich der Phosphorylierung eines Proteins zu vergleichen, wurden für jeden Antikörper 3 Blots nach festem Schema angefertigt. Auf dem ersten Blot wurden „WT basal“ und „stimuliert“, auf dem zweiten „iCM-AKT1/2-KO basal“ und „iCM-AKT1/2-KO stimuliert“ und auf dem dritten „iCM-AKT1/2-KO stimuliert“ und „WT stimuliert“ miteinander verglichen. Es wurden die Mittelwerte der einzelnen Gruppen als *Fold Change* im Vergleich zum „WT basal“ angegeben. Um statistische Vergleiche zwischen allen 4 Gruppen zu ermöglichen, wurde der Mittelwert des stimulierten WTs des dritten Blots auf den Wert gesetzt, der sich für den „WT stimuliert“ des ersten Blots ergibt, nachdem dort der basale WT auf 1 gesetzt wurde. Der Mittelwert des stimulierten KOs des zweiten Blots wird auf den Wert gesetzt, der sich im dritten Blot für den stimulierten KO ergeben hat.

Um den Effekt des iCM-AKT1- und iCM-AKT2-Einzel-KOs auf die stimulierte Phosphorylierung von AKT-Substraten zu untersuchen, wurde der Phosphorylierungsgrad verschiedener Proteine in den Gruppen „WT basal“, „iCM-AKT1/2-KO stimuliert“, „iCM-AKT1-KO stimuliert“, „iCM-AKT2-KO stimuliert“ und „WT stimuliert“ mit n=4 Tieren pro Gruppe miteinander verglichen. Dabei wurden die Mittelwerte der Gruppen als *Fold Change* im Vergleich zum „WT basal“ angegeben.

Der Einfluss des iCM-AKT1/2-KOs auf die kardiale Expression der Glukosetransporter GLUT1 und GLUT4 im Zeitverlauf wurde untersucht, indem die GLUT1- bzw. GLUT4-Proteinmenge von je n=4 WT- und iCM-AKT1/2-KO-Herzen zu verschiedenen Zeitpunkt nach Induktion des KOs im Western Blot verglichen wurde. Die Proteinmenge eines Transporters in den iCM-AKT1/2-KO wurde jeweils als *Fold Change* im Vergleich zum WT angegeben.

## **2.11 Bedeutung von AKT für die kardiale Erregungsleitung**

Um den Einfluss des iCM-AKT1/2-KOs bzw. von AKT auf die kardiale Erregungsleitung der Maus zu untersuchen, wurden EKGs von WT- und iCM-AKT1/2-KO-Mäusen, sowie von stimulierten und basalen WT-Mäusen aufgezeichnet und analysiert.

### **2.11.1 Aufzeichnung der EKGs**

Die Aufzeichnung der Oberflächen-EKGs wurde durch PD Dr. Dr. André Heinen mit dem Datenaquisitionsgerät PowerLab inklusive dem Verstärker Bio Amp (beide ADInstruments) bei einer Aufnahme Frequenz von 4000/ s durchgeführt. Für die Auswertung wurde LabChart Pro 7 (ADInstruments) verwendet. Es wurden mittels subkutaner Nadelelektroden jeweils die Ableitungen nach Einthoven (I, II, III) und Goldberger (aVF, aVL, aVR) aufgezeichnet.

Die Tiere wurden durch Inhalation von Isoflurane (2%), gelöst in einem sauerstoffangereicherten (30%) Gasmischung, narkotisiert und atmeten währenddessen spontan. Sie waren ab 4 h vor Beginn der Narkose

nüchtern. Nach zwanzigminütiger Narkosedauer wurde mit der Aufzeichnung der EKGs begonnen. Bei Tieren, die mit Insulin stimuliert werden sollten, wurde das Insulin intraperitoneal nach dem im Abschnitt „Intraperitoneale Stimulation“ beschriebenen Schema ca. 5-10 min nach Aufzeichnungsbeginn verabreicht. Nach der Stimulation wurde das EKG noch für 15 min aufgezeichnet.

### **2.11.2 Auswertung eines EKGs**

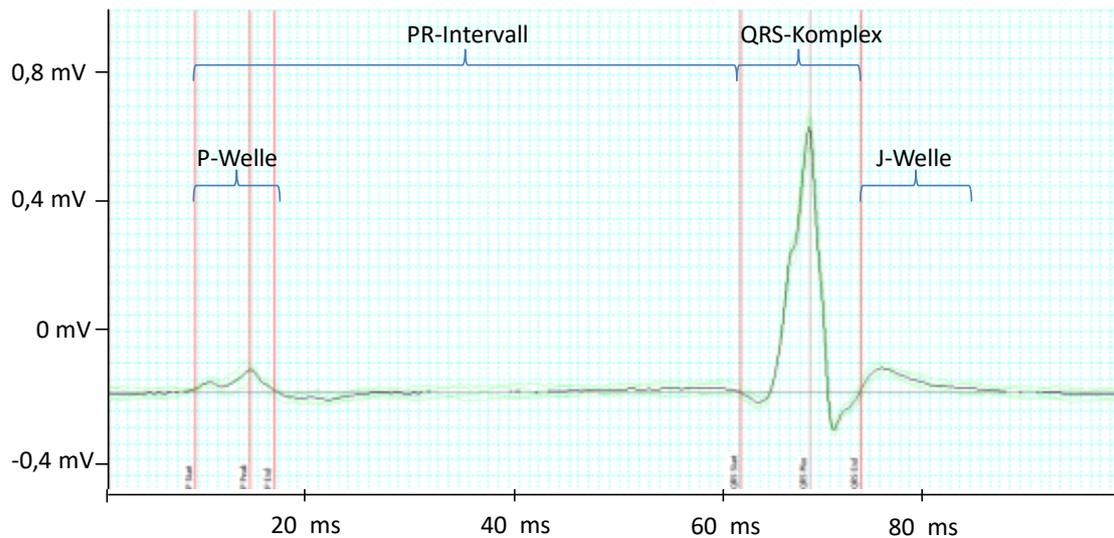
Bei der Beurteilung der EKGs wurde für jedes EKG ein Zeitraum von ca. 10 s betrachtet, um eine ausreichende Anzahl von Herzschlägen in die Auswertung einzubeziehen. Im Programm „LabChartPro 7“ (AD Instruments) wurden, um das Rauschen zu reduzieren, durch die Funktion „Beats to average“ jeweils die EKG-Komplexe von 4 aufeinanderfolgenden Einzelschlägen zu einem resultierenden EKG-Komplex verrechnet, auf dessen Grundlage die Beurteilung von Morphologie und Intervalldauern erfolgte.

Abbildung 5 zeigt beispielhaft einen EKG-Komplex einer „basalen“ WT-Maus. Die Begrenzungen der jeweils betrachteten EKG-Intervalle sind in der Abbildung markiert.

Die Morphologie der EKG-Komplexe eines Tiers wurde im Vergleich mit der Kurvenmorphologie von EKGs desselben Tiers, die zu anderen Zeitpunkten aufgezeichnet wurden, bewertet. Außerdem erfolgte ein Vergleich mit der EKG-Morphologie von Tieren desselben Genotyps bzw. gleicher Stimulation sowie von Tieren anderen Genotyps bzw. anders stimulierten Tieren. Zudem wurden die EKG-Kurven mit der aus der Literatur bekannten, typischen Morphologie des Maus-EKGs verglichen.

Für die quantitative Auswertung der EKGs wurden jeweils die Herzfrequenz, die Dauer der P-Welle, die Dauer des QRS-Komplexes sowie die Dauer des PR-Intervalls bestimmt. Die Dauer der T-Welle, die Dauer des QT-Intervalls sowie die Dauer des JT-Intervalls konnte auf Grund mangelnder Abgrenzbarkeit der T-Welle in den aufgezeichneten EKGs nicht ausgewertet werden. Die Begrenzung der untersuchten Parameter ist in der Abbildung dargestellt und entspricht den Erörterungen in der Einleitung. In LabChart Pro7 wurde für die analysierten Parameter jeweils der Mittelwert innerhalb des betrachteten Zeitraums bestimmt. Es wurden beim Vergleich von WT und iCM-AKT1/2-KO jeweils die Ableitungen 1 und 2 analysiert, während beim Vergleich von basalem zu insulinstimulierten WT jeweils nur Ableitung 1 betrachtet wurde.

Beim Vergleich von WT und iCM-AKT1/2-KO wurde für die P-Welle, das PR-Intervall und den QRS-Komplex jeweils der größere der in den beiden Ableitungen vorkommenden Werte verwendet. Damit wurde der Tatsache Rechnung getragen, dass die Dauer von Intervallen im EKG je nach Lage des elektrischen Hauptvektors zur betrachteten Ableitung falsch zu kurz, jedoch nicht falsch zu lang abgebildet werden kann.



**Abb. 5: Exemplarischer EKG-Komplex einer basalen WT-Maus**

Begrenzung der EKG-Intervalle (Vgl. Abschnitt 1.10.2).

### **2.11.3 Versuchsreihen**

Um den Effekt des iCM-AKT1/2-KOs auf die kardiale Erregungsleitung zu untersuchen, wurden EKGs von 4 WT-Mäusen und 5 iCM-AKT1/2-KO Mäusen vor der ersten OH-Tamoxifen-Injektion sowie an den Tagen 7, 14 und 21 nach Beginn der OH-Tamoxifen-Injektion aufgezeichnet.

Um zu überprüfen, ob sich im EKG von WT-Mäusen ein Effekt der Insulinstimulation nachweisen lässt, wurden 3 WT-Mäuse intraperitoneal nach dem in Abschnitt „Insulinstimulation“ beschriebenen Schema mit Insulin stimuliert. Als Vergleichsgruppe wurden 3 WT-Mäuse mit PBS behandelt. Vor, während und nach der Stimulation wurden kontinuierlich EKGs aufgezeichnet. Für die folgende Analyse wurden jeweils 10s-Abschnitte der EKGs 1 min vor sowie 1,3, 5 und 10 min nach der Stimulation betrachtet.

### **2.11.4 Microarray-Analysen**

Kardiale Expressionsprofile wurden mittels Agilent SurePrint G3 Mouse GE 8 × 60K Microarray Analyse erhoben. Dazu wurde RNA aus Herzen von iCM-AKT1/2-KO- und Kontrollmäusen an d10 und d21 nach erster Txf-Injektion (je n=4) isoliert. Die cDNA-Synthese und Microarray Analyse erfolgte durch das Biologisch Medizinische Forschungszentrum (BMFZ) der HHU Düsseldorf. Die Daten wurden von Frau Dr. S. Gödecke für weitere Analysen zur Verfügung gestellt.

### **2.12 Statistik**

Ergebnisse der verschiedenen Experimente wurden als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt und in GraphPad Prism 5 statistisch ausgewertet.

Die Western Blots zu den GLUT-Transportern, bei denen jeweils 2 Gruppen miteinander verglichen wurden, wurden mittels ungepaartem t-Test ausgewertet. In den übrigen Versuchsreihen zur stimulierten

Phosphorylierung im KO, bei denen jeweils mehr als 2 Gruppen verglichen wurden, erfolgte die statistische Analyse mittels One-Way-ANOVA. Die EKG-Experimente, bei denen jeweils zwei verschiedene Gruppen und mehrere Zeitpunkte betrachtet wurden, wurden mittels repeated measures Two-Way-ANOVA ausgewertet. Die Grenze für statistische Signifikanz lag jeweils bei \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Kontrolle des iCM-AKT-KOs und der Insulinstimulation**

Um zu untersuchen, welche Veränderungen der AKT-abhängigen intrazellulären Signaltransduktion im iCM-AKT-1/2-KO zum frühen Zeitpunkt, also schon vor den phänotypischen Veränderungen auftreten, wurde die insulinstimulierte Phosphorylierung von Proteinen, die in direktem oder indirektem Zusammenhang mit der AKT-Signaltransduktion stehen, mittels Western Blot untersucht.

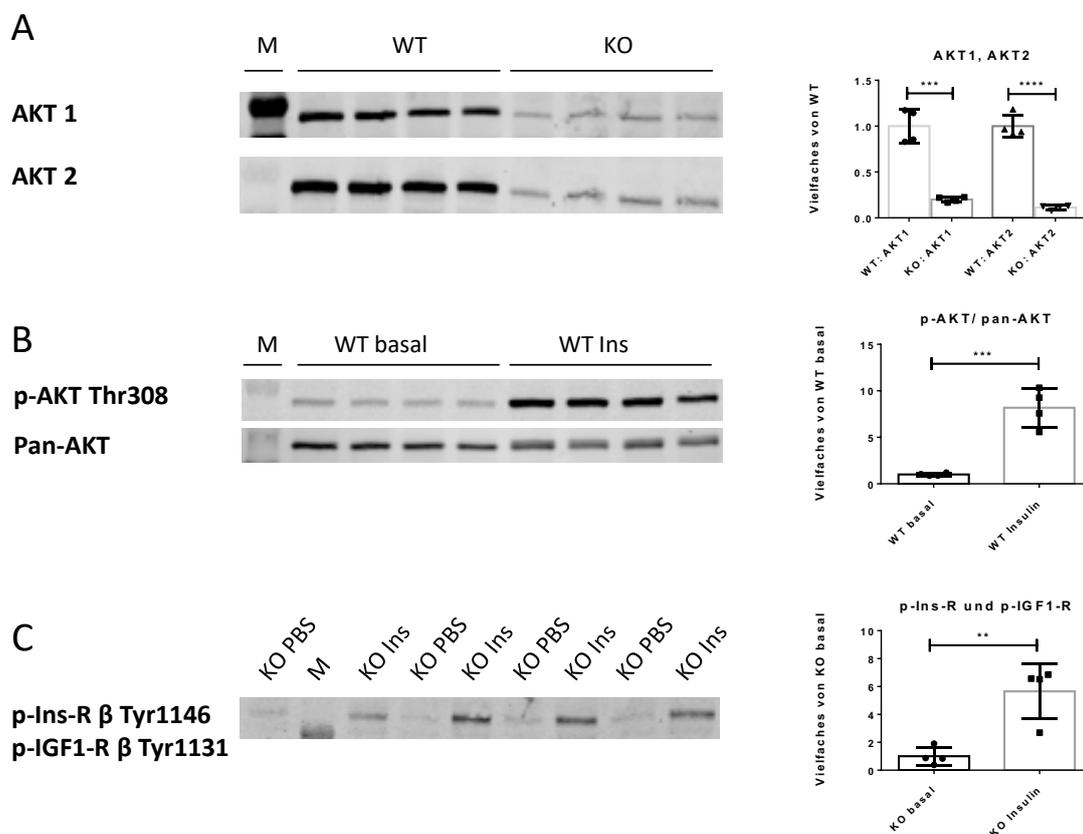
Dafür wurden Proteinextrakte aus Herzen von Mäusen mit induzierbarem kardiomyozytärem AKT1/2-Doppel-Knockout bzw. induzierbarem kardiomyozytärem AKT1- oder AKT2-Einzel-Knockout verwendet, die jeweils mit Herzproteinextrakten von WT-Mäusen verglichen wurden. Die Herzen wurden (mit Ausnahme der Western Blots zu den GLUTs) an d7 nach der ersten Tamoxifen-Injektion entnommen. Je nach Fragestellung wurde zuvor mit Insulin oder mit IGF1 stimuliert. Die Kontrollgruppen wurden in diesen Fällen mit dem Vehikel PBS ohne Agonisten behandelt. Mit PBS behandelte Herzen werden in der Arbeit als „basal“ bezeichnet. In Western Blot Analysen wurden zunächst jeweils die Effizienzen des Knockouts und der Stimulation, sofern durchgeführt, überprüft.

In Abbildung 6 sind beispielhaft Western Blots und die dazugehörigen Quantifizierungen dargestellt, die zur Überprüfung des kardiomyozytären AKT-Knockouts bzw. der Insulin- oder IGF1-Stimulation angefertigt wurden. In Abbildung 6A sind Western Blots zu sehen, die zur Überprüfung des induzierten kardiomyozytären AKT1/2-Knockouts durchgeführt wurden. Es ist zu erkennen, dass für die WT-Herzen für AKT1 und AKT2 jeweils Banden deutlich höherer Signalintensität vorliegen als für die Herzen der iCM-AKT1/2-KO-Tiere. In der quantitativen Auswertung zeigt sich normiert auf die aufgetragene Proteinmenge eine Abnahme der kardialen AKT1-Menge auf 20 % und eine Abnahme der AKT2-Menge auf ca. 11 % im iCM-AKT1/2-KO gegenüber dem Wildtyp. Das entspricht der Erwartung und belegt einen erfolgreichen Knockout. Die restliche AKT1- bzw. AKT2-Expression stammt aus anderen, nicht kardiomyozytären Zellen wie Endothelzellen oder Fibroblasten.

Abbildung 6B zeigt beispielhaft Western Blots, bei denen jeweils die gesamte AKT-Proteinmenge (panAKT= AKT1, 2 und 3) sowie der Phosphorylierungsgrad von AKT an Thr308 in insulinstimulierten und basalen WT-Herzen analysiert wurde. Die Signalintensität der panAKT-Banden ist für die Herzen beider Gruppen etwa ähnlich, während die Signalintensität der phospho-AKT markierenden Banden für die Herzen der insulinstimulierten WT-Tiere deutlich höher ist als für die der basalen Tiere. Es liegt normiert auf die Gesamtmenge kardialen AKTs (panAKT) eine achtfache Zunahme der AKT-Phosphorylierung (Thr308) nach Insulinstimulation im WT vor. Das zeigt, dass das gewählte Protokoll eine erfolgreiche Insulinstimulation im Herzen erlaubt.

Da in den Herzen der iCM-AKT1/2-KO-Mäuse die gesamte kardiomyozytäre AKT-Proteinmenge stark reduziert gegenüber dem WT ist, ist die quantitative Untersuchung der Effizienz der Insulinstimulation anhand des phosphoAKT/ panAKT-Quotienten nur eingeschränkt möglich. Um die Effizienz der Insulinstimulation in den iCM-AKT1/2-KO-Herzen zu überprüfen, wurde in Western Blots die

Phosphorylierung des Insulinrezeptors von insulinstimulierten und basalen iCM-AKT1/2-KO-Herzen miteinander verglichen. Wie in der Einleitung beschrieben kommt es nach Insulinstimulation zur Phosphorylierung des Insulinrezeptors und in der Folge zur Phosphorylierung und Aktivierung von AKT, sodass die Phosphorylierung des Insulinrezeptors zur Überprüfung der Effektivität der Insulinstimulation herangezogen werden kann. Der verwendete Antikörper detektiert phosphorylierte Formen des Insulin(Tyr1146)- und IGF1(Tyr1131)-Rezeptors. In Abbildung 6C ist ein beispielhafter Western Blot dargestellt. Es zeigt sich eine 5,5-fach höhere Phosphorylierung des Insulinrezeptors in den Herzen der insulinstimulierten iCM-AKT1/2-KO-Mäuse, wenn man von unveränderter Expression der Rezeptoren ausgeht. Dies belegt eine erfolgreiche Insulinstimulation.



**Abb. 6: Western Blots zur Kontrolle von iCM-AKT-KO und Überprüfung der Aktivierung des Insulin Signalwegs**

**A:** Untersuchung der Effizienz des iCM-AKT1/2-Knockouts durch Nachweis von AKT1 bzw. AKT2 durch Verwendung isoformspezifischer Antikörper.

**B:** Kontrolle der Insulinstimulation im WT durch Nachweis der AKT Thr308-Phosphorylierung als Indikator für eine erfolgreiche Aktivierung des Insulin Signalwegs.

**C:** Kontrolle der Insulinstimulation im iCM-AKT1/2-KO durch direkten Nachweis der Tyr1146- und Tyr1131-Phosphorylierung in iCM-AKT1/2-KO-Herzen.

M=Marker/Größenstandard. In dieser und allen weiteren Abbildungen ist jeweils nur ein Teilabschnitt des Größenstandards zu sehen, da jeweils nur Ausschnitte der Blots dargestellt werden.

Ungepaarter t-Test, n=4, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001.

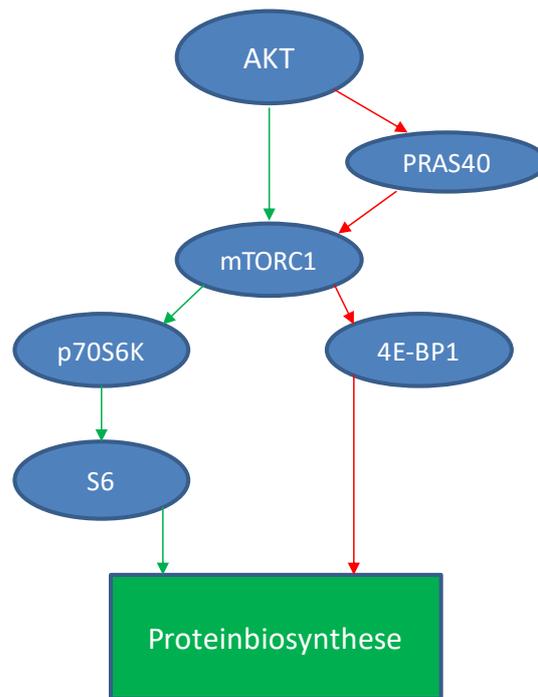
## **3.2 Phosphorylierung von AKT-Substraten an d7 nach Induktion des iCM-AKT-KOs**

### **3.2.1 Phosphorylierung von AKT-Substraten im iCM-AKT1/2-KO nach in vivo Insulin-stimulation**

Um den Effekt des induzierbaren kardiomyozytären AKT1/2-Doppel-Knockouts auf die AKT-abhängige Signaltransduktion in vivo zum frühen Zeitpunkt nach Induktion des Knockouts zu untersuchen, wurde die Phosphorylierung AKT-abhängiger Phosphorylierungsstellen verschiedener AKT-Substrate in Herzen insulinstimulierter und basaler WT- und iCM-AKT1/2-KO-Mäuse an d7 mittels Western Blot verglichen. Die untersuchten Proteine lassen sich verschiedenen, AKT-abhängig regulierten zellulären Funktionsbereichen zuordnen. Diese umfassen, wie in der Einleitung beschrieben, unter anderem die Regulation der Proteinbiosynthese und des Zellüberlebens sowie die Regulation des Glykogen- und Glukosestoffwechsels.

#### **3.2.1.1 mTORC/ p70S6K-Signalweg - Regulation der Proteinbiosynthese**

In Abbildung 7 ist vereinfacht die in der Einleitung ausführlich beschriebene AKT-abhängige Regulation der Proteinbiosynthese dargestellt. Nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren oder Insulin kommt es PI3K-abhängig zur Autophosphorylierung von mTOR an Ser2481 in mTORC1 und mTORC2. PRAS40 wirkt als indirekter Inhibitor von mTORC1. Insulinabhängig kann diese inhibierende Wirkung durch AKT-vermittelte Phosphorylierung von PRAS40 an Thr246 vermindert werden. Der aktivierte mTORC1-Komplex phosphoryliert die p70S6K (Thr 389), die daraufhin das S6-Protein der 40S ribosomalen Untereinheit phosphoryliert (Ser 235/236). Phosphorylierung von S6 führt zur gesteigerten Translation spezifischer mRNAs. Das Translationsrepressionsprotein 4E-BP1 inhibiert im unphosphorylierten Zustand die Cap-abhängige Translation. Durch Hyperphosphorylierung von 4E-BP1, vermittelt von mTORC1, wird die Hemmwirkung von 4E-BP1 inhibiert und die Translation gesteigert.



**Abb. 7: AKT-vermittelte Regulation der Proteinbiosynthese via mTORC1-Signalweg. Schematische Darstellung**

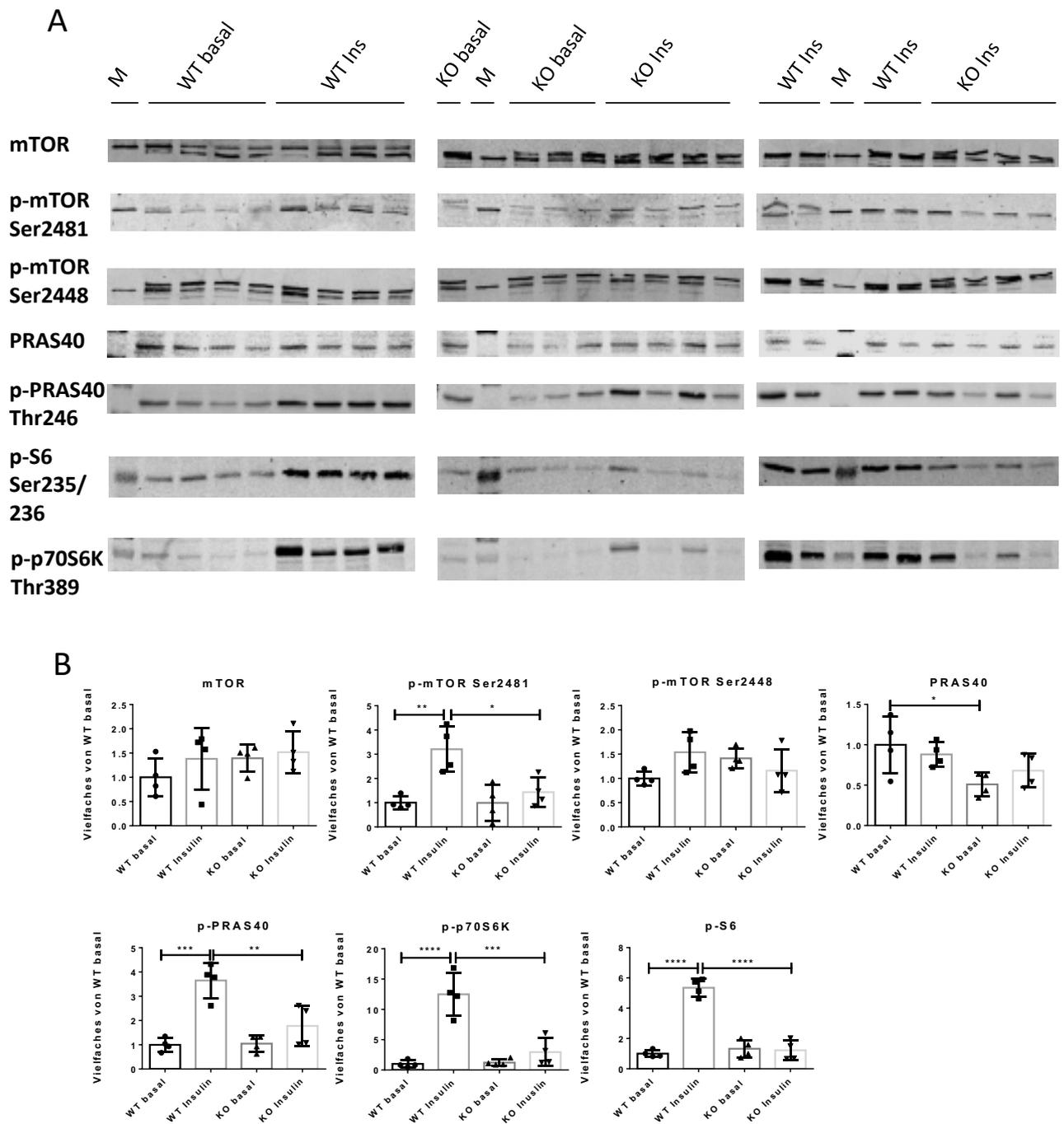
Grüne Pfeile symbolisieren eine aktivitätsfördernde Wirkung, rote Pfeile eine inhibierende Wirkung.

In Abbildung 8 sind die Ergebnisse der Western Blots zum mTORC1-/ p70S6K-Signalweg dargestellt. Dabei zeigt Abbildung 8A die Western Blots und Abbildung 8B die zugehörigen Quantifizierungen.

Es wurden zum einen die kardialen Proteinmengen von mTOR und PRAS40 und zum anderen die Phosphorylierung der verschiedenen Proteine des Signalwegs untersucht.

Hinsichtlich der mTOR- Proteinmenge und an Ser2448 phosphoryliertem mTOR zeigen sich in der ANOVA-Analyse keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen WT Ins, WT basal, iCM-AKT1/2-KO Ins und iCM-AKT1/2 KO basal. Die Phosphorylierung von mTOR an Ser2481 ist im WT nach Insulinstimulation signifikant gegenüber dem basalen WT gesteigert. Im iCM-AKT1/2-KO ist kein Unterschied zwischen basalen und insulinstimulierten Tieren nachweisbar. Die Phosphorylierung bleibt jeweils auf dem Niveau des basalen WT und ist signifikant geringer als im insulinstimulierten WT.

Kardiales PRAS40 ist im basalen iCM-AKT1/2-KO gegenüber dem basalen WT signifikant vermindert nachweisbar (Vergleich WT basal mit iCM-AKT1/2-KO basal: p-Wert 0,045; Vergleich WT basal mit iCM-AKT1/2-KO Insulin: p-Wert 0,249). Ansonsten bestehen keine signifikanten Unterschiede der kardialen PRAS40-Proteinmenge zwischen den Gruppen. Die Phosphorylierung von PRAS40 (Thr246) ist in WT-Herzen nach Insulinstimulation signifikant gegenüber den basalen WT-Herzen gesteigert. In den iCM-AKT1/2-KO-Herzen ist ein solcher Stimulationseffekt nicht zu beobachten und die Phosphorylierung bleibt jeweils auf dem Level des basalen und signifikant unterhalb dem des stimulierten WT.



**Abb. 8: Einfluss des iCM-AKT1/2-KOs auf die AKT-vermittelte Regulation der Proteinbiosynthese**

Phosphorylierung von Proteinen des mTOR-Signalwegs in Herzen von insulinstimulierten und basalen WT- und iCM-AKT1/2-KO-Mäusen an Tag 7 nach Induktion des KO. **A:** Western Blots. **B:** Relative Quantifizierung.

M=Marker/ Größenstandard. One-Way-ANOVA, n=4, \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001.

Auch für die p70S6K und für S6 ist die Phosphorylierung der jeweiligen AKT-abhängigen Phosphorylierungsstellen in den Herzen des insulinstimulierten WT jeweils signifikant gegenüber dem basalen WT erhöht. Dieser Unterschied zwischen insulinstimuliertem und basalem Phosphorylierungsgrad ist

im iCM-AKT1/2-KO jeweils nicht nachweisbar. Die Phosphorylierung liegt im iCM-AKT1/2-KO jeweils auf dem Niveau des basalen WT und ist signifikant gegenüber dem insulinstimulierten Wildtyp vermindert.

Die beschriebenen Beobachtungen zeigen, dass das AKT-Signalling über den mTORC1-Signalweg in insulinstimulierten Herzen nach iCM-AKT1/2-KO deutlich eingeschränkt ist.

Wie oben beschrieben vermittelt der nach Insulinstimulation aktivierte mTORC1-Signalweg durch Hyperphosphorylierung von 4E-BP1 eine Steigerung der Translation. Daher wurde weiterführend untersucht, ob auch die Phosphorylierung des der mTORC1-Aktivierung nachgeschalteten 4E-BP1 im iCM-AKT1/2-KO beeinträchtigt ist.

In Abbildung 9 sind die Western Blots zu p-4E-BP1 mit den Ergebnissen der Quantifizierung dargestellt. In der Abbildung der Blots sieht man, dass die vom Antikörper markierten Bereiche aus jeweils (2-) 3 distinkten Banden bestehen. Wie in der Einleitung beschrieben, repräsentieren diese als  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  bezeichneten Banden die unterschiedlich stark phosphorylierten Formen von 4E-BP1. Dabei repräsentiert die  $\gamma$ -Form die hyperphosphorylierte, am wenigsten elektrophoretisch mobile Form von 4E-BP1. Phosphoryliertes 4E-BP1 ( $\beta$ -Form), repräsentiert durch die mittlere Bande, ist mobiler als die hyperphosphorylierte Form und weniger elektrophoretisch mobil als die un- oder hypophosphorylierte  $\alpha$ -Form, die in der unteren Bande abgebildet ist.

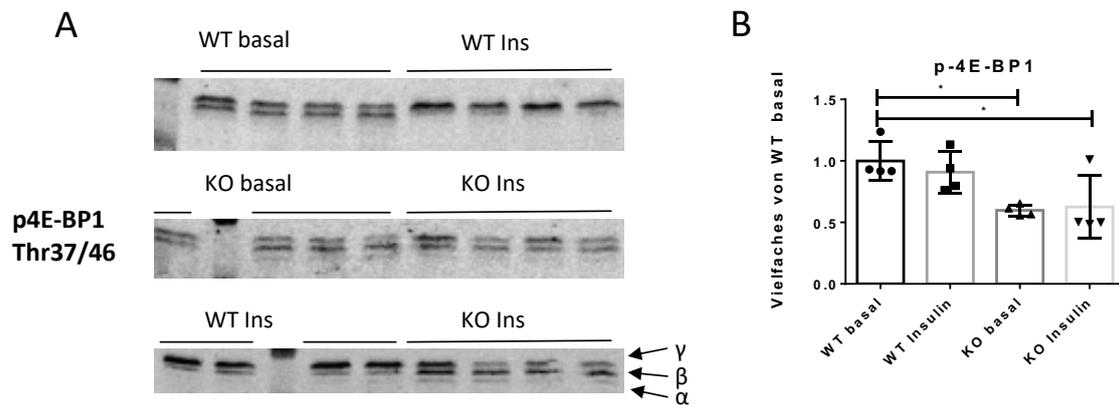
Es fällt auf, dass im insulinstimulierten WT im Vergleich zum basalen WT die hyperphosphorylierte  $\gamma$ -Form dominiert, während die  $\beta$ -Bande eine verminderte Intensität aufweist und die  $\alpha$ -Bande nicht erkennbar ist. Im iCM-AKT1/2-KO ist dieser Stimulationseffekt nicht zu beobachten, die Signale von stimuliertem und basalem iCM-AKT1/2-KO gleichen sich. Bei beiden ist v.a. die geringer phosphorylierte  $\beta$ -Form dominant und auch die  $\alpha$ -Bande ist zu erkennen.

Die statistische Auswertung auf Grundlage der gemeinsamen Quantifizierung von  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Form zeigt eine signifikant geringere Phosphorylierung der untersuchten Phosphorylierungsstellen von 4E-BP1 in den Herzen des basalen iCM-AKT1/2-KO im Vergleich zum basalen WT. Zwischen basalen und stimulierten Tieren eines Genotyps sowie zwischen stimuliertem WT- und iCM-AKT1/2-KO gibt es in dieser Hinsicht keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Eine getrennte Quantifizierung von  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Form war aus technischen Gründen nicht möglich, da die Formen nicht ausreichend gelelektrophoretisch voneinander getrennt werden konnten.

Die Western Blots zeigen, dass die AKT-abhängige, insulinstimulierte Phosphorylierung von 4E-BP1 nach iCM-AKT1/2-KO eingeschränkt.

Die experimentellen Ergebnisse zum mTORC1-/p70S6K-Signalweg weisen insgesamt auf eine frühe Einschränkung der Proteinsynthese nach iCM-AKT1/2-KO hin.



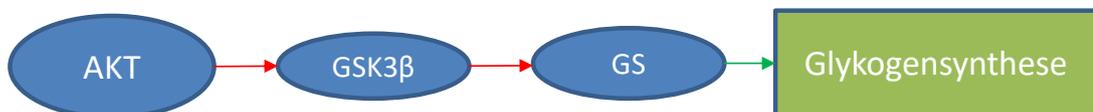
**Abb. 9: Einfluss des iCM-AKT1/2-KOs auf die Phosphorylierung von 4E-BP1**

Phosphorylierung von 4E-BP1 in Herzen von insulinstimulierten und basalen WT- und iCM-AKT1/2-KO-Mäusen an Tag 7 nach Induktion des KOs. **A:** Western Blots. Exemplarische Markierung der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Banden (vgl. Text). **B:** Relative Quantifizierung.

M= Marker/ Größenstandard. One-Way-ANOVA, n=4, \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001.

### **3.2.1.2 GSK3 $\beta$ -Signalweg und AMPK**

Wie in der Einleitung beschrieben, ist AKT an der Regulation des kardiomyozytären Glukosestoffwechsels beteiligt. In Abbildung 10 ist schematisch dargestellt, wie AKT die Glykogensynthese in Kardiomyozyten beeinflusst. Aktivierung von AKT durch Insulinstimulation führt zu einer vermehrten zellulären Glykogensynthese. Die Glykogensynthese (GS) katalysiert den limitierenden Schritt der Glykogensynthese und wird durch Phosphorylierung durch die GSK3 $\beta$  inhibiert. Unter Insulinstimulation phosphoryliert AKT die GSK3 $\beta$  (p-GSK3 $\beta$ ) an Ser9 und inhibiert so die phosphorylierende, inhibierende Aktivität der GSK3 $\beta$  auf die GS.



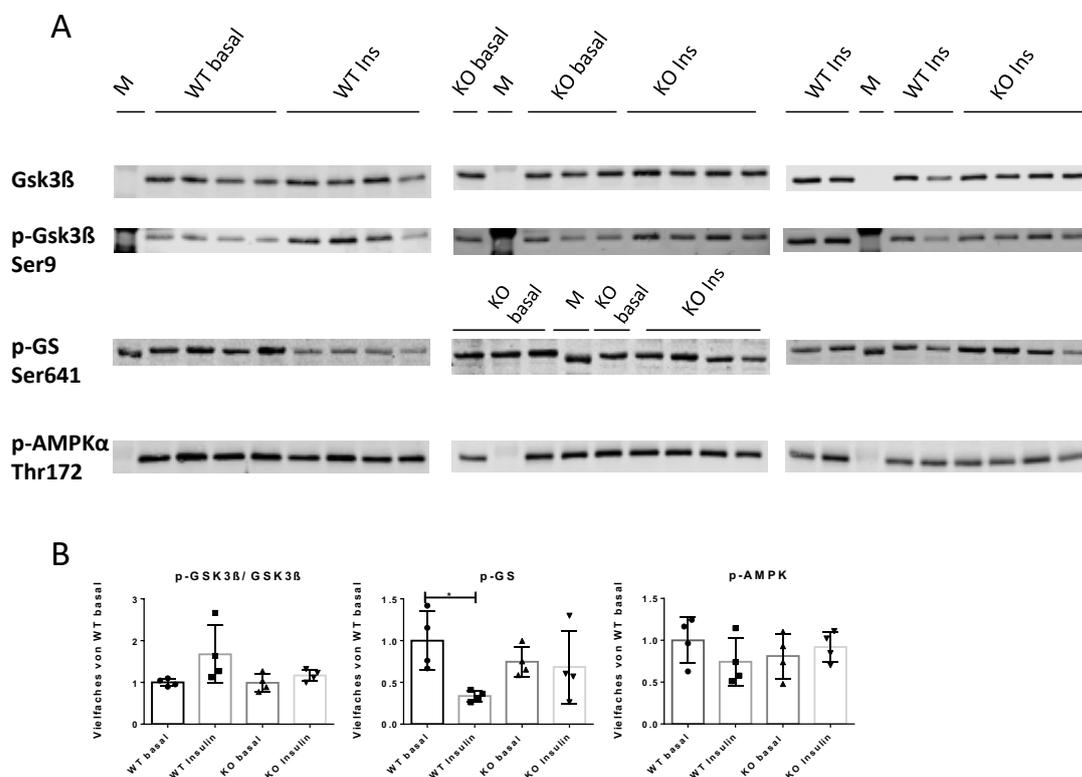
**Abb. 10: AKT-vermittelte Regulation der Glykogensynthese. Schematische Darstellung**

Grüne Pfeile symbolisieren eine aktivitätsfördernde Wirkung, rote Pfeile eine inhibierende Wirkung

Abbildung 11 zeigt Western Blots und relative Quantifizierung zur GSK3 $\beta$ -Phosphorylierung (p-GSK3 $\beta$ / GSK3 $\beta$ ) und p-GS. Der GSK3 $\beta$ -Phosphorylierungsgrad an Ser9 (p- GSK3 $\beta$ / GSK3 $\beta$ ) nahm in WT-Herzen nach Stimulation von einem basalen Wert um ca. 67 % zu. Dies ging einher mit einer signifikanten Abnahme der GS-Phosphorylierung an Ser641 um ca. 66 %. In iCM-AKT1/2-KO-Herzen

wurde weder eine Zunahme der Ser9-Phosphorylierung von GSK3 $\beta$  noch eine veränderte GS-Phosphorylierung nach Insulinstimulation beobachtet. Die Experimente weisen auf eingeschränktes, insulinstimuliertes AKT-Signalling über den GSK3 $\beta$ /GS-Signalweg nach iCM-AKT1/2-KO hin.

Wie AKT ist auch die AMPK an einer gesteigerten Translokation des GLUT4-Glukosetransporters von intrazellulären Vesikeln an die Plasmamembran und am Glykogenstoffwechsel beteiligt und spielt eine Schlüsselrolle in der zellulären Energiehomöostase. Wie in der Einleitung erörtert erfordert vollständige Kinaseaktivität der AMPK die Thr172-Phosphorylierung ihrer katalytischen  $\alpha$ -Untereinheit. Die Thr172-Phosphorylierung der  $\alpha$ -Untereinheit der AMPK steigt bei hohem zellulärem AMP/ATP-Verhältnis. Wie in Abbildung 11 zu sehen ist, ergab sich für an Thr172 phosphorylierte AMPK $\alpha$  jeweils kein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen. Die Thr172-Phosphorylierung der AMPK $\alpha$  ist nach iCM-AKT1/2-KO nicht signifikant erhöht. Das spricht dafür, dass iCM-AKT1/2-KO an d7 nach Induktion nicht zu einer Aktivierung der AMPK führt.



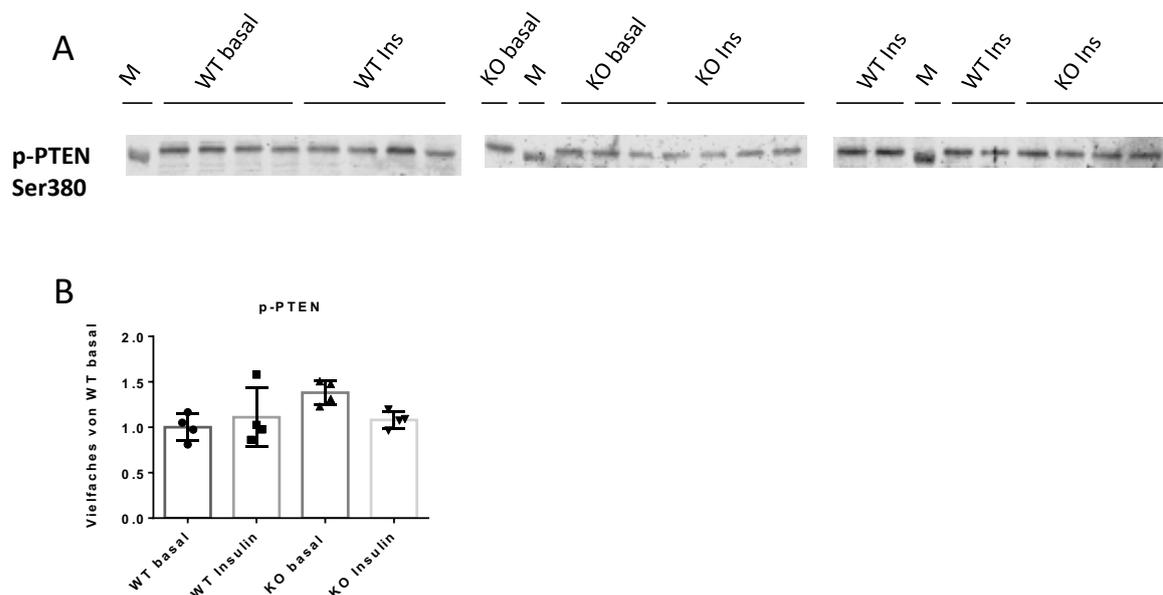
**Abb. 11: Einfluss des iCM-AKT1/2-KOs auf die AKT-vermittelte Regulation des Glykogen- und Glukosestoffwechsels**

Phosphorylierung von GSK3 $\beta$ , GS und AMPK $\alpha$  in Herzen von insulinstimulierten und basalen WT- und iCM-AKT1/2-KO-Mäusen an Tag 7 nach Induktion des KO. **A:** Western Blots. **B:** Relative Quantifizierung. M=Marker/ Größenstandard. One-Way-ANOVA, n=4, \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001.

### **3.2.1.3 Phosphorylierung des Upstream-AKT-Regulators PTEN**

In Abbildung 12 sind Western Blots zur Untersuchung des Einflusses des iCM-AKT1/2-KOs auf die Ser380-Phosphorylierung von PTEN dargestellt. PTEN ist ein wichtiger negativer Regulator des PI3K/AKT- Pathways. Wie in der Einleitung beschrieben kann die Phosphorylierung von PTEN am C-terminalen Abschnitt an Ser380, Thr382, Thr383, Ser385 dessen Phosphatase-Aktivität inhibieren.

Für p-PTEN Ser380 konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Phosphorylierungsgrads zwischen den untersuchten Gruppen festgestellt werden. Daher gibt es keinen Hinweis auf veränderte PTEN-Aktivität an d7 nach iCM-AKT1/2-KO.



**Abb. 12: Einfluss des iCM-AKT1/2-KOs auf die stimulierte Phosphorylierung von PTEN**

Phosphorylierung von PTEN an Ser380 in Herzen von insulinstimulierten und basalen WT- und iCM-AKT1/2-KO-Mäusen an Tag 7 nach Induktion des KOs. **A:** Western Blots.

**B:** Relative Quantifizierung.

M=Marker/ Größenstandard. One-Way-ANOVA, n=4, \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001.

### **3.2.2 Phosphorylierung von AKT-Substraten in iCM-AKT1- und iCM-AKT2-Einzel-KOs nach in vivo Insulinstimulation**

Um zu untersuchen, ob beobachtete Veränderungen des Phosphorylierungsmusters von AKT-Substraten im iCM-AKT1/2-KO jeweils spezifisch auf den Knockout einer der kardiomyozytär exprimierten Isoformen AKT1 und AKT 2 zurückzuführen sind, bzw. ob der Verlust einer der Isoformen durch die jeweils andere kompensiert wird, wurden Western Blots mit Herzproteinextrakten von iCM -AKT1- und iCM-AKT2-Einzel-KO-Tieren an d7 nach Induktion des Knockouts durchgeführt. Dabei wurde die Phosphorylierung ausgewählter AKT-Substrate in Herzen von insulinstimulierten iCM-AKT1-KO- und iCM-AKT2-KO-Mäusen quantifiziert und mit insulinstimulierten iCM-AKT1/2-KO- und WT-Mäusen

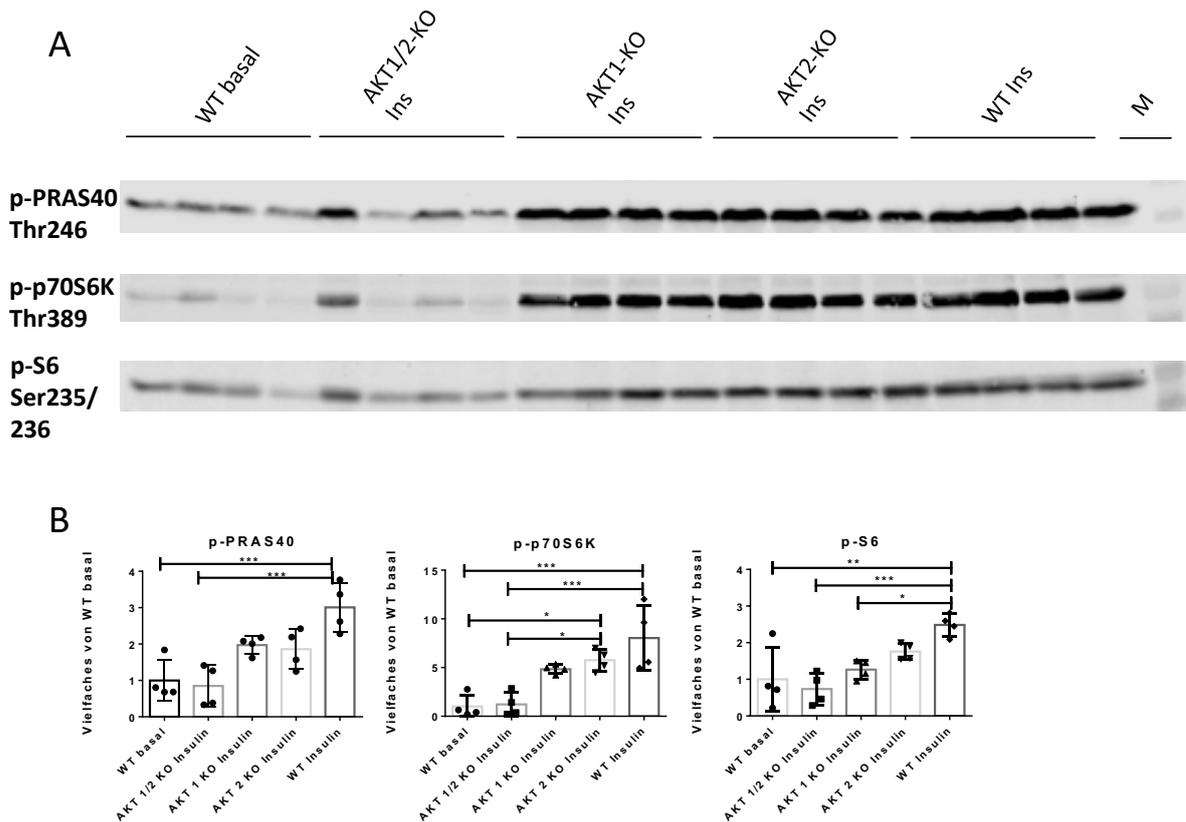
sowie basalen WT-Mäusen verglichen.

### 3.2.2.1 mTORC/ p70S6K-Signalweg - Regulation der Proteinbiosynthese

Abbildung 13 zeigt die Western Blots und zugehörige Quantifizierung für die untersuchten Proteine des mTORC-/p70S6K-Signalwegs.

Insulinstimulation induziert den stärksten Anstieg der Phosphorylierung von p70S6K (Thr389), S6 (Ser 235/236) und PRAS40 (Thr 246) in WT Herzen. Wie bereits gezeigt findet in iCM-AKT1/2-KO-Herzen keine Phosphorylierung über das in WT-Herzen gefundene Basalniveau hinaus statt. Interessanterweise führt Insulinstimulation in AKT1- bzw. AKT2-Einzel-Knockouts zu einer Phosphorylierung, die zwischen der im insulinstimulierten WT und der im basalen WT bzw. iCM-AKT1/2-KO liegt.

Die beschriebenen Beobachtungen zeigen, dass das AKT-Signalling über den mTORC/ p70S6K-Signalweg in insulinstimulierten Herzen nach iCM-AKT1- und iCM-AKT2-Einzel-KO jeweils weniger stark eingeschränkt ist als nach iCM-AKT1/2-KO. Zudem wird deutlich, dass beide Isoformen für die maximale stimulierte Phosphorylierung der untersuchten Substrate erforderlich sind.

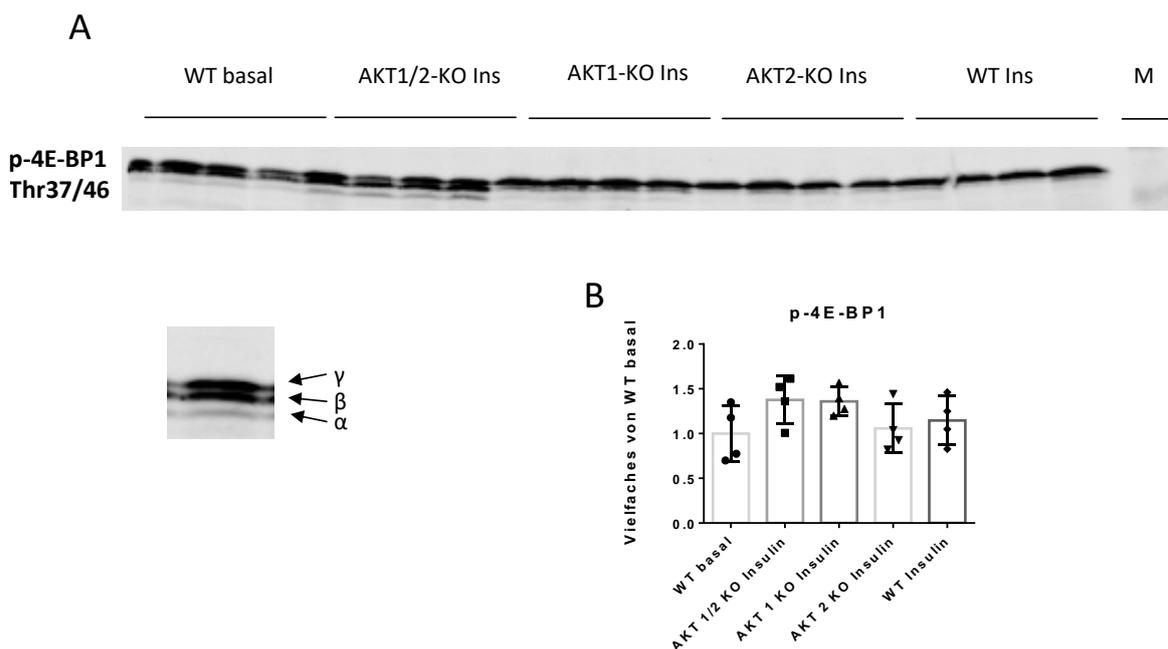


**Abb. 13: Effekt des iCM-AKT1- und iCM-AKT2-Einzel-KOs auf die AKT-vermittelte Regulation der Proteinbiosynthese**

Phosphorylierung von Proteinen des mTORC/ p70S6K-Signalwegs in Herzen von insulinstimulierten und basalen WT- sowie insulinstimulierten iCM-AKT1/2-KO-, iCM-AKT1-KO- und iCM-AKT2-KO-Mäusen an Tag 7 nach Induktion des Knockouts. **A:** Western Blots. **B:** Relative Quantifizierung. M=Marker/ Größenstandard. One-Way-ANOVA, n=4, \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001.

In Abbildung 14 ist der Western Blot für p-4E-BP1 mit Quantifizierung abgebildet. Unter basalen Bedingungen kann man im WT alle drei Banden des 4E-BP1 nachweisen, wobei die  $\alpha$ -Bande nur eine geringe Intensität aufweist. Insulinbehandlung führt zu einer Veränderung des Bandenmusters mit einer stärkeren Zunahme der hyperphosphorylierten  $\gamma$ -Form. Im iCM-AKT1/2-KO findet sich selbst nach Insulinbehandlung vermutlich eine geringere Phosphorylierung als im basalen WT, denn man kann neben den  $\beta$ - und  $\gamma$ -Banden eine deutliche  $\alpha$ -Bande erkennen, die stärker ausgeprägt ist als im basalen WT. Bei den Herzen der iCM-AKT1- und iCM-AKT2-KO-Mäuse ist, ähnlich wie beim insulinstimulierten WT, die hyperphosphorylierte  $\gamma$ -Form dominierend, bei geringer Intensität der  $\beta$ -Bande und nicht nachweisbarer  $\alpha$ -Bande. Die Quantifizierung und statistische Auswertung des Western Blots ergab keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Gesamt-Phosphorylierungsgrads der betrachteten Phosphorylierungsstellen von kardialem 4E-BP1 zwischen den untersuchten Gruppen. Dabei wurden  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Bande jeweils gemeinsam quantifiziert, eine getrennte Quantifizierung war aus technischen Gründen nicht möglich.

Die beschriebenen Beobachtungen zeigen, dass die AKT-abhängige Phosphorylierung von 4E-BP1 in insulinstimulierten Herzen nach iCM-AKT1- und iCM-AKT2-Einzel-KO, anders als nach iCM-AKT1/2-KO, nicht gegenüber dem WT eingeschränkt ist.



**Abb. 14: Effekt des iCM-AKT1- und des iCM-AKT2-Einzel-KOs auf die Phosphorylierung von 4E-BP1**

Phosphorylierung von 4E-BP1 in Herzen von insulinstimulierten und basalen WT- sowie insulinstimulierten iCM-AKT1/2-KO-, iCM-AKT1-KO- und iCM-AKT2-KO-Mäusen an Tag 7 nach Induktion des Knockouts. **A:** Western Blots. Exemplarische Markierung der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Banden (vgl. Text). **B:** Relative Quantifizierung.

M=Marker/ Größenstandard. One-Way-ANOVA, n=4, \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001.

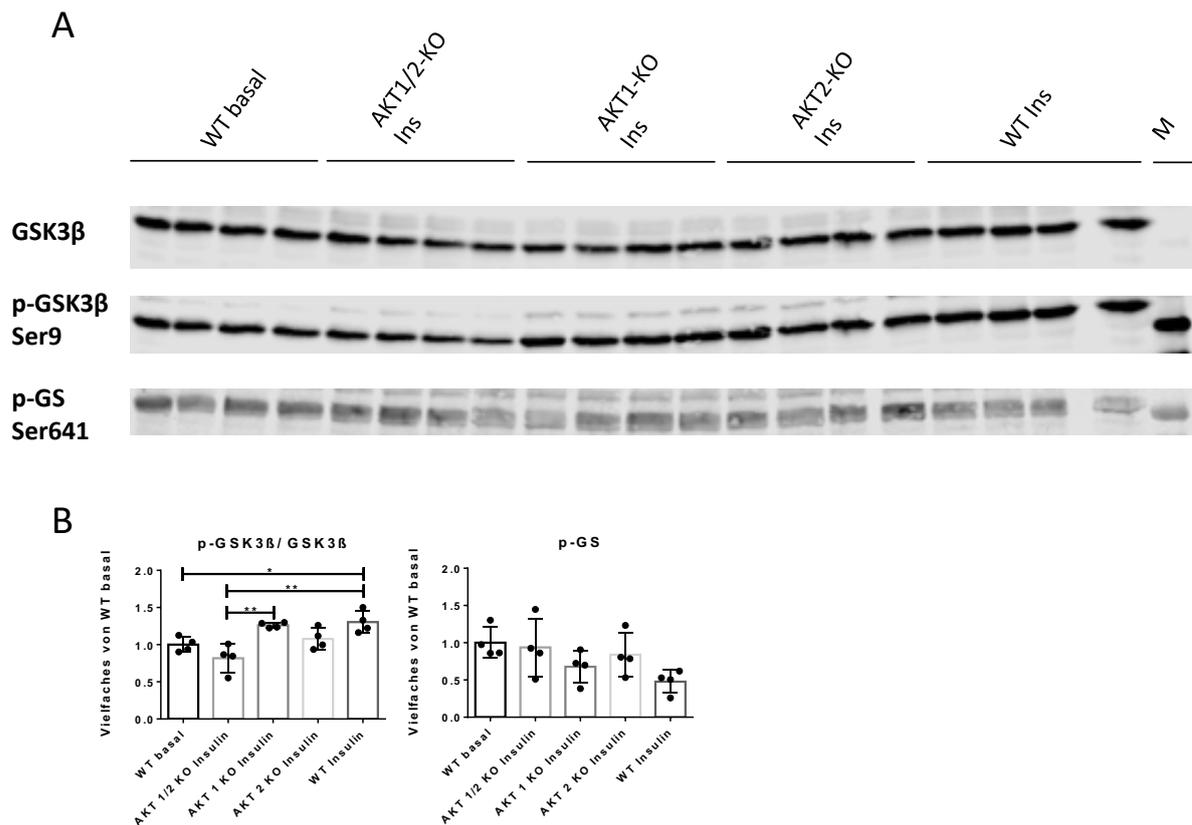
### **3.2.2.2 GSK3 $\beta$ -Signalweg**

In Abbildung 15 sind die Western Blots zur Untersuchung der Phosphorylierung von p-GSK3 $\beta$  (Ser9) und p-GS (Ser641) mit zugehöriger relativer Quantifizierung dargestellt.

Als Effekt der Insulinstimulation ist eine Zunahme des p-GSK3 $\beta$ (Ser9)/ GSK3 $\beta$ -Verhältnisses in den Herzen des stimulierten Wildtyps gegenüber dem basalen Wildtyp zu beobachten, wie bereits gezeigt, allerdings hier mit Signifikanz. Das Verhältnis ist im stimulierten iCM-AKT1/2-KO auf ähnlichem Niveau wie im basalen WT und signifikant geringer als im insulinstimulierten WT. Das weist auf den bereits gezeigten fehlenden Stimulationseffekt auf die Ser9-Phosphorylierung nach iCM-AKT1/2-KO hin. In den Herzen der iCM-AKT1- und iCM-AKT2-KO Mäuse ist das pGSK3 $\beta$ (Ser9)/ GSK3 $\beta$ -Verhältnis jeweils erhöht gegenüber den Herzen des basalen Wildtyps und stimulierten iCM-AKT1/2-KOs und auf ähnlichem Niveau wie im stimulierten WT. Hierbei ist der Unterschied des Ser9-Phosphorylierungsgrads zwischen stimuliertem iCM-AKT1/2-KO und stimuliertem iCM-AKT1-KO statistisch signifikant. Da WT und iCM-AKT1-KO-Mäuse einen ähnlichen Phosphorylierungsgrad an GSK3 $\beta$  zeigen, kann man vermuten, dass AKT2 vermutlich für die Ser9-Phosphorylierung von GSK3 $\beta$  eine größere Rolle spielt als AKT1.

Die Phosphorylierung der GS an Ser641 ist in den Herzen des Wildtyps unter Insulinstimulation geringer als im basalen Zustand. In den Herzen des insulinstimulierten iCM-AKT1/2-KO ist die Ser641-Phosphorylierung der GS auf ähnlichem Niveau wie in den Herzen des basalen Wildtyps. Das zeigt den fehlenden Stimulationseffekt nach iCM-AKT1/2-KO. Für die iCM-AKT1- und AKT2-KO Mäuse liegt die Ser641-Phosphorylierung der kardialen GS zwischen dem im stimulierten WT auf der einen und dem im basalen WT und stimulierten iCM-AKT1/2-KO auf der anderen Seite. Die beobachteten Effekte sind jeweils statistisch nicht signifikant.

Die Western Blots zeigen, dass die insulinstimulierte AKT-abhängige Ser9-Phosphorylierung der GSK3 $\beta$  nach iCM-AKT1- und iCM-AKT2-KO, anders als nach iCM-AKT1/2-KO, nicht deutlich gegenüber dem WT eingeschränkt ist. Die AKT-vermittelte Abnahme der Ser641-Phosphorylierung der GS ist in insulinstimulierten Herzen nach iCM-AKT1- und iCM-AKT2-Einzel-KO jeweils weniger stark eingeschränkt als nach iCM-AKT1/2-KO.



**Abb. 15: Effekt des iCM-AKT1- und des iCM-AKT2-Einzel-KOs auf die AKT-vermittelte Regulation der Glykogensynthese**

Quantifizierung der Phosphorylierung von GSK3β und von GS in Herzen von insulinstimulierten und basalen WT- sowie insulinstimulierten iCM-AKT1/2-KO-, iCM-AKT1-KO- und iCM-AKT2-KO-Mäusen an Tag 7 nach Induktion des Knockouts. **A:** Western Blots. **B:** Relative Quantifizierung.

M=Marker/ Größenstandard. One-Way-ANOVA, n=4, \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001.

### **3.2.3 IGF1-/ insulinstimulierte Phosphorylierung kardialer AKT-Substrate nach iCM-AKT1/2-KO – Perfusion nach Langendorff**

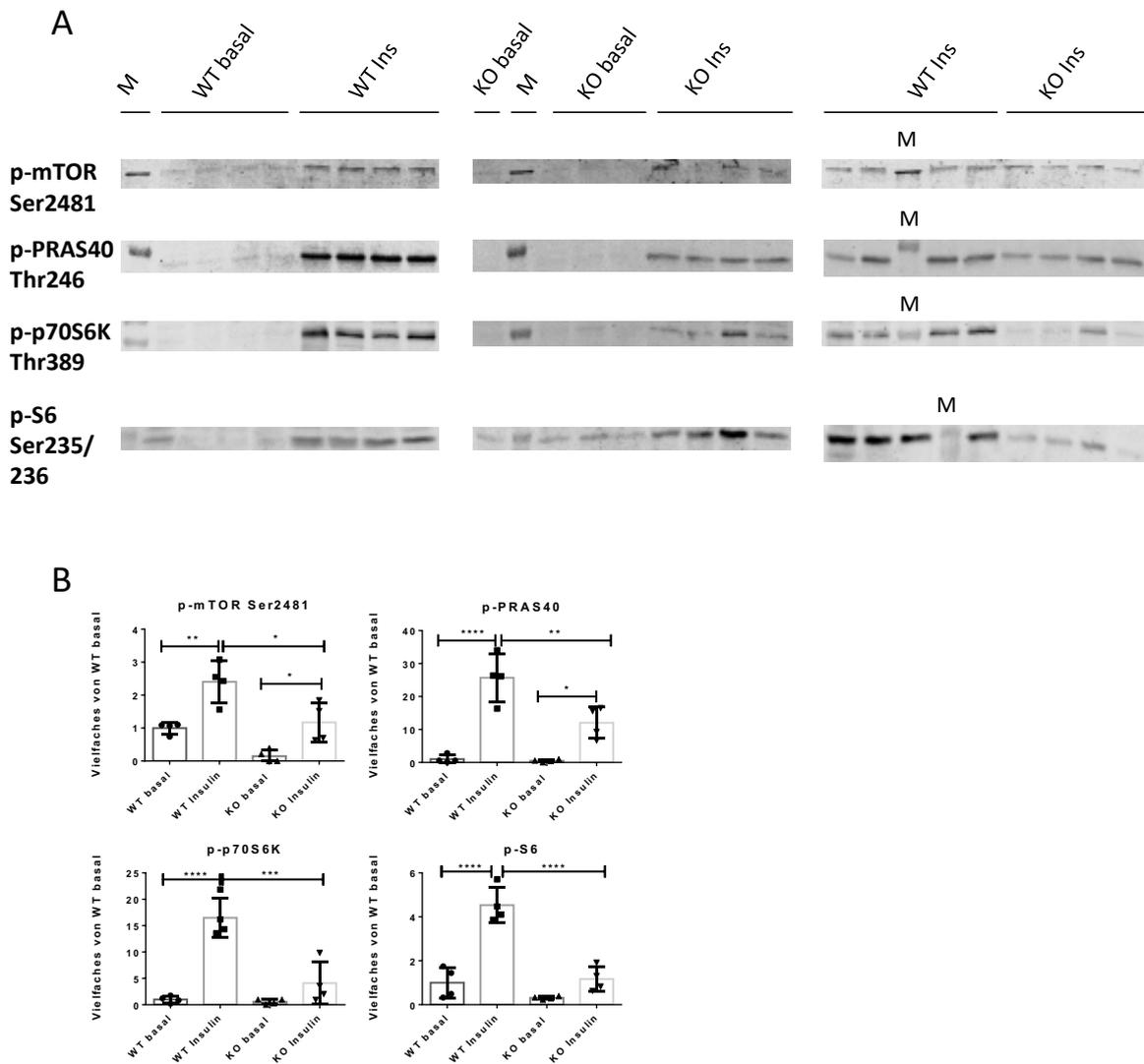
In vivo zirkulieren durch Stress und β-Stimulation vor Tötung der Tiere und Organentnahme viele Hormone, die den Phosphorylierungsgrad von Proteinen beeinflussen können. In isolierten, nach Langendorff perfundierten Herzen können unstimulierte Basalwerte der Phosphorylierung ohne Einfluss zirkulierender Hormone und Wachstumsfaktoren bestimmt werden. Die Wirkung von Insulin bzw. IGF1 kann so unabhängig von Einflüssen der Organentnahme betrachtet werden.

Dafür wurden Herzen von iCM AKT1/2-KO- und WT-Tieren an d7 nach Induktion des KOs nach Entnahme retrograd nach Langendorff perfundiert und dabei mit Insulin bzw. IGF1 stimuliert.

#### **3.2.3.1. mTORC/ p70S6K-Signalweg - Insulinstimulation**

Die Western Blots zur Proteinphosphorylierung des für die AKT-abhängige Stimulation der Proteinbiosynthese verantwortlichen mTORC/ p70S6K-Signalwegs sind mit der zugehörigen Quantifizierung in

Abbildung 16 gezeigt.



**Abb. 16: Einfluss des iCM-AKT1/2-KOs auf die AKT-vermittelte Regulation der Proteinbiosynthese. Insulinstimulation von nach Langendorff perfundierten Herzen**

Phosphorylierung von Proteinen des p70S6K-Signalwegs in nach Langendorff perfundierten, insulinstimulierten Herzen von WT- und iCM-AKT1/2-KO-Mäusen an Tag 7 nach Induktion des KOs.

**A:** Western Blots. **B:** Relative Quantifizierung.

M=Marker/ Größenstandard. One-Way-ANOVA, n=4, \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001.

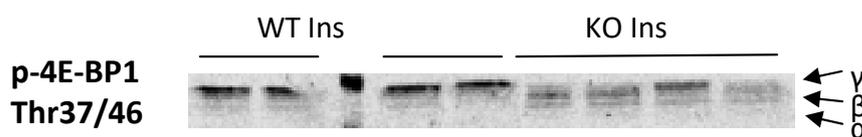
Im

Gegensatz zu den Untersuchungen der Herzen nach Stimulation *in vivo*, zeigt sich für alle Proteine, dass sich eine basale Phosphorylierung nach Langendorff-Perfusion fast nicht mehr nachweisen lässt. Außerdem führt die Induktion mit Insulin für die meisten Proteine zu einem viel stärkeren Anstieg der Phosphorylierungssignale. So führt Insulinstimulation in den WT-Herzen zu einer signifikanten Steigerung der Phosphorylierung von p-mTOR (Ser2481), p-p70S6K (Thr389), p-S6 (Ser235/236) und p-PRAS40 (Thr246). Diese stimulationsbedingte Zunahme der Phosphorylierung ist in iCM-AKT1/2-KO-

Herzen signifikant geringer ausgeprägt. Die Western Blots zeigen, dass das AKT-Signalling über den mTORC1-Signalweg in insulinstimulierten, nach Langendorff perfundierten Herzen nach iCM-AKT1/2-KO deutlich eingeschränkt ist. Die im iCM-AKT1/2-KO messbare geringe Zunahme der Phosphorylierung nach Stimulation könnte auf Stimulationseffekte in nicht kardiomyozytären Zellen zurückzuführen sein.

Abbildung 17 zeigt einen Western Blot zur Phosphorylierung von 4E-BP1 in Herzen von insulinstimulierten WT- und iCM-AKT1/2-KO-Mäusen. Es lässt sich eine starke Phosphorylierung von 4E-BP1 in WT-Herzen durch Insulin auslösen, da bei Insulingabe fast nur die zur hyperphosphorylierten Form gehörige  $\gamma$ -Bande auftritt. In den iCM-AKT1/2-KO-Herzen bleibt dieser Effekt aus und es lassen sich alle 3 Formen mit verstärktem Auftreten der  $\beta$ -Form identifizieren.

Dies zeigt, dass AKT-abhängige Phosphorylierung von 4E-BP1 in insulinstimulierten, nach Langendorff perfundierten Herzen nach iCM-AKT1/2-KO eingeschränkt ist. Der geringe Nachweis der hyperphosphorylierten Form im iCM-AKT1/2-KO ist auch hier mutmaßlich auf stimulierte Phosphorylierung in nicht kardiomyozytären Zelltypen zurückzuführen.



**Abb. 17: Effekt des iCM-AKT1/2-KOs auf die Phosphorylierung von 4E-BP1. Insulinstimulation von nach Langendorff perfundierten Herzen**

Phosphorylierung von 4E-BP1 von nach Langendorff perfundierten, insulinstimulierten Herzen von WT- und iCM-AKT1/2-KO-Mäusen an Tag 7 nach Induktion des KOs. Exemplarische Markierung der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Banden (vgl. Text).

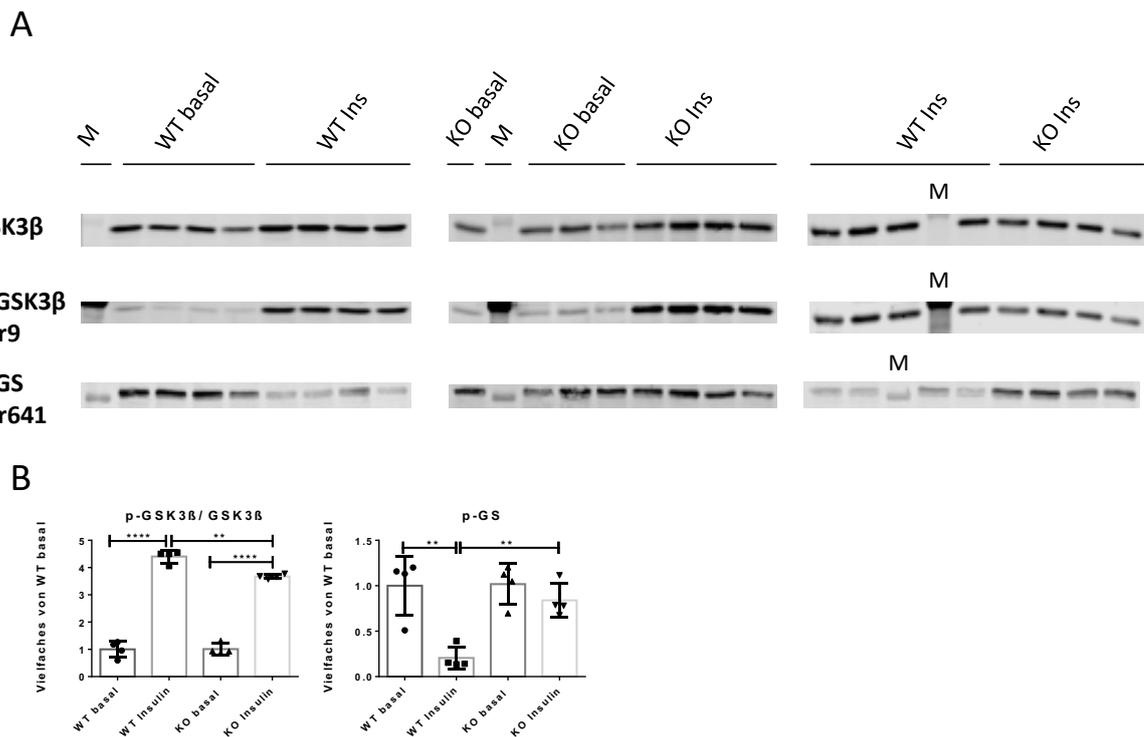
### **3.2.3.2 GSK3 $\beta$ -Signalweg - Insulinstimulation**

Wie in Abbildung 18 zu erkennen ist, liegt unter Insulinstimulation sowohl in den Herzen der WT-Mäuse als auch in den Herzen der iCM-AKT1/2-KO-Mäuse ein signifikant gesteigerter pGSK3 $\beta$ (Ser9) / GSK-Quotient im Vergleich zu den basalen Herzen des jeweiligen Genotyps vor. Der Ser9-Phosphorylierungsgrad der GSK3 $\beta$  ist im insulinstimulierten iCM-AKT1/2-KO signifikant gegenüber dem stimulierten WT erniedrigt.

Als Effekt der Insulinstimulation ist die Phosphorylierung der GS an Ser641 in den stimulierten WT-Herzen signifikant geringer als in den basalen WT-Herzen. In den iCM-AKT1/2-KO-Herzen fehlt dieser Stimulationseffekt und die Ser641-Phosphorylierung liegt in stimuliertem und basalem Zustand auf ähnlichem Niveau. Die GS ist in den stimulierten iCM-AKT1/2-KO Herzen signifikant stärker an Ser641 phosphoryliert als in den stimulierten WT-Herzen.

Die Western Blots zeigen interessanterweise, dass es auch im iCM-AKT1/2-KO nach Insulinstimulation zu einem deutlichen Anstieg der Ser9-Phosphorylierung der GSK3 $\beta$  kommt, wenngleich dieser geringer ausgeprägt ist als im WT. Die Insulin-vermittelte Abnahme der GS-Ser641-Phosphorylierung ist in

Langendorff perfundierten Herzen nach iCM-AKT1/2-KO deutlich eingeschränkt.



**Abb. 18: Einfluss des iCM-AKT1/2-KOs auf die AKT-vermittelte Regulation der Glykogensynthese. Insulinstimulation von nach Langendorff perfundierten Herzen**

Phosphorylierungsgrad der GSK3β und der GS in nach Langendorff perfundierten, insulinstimulierten und basalen Herzen von WT- und iCM-AKT1/2-KO-Mäusen an Tag 7 nach Induktion des KO.

**A:** Western Blots. **B:** Relative Quantifizierung.

M=Marker/ Größenstandard. One-Way-ANOVA, n=4, \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001.

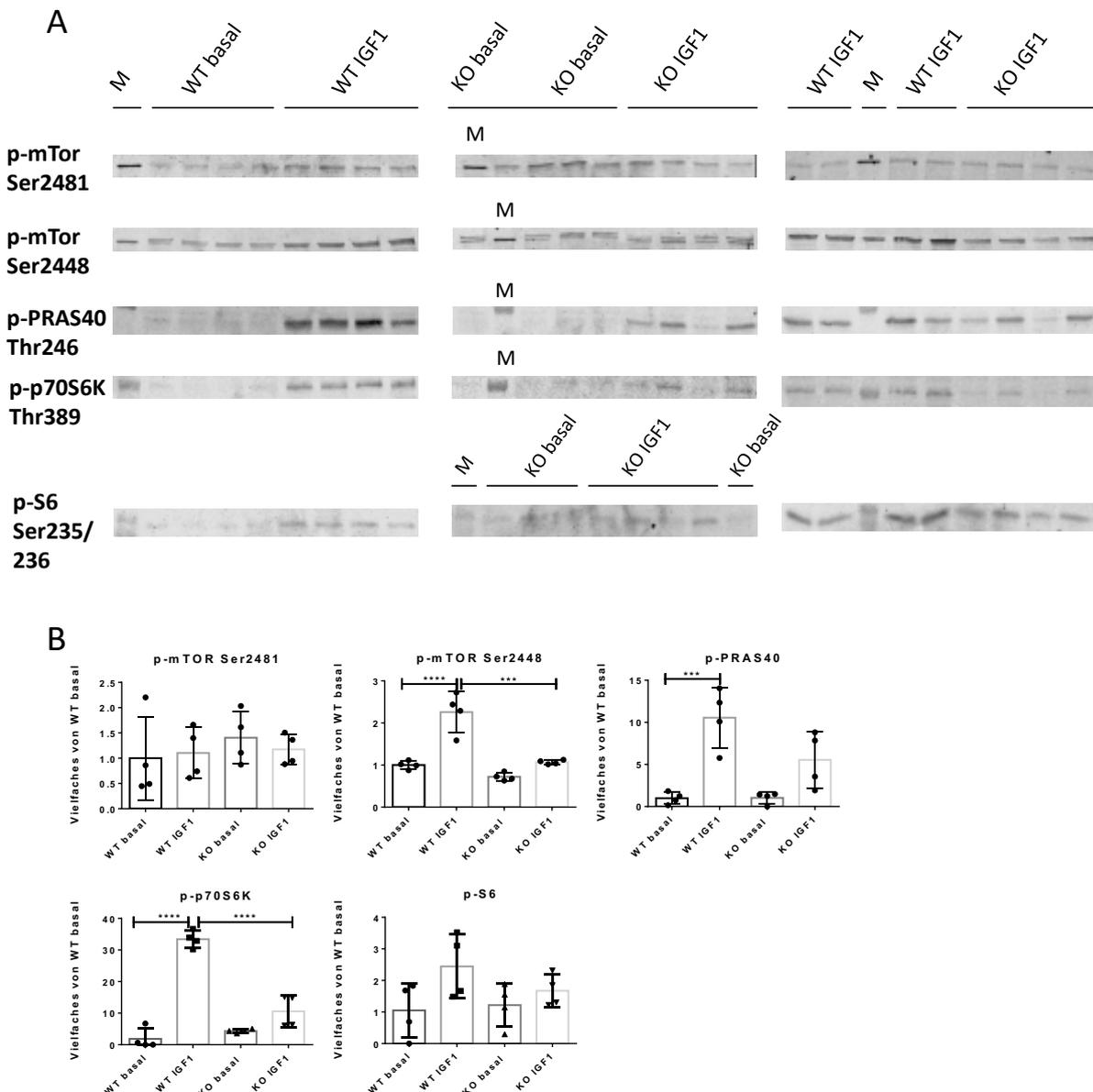
### 3.2.3.3 mTORC/ p70S6K-Signalweg - IGF-1 Stimulation

Die Western Blots zur Phosphorylierung von Proteinen des mTORC/ p70S6K-Signalwegs sind mit Quantifizierung in Abbildung 19 dargestellt.

Für p-mTOR (Ser2448), p-p70S6K (Thr389), p-S6 (Ser235/236) und p-PRAS40 (Thr246) zeigen sich in den Western Blots gleichsinnige Einflüsse von IGF1 auf die stimulierte Phosphorylierung in iCM-AKT1/2-KOs. Die Stimulation mit IGF1 führt in den Herzen der WT-Mäuse zu einer gesteigerten Phosphorylierung der betrachteten Aminosäurereste der genannten Proteine im Vergleich zu den basalen WT-Herzen. Dieser Effekt ist für p-mTORSer2448, p70S6K und PRAS40 statistisch signifikant. In den iCM-AKT1/2-KO Herzen ist die Zunahme der Phosphorylierung unter Stimulation geringer ausgeprägt und jeweils nicht signifikant. Die Phosphorylierung der betrachteten Aminosäurereste ist in den stimulierten WT-Herzen jeweils höher als in den stimulierten iCM-AKT1/2-KO-Herzen, wobei dieser Unterschied für p-mTOR (Ser2448) und p-P70S6K statistisch signifikant ist.

Hinsichtlich der Phosphorylierung von mTOR an Ser2481 treten keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen auf.

Die Western Blots zeigen, dass das AKT-Signalling über den mTORC1-Signalweg in IGF1-stimulierten, nach Langendorff perfundierten Herzen nach iCM-AKT1/2-KO deutlich eingeschränkt ist.



**Abb. 19: Einfluss des iCM-AKT1/2-KOs auf die AKT-vermittelte Regulation der Proteinbiosynthese. IGF1-Stimulation von nach Langendorff perfundierten Herzen**

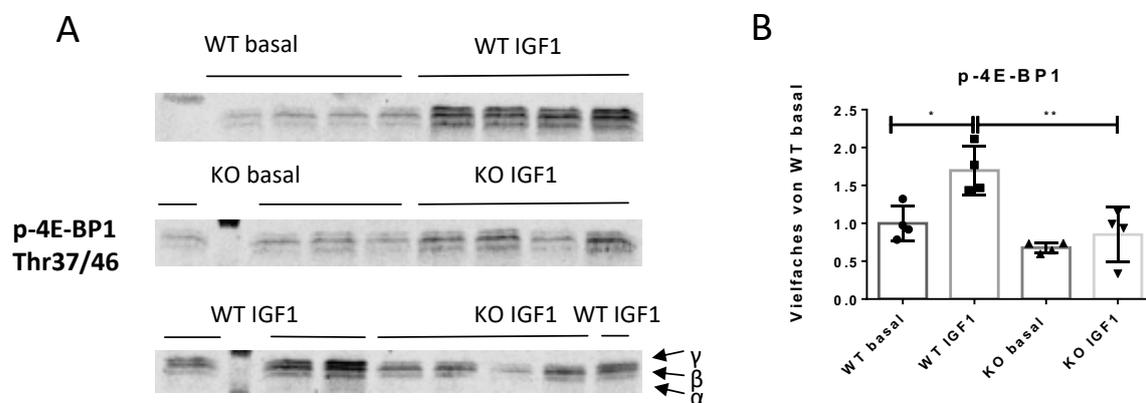
Phosphorylierung verschiedener Aminosäurereste von Proteinen des p70S6K-Signalwegs in nach Langendorff perfundierten, IGF1-stimulierten Herzen von WT- und iCM-AKT1/2-KO-Mäusen an Tag 7 nach Induktion des KO. **A:** Western Blots. **B:** Relative Quantifizierung.

M=Marker/ Größenstandard. One-Way-ANOVA, n=4, \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001.

Abbildung 20 zeigt den Western Blot zu p-4E-BP1 mit relativer Quantifizierung, wobei  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Bande gemeinsam quantifiziert wurden.

Im Wildtyp zeigt sich eine signifikante Zunahme der Phosphorylierung der AKT-abhängigen Phosphorylierungsstellen von p-4E-BP1 unter IGF1-Stimulation. Nach IGF1-Stimulation dominiert im WT die hyperphosphorylierte  $\gamma$ -Form von 4E-BP1, während im basalen Zustand die  $\beta$ -Form die höchste Intensität aufweist. Dieser Stimulationseffekt tritt in den iCM-AKT1/2-KO Herzen nicht auf. Hier ist im basalen und stimulierten Zustand jeweils die  $\beta$ -Form dominant. 4E-BP1 ist in den stimulierten iCM-AKT1/2-KO Herzen signifikant weniger an den AKT-abhängigen Phosphorylierungsstellen phosphoryliert als in den stimulierten WT-Herzen.

Die Western Blots zeigen, dass die AKT-abhängige Phosphorylierung von 4E-BP1 in IGF1-stimulierten, nach Langendorff perfundierten Herzen nach iCM-AKT1/2-KO signifikant eingeschränkt ist.



**Abb. 20: Effekt des iCM-AKT1/2-KOs auf die Phosphorylierung von 4E-BP1. IGF1-Stimulation von nach Langendorff perfundierten Herzen**

Phosphorylierungsgrad von 4E-BP1 in nach Langendorff perfundierten, IGF1-stimulierten Herzen von WT- und iCM-AKT1/2-KO-Mäusen an Tag 7 nach Induktion des KO.

**A:** Western Blots. Exemplarische Markierung der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Banden (vgl. Text).

**B:** Quantifizierung.

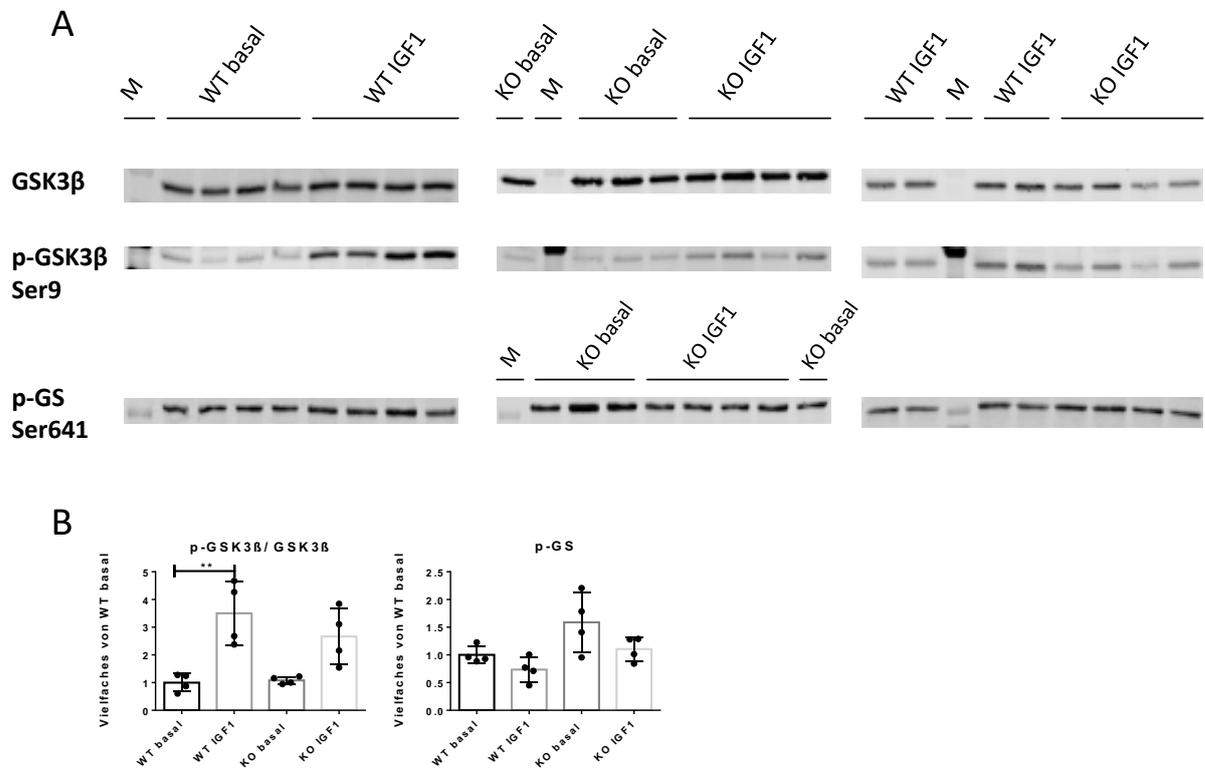
M=Marker/ Größenstandard. One-Way-ANOVA, n=4, \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001

### 3.2.3.4 GSK3 $\beta$ -Signalweg - IGF-1 Stimulation

Wie in Abbildung 21 zu erkennen, nimmt das p-GSK3 $\beta$ (Ser9)/ GSK3 $\beta$ -Verhältnis in den Herzen der Wildtyp-Mäuse unter IGF1-Stimulation signifikant zu. Auch in den iCM-AKT1/2-KO Herzen kommt es interessanterweise zu einer deutlichen, jedoch im Vergleich zum WT geringer ausgeprägten Zunahme der Ser9-Phosphorylierung der GSK3 $\beta$  nach Insulinstimulation (Vergleich iCM-AKT1/2-KO basal mit iCM-AKT1/2-KO stimuliert: p-Wert: 0,061). Der p-GSK3 $\beta$ (Ser9) /GSK3 $\beta$ -Quotient ist in den stimulierten iCM-AKT1/2-KO Herzen nicht signifikant gegenüber dem der stimulierten WT-Herzen vermindert.

In WT und iCM-AKT-1/2 ist eine nicht signifikante Abnahme der Phosphorylierung der GS an Ser641

unter IGF1-Stimulation zu beobachten. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede der GS-Phosphorylierung an Ser641 zwischen stimuliertem WT und stimuliertem iCM-AKT1/2-KO.



**Abb. 21: Einfluss des iCM-AKT1/2-KOs auf die AKT-vermittelte Regulation der Glykogensynthese. IGF1-Stimulation von nach Langendorff perfundierten Herzen**

Phosphorylierung der GSK3β und der GS von nach Langendorff perfundierten, IGF1-stimulierten und basalen Herzen von WT- und iCM-AKT1/2-KO-Mäusen an Tag 7 nach Induktion des KO.

**A:** Western Blots. **B:** Relative Quantifizierung.

M=Marker/ Größenstandard. One-Way-ANOVA, n=4, \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001.

### **3.3 GLUT-Transporter**

Bei der Analyse von Frau Dr. S. Gödecke zur Verfügung gestellter mRNA-Microarrays hinsichtlich der Expression kardialer Glukosetransporter zeigt sich eine 1,64-fache Induktion der GLUT1-mRNA in den Herzen des iCM-AKT1/2-KO gegenüber den WT-Herzen an d10 und eine 3,12-fache Induktion an d21 nach Beginn der OH-Tamoxifen-Injektion. Hinsichtlich der GLUT4-mRNA wurde kein Expressionsunterschied zwischen den Genotypen zu diesen Zeitpunkten festgestellt. Um die Beobachtungen aus den Microarrays auf Proteinebene zu untersuchen, wurde in Western Blots jeweils die kardiale GLUT 1- und GLUT 4-Proteinmenge von WT- und iCM-AKT1/2-KO-Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion des Knockouts (d7, d10, d21) miteinander verglichen.

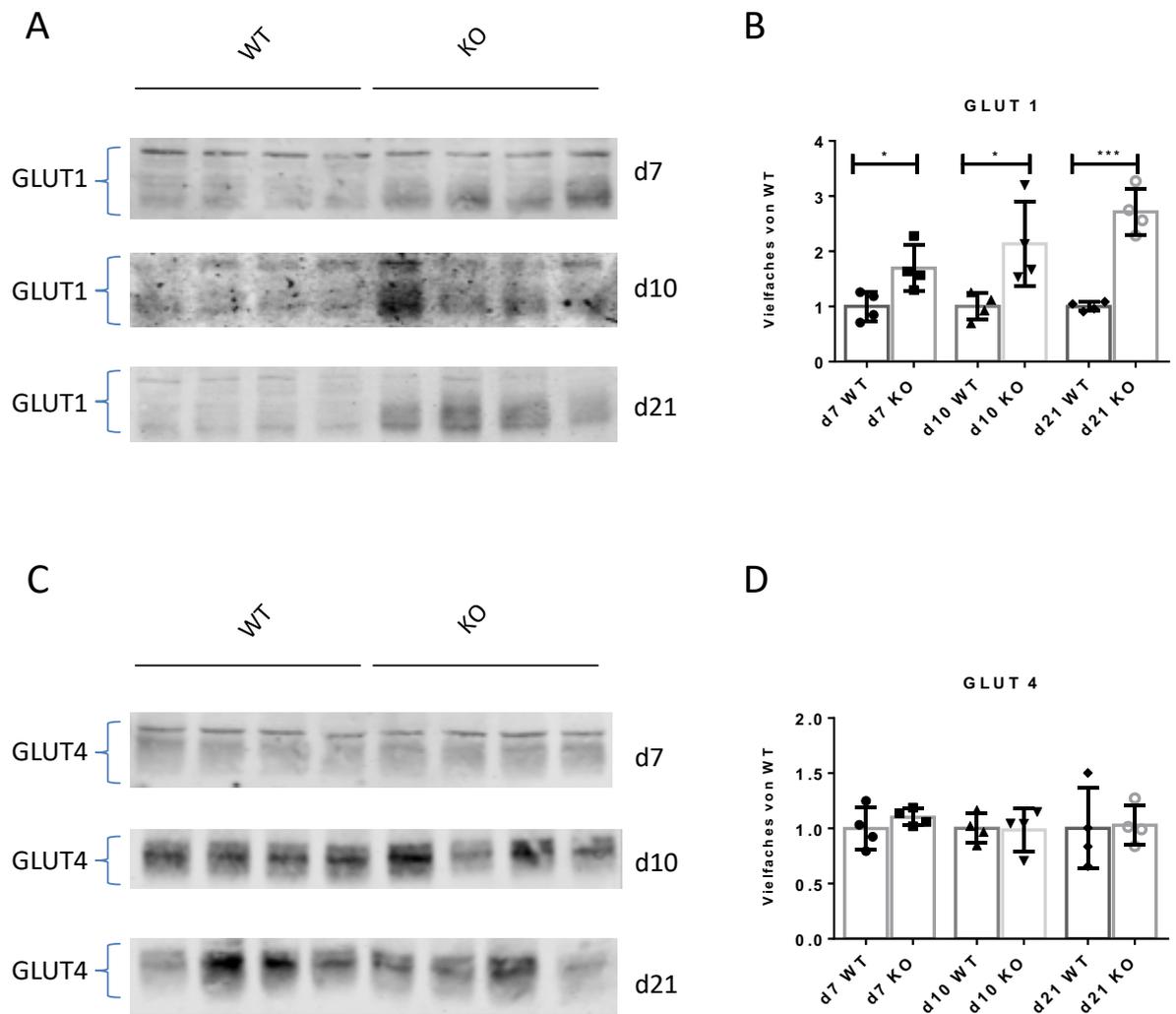
#### **3.3.1 GLUT1-Proteinmenge in WT und KO**

In Abbildung 22 Abschnitt A und B sind die Western Blots, die zum Vergleich der kardialen GLUT1-Proteinmenge von WT und iCM-AKT1/2-KO durchgeführt wurden, dargestellt. Es ergibt sich eine signifikant vermehrte GLUT1-Proteinmenge in den iCM-AKT1/2-KO Herzen im Vergleich zu den WT-Herzen zu allen untersuchten Zeitpunkten nach Beginn der OH-Txf-Injektion (d7, d10, d21). Dabei ist der Unterschied zwischen WT und iCM-AKT1/2-KO umso größer, je später nach Beginn der KO-Induktion die Herzen entnommen wurden (d7: Faktor: 1,7; d10: Faktor: 2,13; d21: Faktor: 2,72).

#### **3.3.2 GLUT4-Proteinmenge in WT und KO**

In Abschnitt C und D sind die Western Blots zur Untersuchung der kardialen GLUT4-Proteinmenge und das Ergebnis der Auswertung dargestellt.

Man sieht, dass zu keinem der untersuchten Zeitpunkte ein signifikanter Unterschied zwischen WT- und iCM-AKT1/2-KO besteht.



**Abb. 22: GLUT1- und GLUT4-Proteinmenge in iCM-AKT1/2-KO und WT zu verschiedenen Zeitpunkten nach KO-Induktion**

**A:** Western Blots zur kardialen GLUT1-Proteinmenge. **B:** Relative Quantifizierung. **C:** Western Blots zur kardialen GLUT4-Proteinmenge. **D:** Relative Quantifizierung.

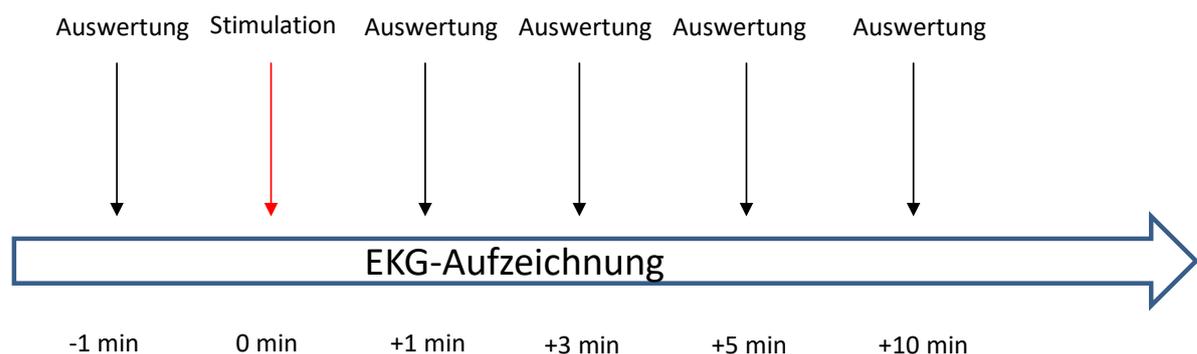
Ungepaarter t-Test, n=4, \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001.

### **3.4. Bedeutung von AKT für die kardiale Erregungsleitung der Maus**

#### **3.4.1 Einfluss einer Insulinstimulation auf das EKG der WT-Maus**

Ausgehend von dem in der Einleitung beschriebenen Zusammenhang zwischen AKT und dessen Substrat Connexin43 sollte untersucht werden, ob ein direkter Effekt der AKT-Aktivität auf die kardiale Erregungsleitung gemessen werden kann.

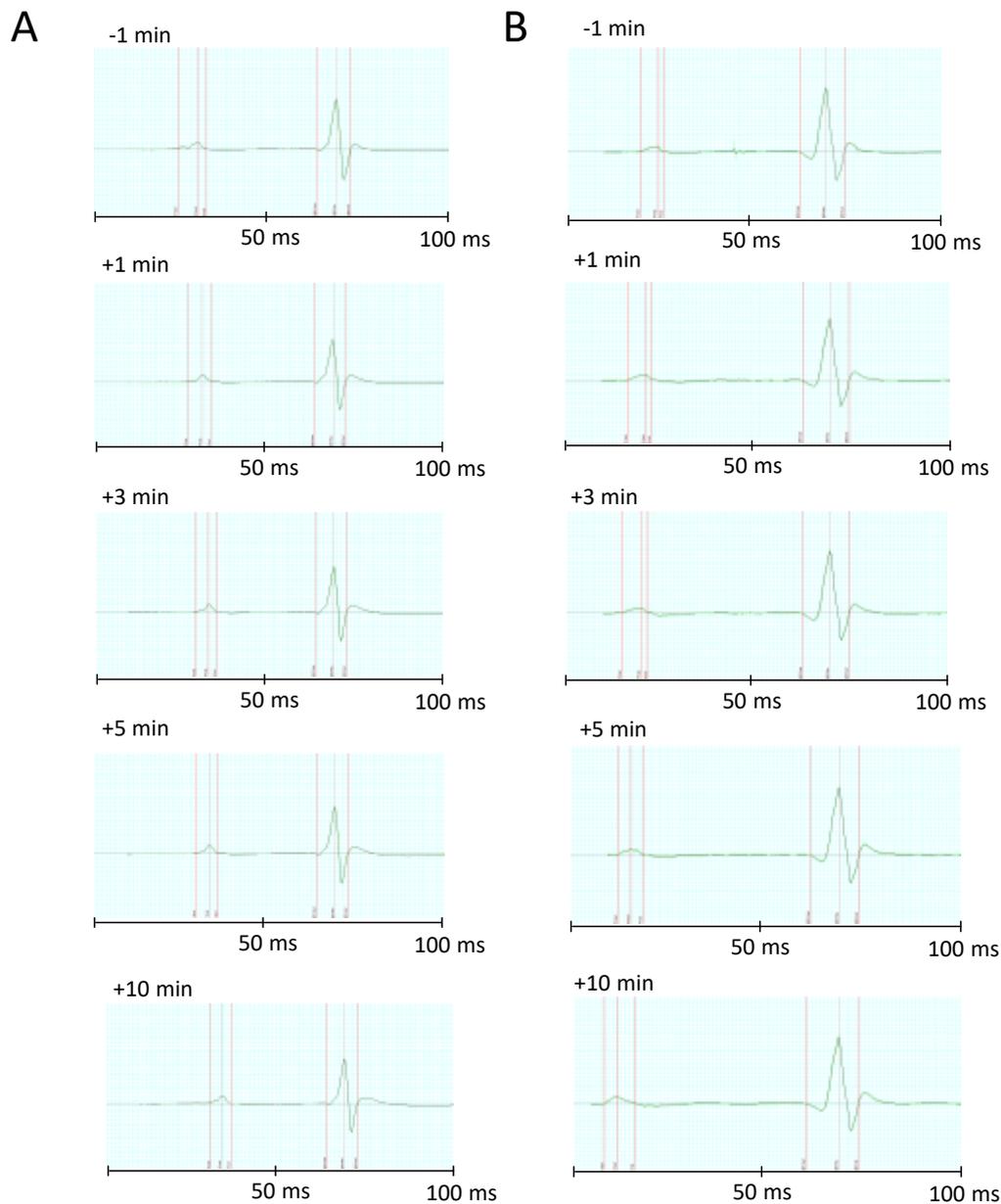
Zu diesem Zweck wurden, wie in Abbildung 23 schematisch dargestellt, die EKGs von 3 insulinstimulierten und 3 unbehandelten WT-Mäusen 1 Minute vor sowie 1, 3, 5 und 10 Minuten nach Applikation ausgewertet (s. „Material& Methoden“).



**Abb. 23: Untersuchung des Effekts der Insulinstimulation auf das WT-EKG**

##### **3.4.1.1 Einfluss der Insulinstimulation auf die EKG-Morphologie der WT-Maus**

In Abbildung 24 sind für je eine basale WT-Maus (A) und eine insulinstimulierte WT-Maus (B) beispielhafte EKG-Komplexe jeweils 1 Minute vor sowie 1, 3, 5 und 10 Minuten nach der jeweiligen „Stimulation“ dargestellt. Es treten keine morphologischen Veränderungen oder Auffälligkeiten der EKGs der insulinstimulierten Mäuse im Zeitverlauf in Antwort auf die Insulinstimulation auf. Auch in der basalen Gruppe lassen sich keine Veränderungen beobachten.

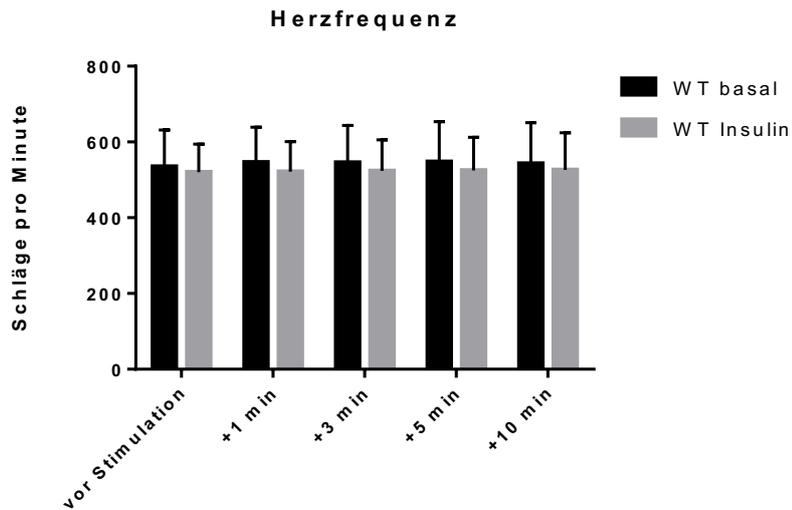


**Abb. 24: Morphologie der EKG-Kurve einer basalen (PBS-behandelten) (A) und einer insulinstimulierten (B) WT-Maus**

Exemplarische EKG-Komplexe der basalen (A) und insulinstimulierten (B) WT-Maus zu verschiedenen Zeitpunkten vor (-) und nach (+) intraperitonealer Insulinstimulation. Es treten jeweils keine deutlichen morphologischen Veränderungen der EKG-Kurven auf.

### **3.4.1.2 Einfluss der Insulinstimulation auf die Herzfrequenz**

Sowohl für die Gruppe der PBS-behandelten- als auch für die der insulinstimulierten WT-Mäuse wurden keine signifikanten Unterschiede der Werte für die mittlere Herzfrequenz zwischen den verschiedenen Messzeitpunkten nachgewiesen. Zudem bestand zu keinem der Messzeitpunkte ein signifikanter Unterschied der mittleren Herzfrequenz zwischen den Gruppen der PBS- und der insulinstimulierten WT-Mäuse (Abb. 25).

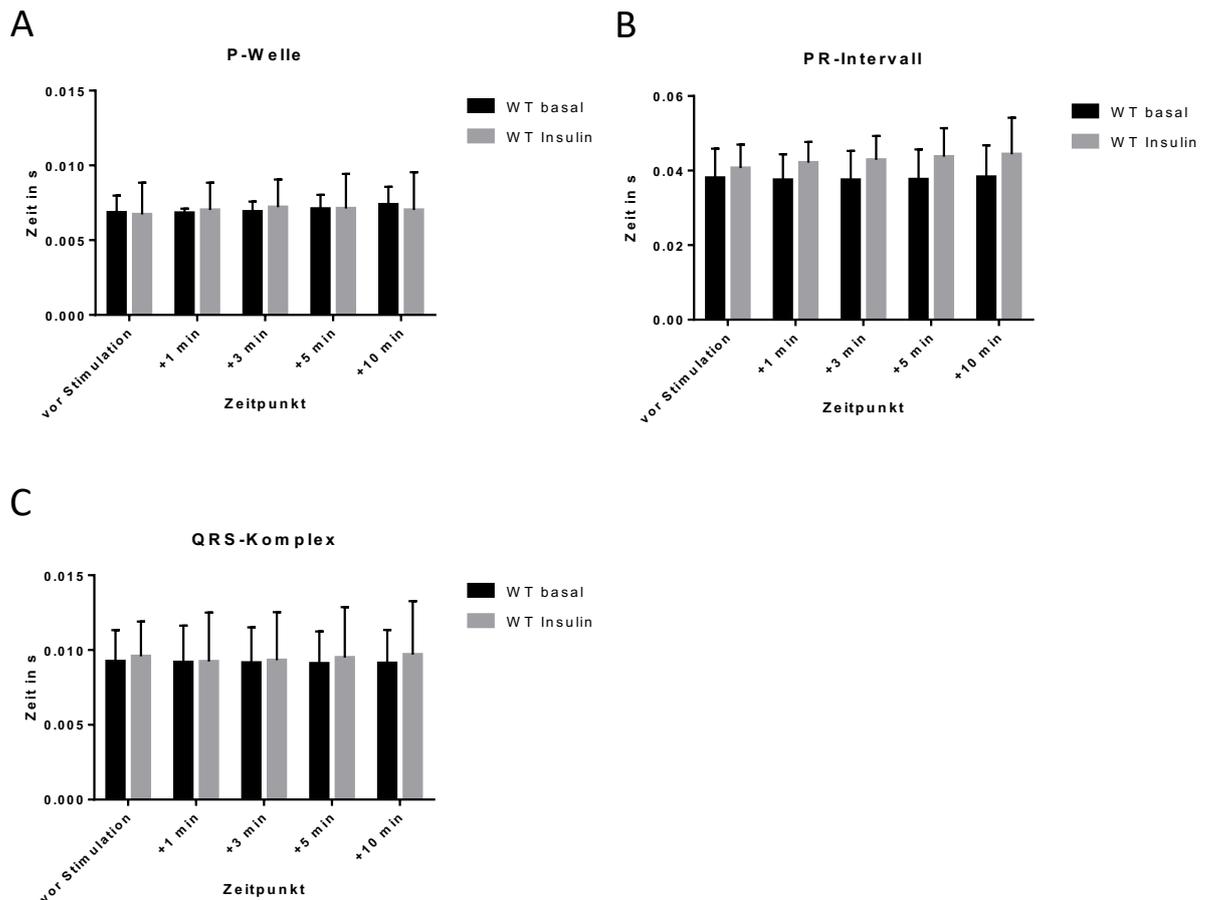


**Abb. 25: Mittlere Herzfrequenz im Zeitverlauf**

Es ist die mittlere Herzfrequenz von insulinstimulierten und basalen WT-Mäusen zu den Zeitpunkten 1 Minute vor und 1, 3, 5 und 10 Minuten nach Stimulation angegeben. Repeated measures two-way-ANOVA, WT basal n=3, WT + Insulin n=3, ns = nicht signifikant

### **3.4.1.3 Einfluss der Insulinstimulation auf EKG-Intervalle**

Sowohl in der Gruppe der basalen als auch in der der insulinstimulierten Mäuse traten keine signifikanten Unterschiede in der P-Dauer, QRS-Dauer oder PR-Dauer im Zeitverlauf auf (Abb. 26). Darüber hinaus bestand zu keinem der Messzeitpunkte ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den basalen und den insulinstimulierten WT-Mäusen hinsichtlich der mittleren Dauer der untersuchten Intervalle. Diese Daten zeigen, dass akute Insulingabe nicht zu einer wesentlichen Veränderung der Erregungsausbreitung im Mausherzen führt.



**Abb. 26: P-Welle, PR-Intervall und QRS-Intervall im Zeitverlauf.**

Es sind für P-Welle (A), PR-Intervall (B) und QRS-Komplex (C) jeweils die mittleren Dauern für die insulinstimulierten und die basalen WT-Mäuse zu den Zeitpunkten 1 Minute vor und 1, 3, 5 und 10 Minuten nach Stimulation angegeben. Repeated measures two-way-ANOVA, WT basal n=3, WT + Insulin n=3.

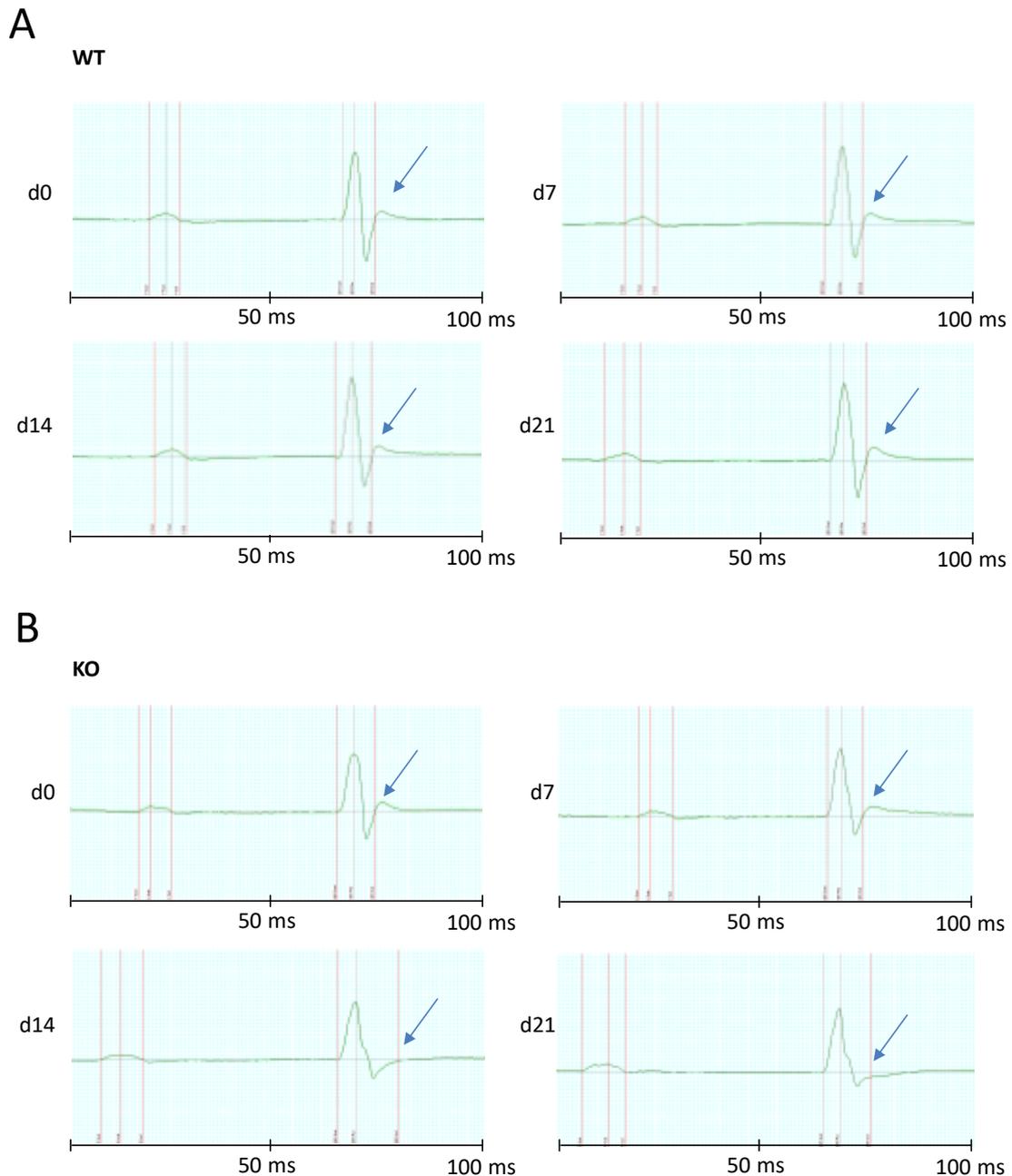
### **3.4.2 Einfluss des iCM-AKT1/2-KO auf das murine Oberflächen-EKG**

Um den Einfluss des iCM-AKT1/2-KO auf die kardiale Erregungsleitung zu untersuchen wurden Oberflächen-EKGs von WT- und iCM-AKT1/2-KO-Mäusen an d0, d7, d14 und d21 nach Beginn der OH-Tamoxifen-Injektion verglichen.

#### **3.4.2.1 Einfluss des iCM-AKT1/2-KOs auf die EKG-Morphologie**

Hinsichtlich der Veränderung der Morphologie der EKG-Kurven im Zeitverlauf fallen Unterschiede zwischen WT- und iCM-AKT1/2-KO-Mäusen auf. Die Morphologie der EKG-Kurven verhält sich bei allen untersuchten Tieren eines Genotyps im Zeitverlauf jeweils gleich. In Abbildung 27A sind für eine WT- und in Abbildung 27B für eine iCM-AKT1/2-KO-Maus jeweils beispielhafte, den verschiedenen Messzeitpunkten zugeordnete EKG-Komplexe abgebildet. Während bei den WT-Mäusen keine Veränderungen der EKG-Komplexe im Zeitverlauf auftreten, fallen in den EKGs aller iCM-AKT1/2-KO-Mäuse ab d14 gleichartige Veränderungen im Bereich der J-Welle auf. Während sich der an d7

aufgezeichnete EKG-Komplex nicht von dem an d0 aufgezeichneten EKG-Komplex bzw. den Komplexen der WT-Mäuse unterscheidet, fällt an d14 und d21 ein Fehlen der J-Welle auf. Dabei kommt es nach dem Umschlagspunkt der negativ konfigurierten S-Zacke zwar zu einem Anstieg der EKG-Kurve in Richtung der isoelektrischen Linie, eine klar abgrenzbare J-Welle fehlt aber. Stattdessen nähert sich die EKG-Kurve nach dem Anstieg aus der S-Zacke in Richtung der isoelektrischen Linie mit abflachender Steigung dieser Linie an. Die beschriebene Auffälligkeit findet sich in gleicher Form in den EKGs aller untersuchter iCM-AKT1/2-KO-Mäuse ab d14, jedoch in keiner der WT-Mäuse.



**Abb. 27: EKG-Komplexe von je einer WT- (A) und iCM-AKT1/2-KO-Maus (B) im Zeitverlauf**

Es ist für jeden Genotyp/ Zeitpunkt jeweils ein exemplarische EKG-Komplex abgebildet. Die (fehlende) J-Welle ist jeweils mit einem Pfeil markiert.

### 3.4.2.2 Einfluss des iCM-AKT1/2-KOs auf die Herzfrequenz

In Abbildung 28 sind die Ergebnisse der Analyse der EKGs von WT und iCM-AKT1/2-KO für die Herzfrequenz dargestellt. Es liegt keine statistisch signifikante Interaktion vor, d.h. der Einfluss des Zeitpunkts auf die Herzfrequenz hängt nicht vom Genotyp ab. Innerhalb der Genotypen nimmt die mittlere Herzfrequenz jeweils im Zeitverlauf ab. Im WT ist die mittlere Herzfrequenz der untersuchten Tiere an d14 und d21 jeweils signifikant gegenüber der Herzfrequenz an d0 verringert. Bei den iCM-AKT1/2-KO-Tieren ist die mittlere Herzfrequenz an d14 signifikant verringert im Vergleich zu den an d0, d7 und d21 ermittelten Werten. Zudem ist die mittlere Herzfrequenz an d21 signifikant niedriger als an d0. Zwischen den Genotypen besteht zu keinem der Messzeitpunkte ein signifikanter Unterschied. Die biologische Bedeutung der zu späteren Messzeitpunkten deutlich geringeren Herzfrequenz ist bei Auftreten in WT und iCM-AKT1/2-KO unklar und wird im Teil „Diskussion“ erörtert.

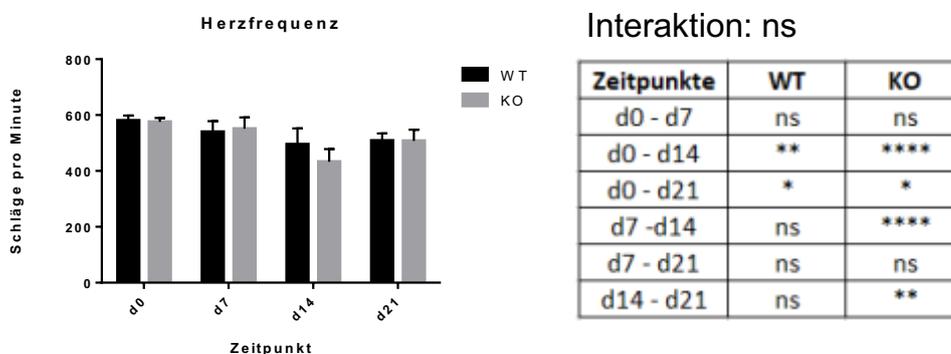


Abb. 28: Mittlere Herzfrequenz im Zeitverlauf

Es sind WT und iCM-AKT1/2-KO die mittlere Herzfrequenz zu den Zeitpunkten d0, d7, d14 und d21 angegeben. Unterschiede zwischen WT und iCM-AKT1/2-KO sind im Balkendiagramm markiert. Etwaige Interaktionen sowie signifikante Unterschiede innerhalb eines Genotyps zwischen den Werten verschiedener Zeitpunkte sind in der Tabelle dargestellt.

Repeated measures two-way-ANOVA, WT n=4, KO n=5, \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001.

### 3.4.2.3 Einfluss des iCM-AKT1/2-KOs auf EKG-Wellen und -Intervalle

In Abbildung 30 sind die Ergebnisse des Vergleichs der EKGs von WT- und iCM-AKT1/2-KO bezüglich der Dauer der P-Welle (A), des QRS-Intervalls (B) und des PR-Intervalls (C) mittels repeated measures two-way-ANOVA dargestellt.

#### P-Welle:

Für die Dauer der P-Welle ergibt sich keine signifikante Interaktion zwischen dem Messzeitpunkt und dem Genotyp. Abbildung 30A zeigt, dass für WT- und iCM-AKT1/2-KO Mäuse jeweils die mittlere Dauer der P-Welle an d14 und d21 gegenüber den Werten an d0 und d7 erhöht ist. Für die WT-Mäuse gibt es keine signifikanten Unterschiede der P-Dauer zwischen den verschiedenen Messzeitpunkten. Die mittlere P-Dauer variiert in den EKGs der iCM-AKT1/2-KO Mäuse signifikant zwischen d0 und d14, d0 und d21 sowie d7 und d14, wobei jeweils die Dauer der P-Welle zum späteren zweier verglichener Messzeitpunkte gegenüber dem früheren Messzeitpunkt verlängert ist. Eine statistisch signifikante

Differenz der P-Dauer zwischen den beiden Genotypen lässt sich zu keinem der Messzeitpunkte feststellen.

#### **PR-Intervall:**

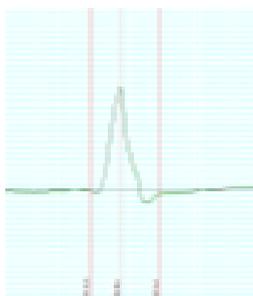
Es liegt ebenfalls keine signifikante Interaktion zwischen Messzeitpunkt und Genotyp für die PR-Dauer vor. In Abbildung 30B ist für beide Genotypen jeweils eine Zunahme der mittleren Dauer des PR-Intervalls an d14 und d21 gegenüber den an d0 und d7 vorliegenden Werten zu erkennen. In der Gruppe der WT-Mäuse ist das mittlere PR-Intervall an d21 signifikant verlängert gegenüber den Zeitpunkten d0 und d7. Bei den iCM-AKT1/2-KO Mäusen ist das PR-Intervall an d14 und d21 jeweils signifikant größer als an d0 und d7. Zu keinem der untersuchten Messzeitpunkte gibt es signifikante Unterschiede zwischen den beiden Genotypen. Da die signifikante Zunahme des PR-Intervalls im Zeitverlauf sowohl im WT als auch im iCM-AKT1/2-KO auftritt und die PR-Dauer abhängig von der Herzfrequenz ist, ist wie bei dieser die biologische Bedeutung der Ergebnisse unklar.

#### **QRS-Komplex:**

In den EKGs der iCM-AKT1/2-KO-Mäuse ab d14, bei denen morphologisch das Fehlen der J-Welle aufgefallen ist, wurde der Beginn des ersten deutlichen Abflachens des positiven Anstiegs aus der S-Zacke als Marker für das Ende des QRS-Komplexes gewählt (vgl. Abb. 29). Die Problematik der QRS-Begrenzung bei fehlender J-Welle wird im Abschnitt „Diskussion“ erörtert. In Abbildung 30C ist zu erkennen, dass der mittlere Wert der QRS-Dauer bei den WT-Tieren zu allen Zeitpunkten auf einem ähnlichen Niveau liegt. Demgegenüber ist die QRS-Dauer in den iCM-AKT1/2-KO-Mäusen an d14 und d21 signifikant gegenüber d0 und d7 erhöht. Es lässt sich eine statistisch signifikante Interaktion nachweisen ( $p = 0,0006$ ), d.h. der Einfluss des Messzeitpunkts auf die QRS-Dauer wird vom Genotyp beeinflusst. An d0 ist die mittlere QRS-Dauer im WT signifikant höher als im iCM-AKT1/2-KO. An d7 liegen die Werte für die beiden Gruppen auf einem ähnlichen Niveau, während an d14 und d21 die QRS-Dauer in den iCM-AKT1/2-KO-Mäusen größer ist als in den WT-Mäusen. Die Unterschiede zwischen den Genotypen an d14 und d21 bleiben dabei jedoch unterhalb der Grenze für statistische Signifikanz.

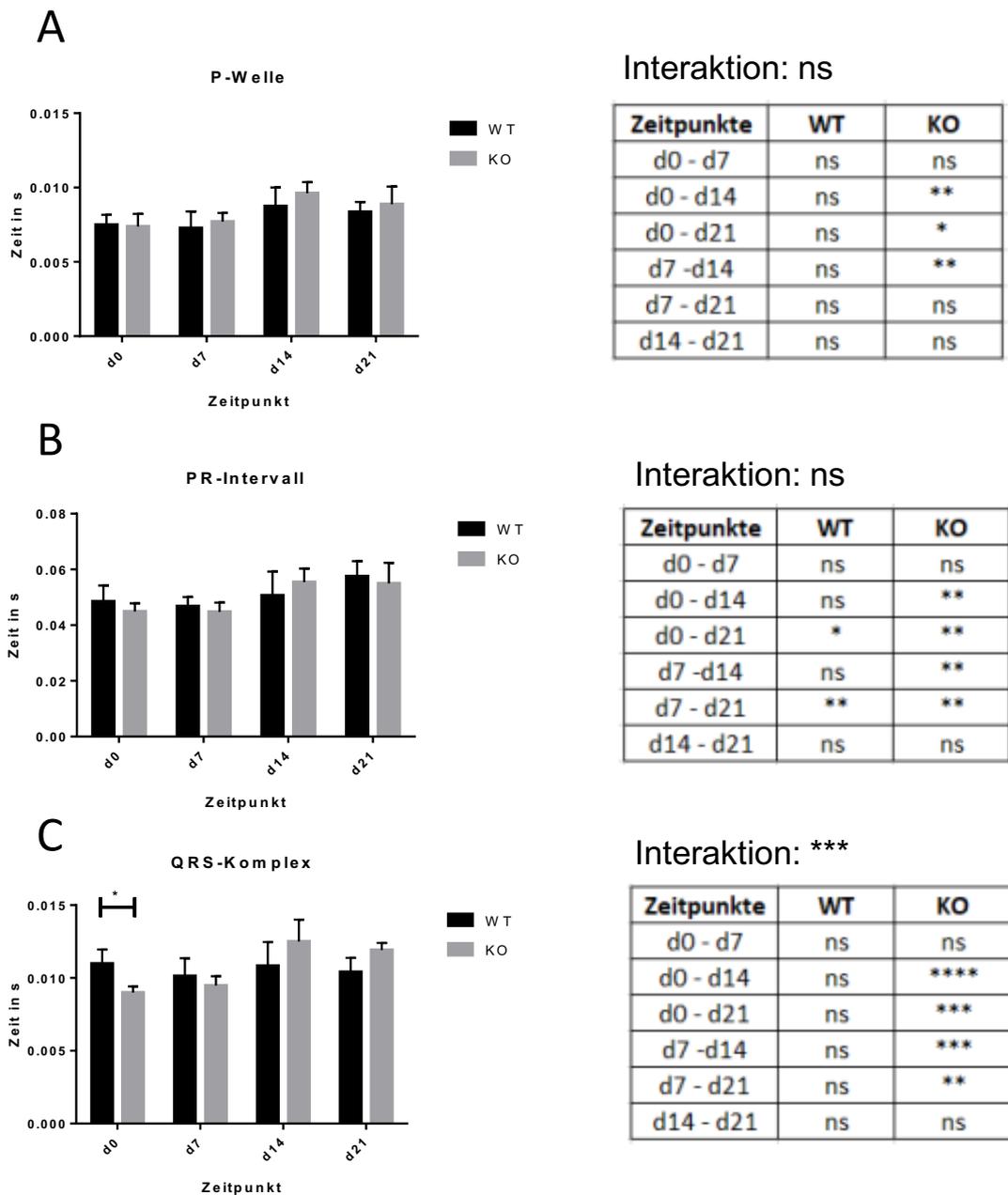
#### **J- und T-Welle:**

Da die T-Welle und auch das Ende der J-Welle in den untersuchten EKGs nicht klar abgrenzbar waren, konnte keine quantitative Auswertung von J- und T-Welle erfolgen.



**Abb. 29: Bestimmung der QRS-Dauer bei fehlender J-Welle**

Als Marker für das QRS-Ende wurde das erste deutliche Abflachen des Anstiegs aus der S-Zacke verwendet.



**Abb. 30: P-Welle, PR-Intervall und QRS-Intervall im Zeitverlauf**

Es sind für P-Welle (A), PR-Intervall (B) und QRS-Komplex (C) jeweils die mittleren Dauern für WT- und iCM-AKT1/2-KO zu den Zeitpunkten d0, d7, d14 und d21 angegeben. Signifikante Unterschiede zwischen WT- und iCM-AKT1/2-KO sind im Balkendiagramm markiert. Etwaige Interaktionen sowie signifikante Unterschiede innerhalb eines Genotyps zwischen den Werten verschiedener Zeitpunkte sind in der Tabelle dargestellt.

Repeated measures two-way-ANOVA, WT n=4, KO n=5, \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001.

### **3.4.3 Expression kardialer Kalium- und Calciumkanäle nach iCM-AKT1/2-KO**

Um mögliche Mechanismen der in Abschnitt 3.4.2 beschriebenen EKG-Veränderungen nach iCM-AKT1/2-KO zu untersuchen, wurden mRNA-Microarrays im Hinblick auf Expressionsveränderungen

kardialer Ionenkanäle in iCM-AKT1/2-KO-Herzen untersucht. Die Daten wurden von Frau Dr. S. Gödecke zur Verfügung gestellt. Da die beobachteten morphologischen EKG-Veränderungen nach AKT-Deletion vor allem den Bereich der Repolarisation betreffen, wurden insbesondere  $K^+$ - und  $Ca^{2+}$ -Kanäle, betrachtet, aufgrund ihrer in der Einleitung erörterten Rolle für die Repolarisation des ventrikulären Aktionspotentials.

Die Tabellen 1 und 2 zeigen die Ergebnisse der Untersuchung der Microarray-Daten für d10 und d21. Es fiel auf, dass eine Vielzahl von Ionenkanälen für  $K^+$ - und  $Ca^{2+}$ - von diesen Veränderungen betroffen waren.

#### **$K^+$ -Kanäle:**

Unter anderem waren in den iCM-AKT1/2-KO-Herzen die  $K^+$ -Kanäle  $I_{to,f}$ ,  $I_{Kur}$  und  $I_{K1}$  an d21 nach iCM-AKT1/2-KO deutlich herunterreguliert. Wie in der Einleitung dargelegt, ist der  $I_{to,f}$ -Strom für die frühe Repolarisation des Aktionspotentials muriner ventrikulärer Myozyten verantwortlich. Wie in Tabelle 1 ersichtlich, ist die Expression der mRNA der für den  $I_{to,f}$ -Strom wichtigen Proteine Kv4.2 (mRNA: Kcnd2) und Kv4.3 (mRNA: Kcnd3) an d21 nach Induktion des Knockouts in den iCM-AKT1/2-KO Herzen um den Faktor 0,39 (Kcnd2) bzw. 0,52 (Kcnd3) herunterreguliert. Der  $I_{Kur}$ -Strom ist für die schnelle initiale Repolarisationsphase des Aktionspotentials verantwortlich (vgl. Einleitung). Auch die mRNA der für den  $I_{Kur}$ -Strom verantwortlichen Proteine Kv3.1, Kv4 ist an d21 in den iCM-AKT1/2-KO-Herzen gegenüber den WT-Herzen expressionsvermindert (Faktor 0,39). An d10 besteht jeweils noch kein Expressionsunterschied der mRNA für die genannten Kanalproteine. Der  $I_{K1}$ -Strom ist für die Repolarisation v.a. später Phasen des Aktionspotentials muriner ventrikulärer Myozyten verantwortlich. Die mRNA des für den  $I_{K1}$ -Strom verantwortlichen Proteins Kir2.2 (mRNA: Kcnj12) ist an d21 auf den Faktor 0,61 in iCM-AKT1/2-KO-Herzen herunterreguliert. An d10 bestehen diesbezüglich keine Expressionsunterschiede zwischen WT- und iCM-AKT1/2-KO Herzen.

Auch die anderen in der Tabelle abgebildeten Kaliumkanäle zeigen an d21 eine um den Faktor 0,3 bis 0,6 verminderte Expression im iCM-AKT1/2-KO. Die Expression des IRK4, Kir2.4-Kanals (Einwärts-gleichrichter 2-Poren Kalium-Kanal) ist im iCM-AKT1/2-KO gegenüber dem WT um den Faktor 8 hochreguliert. Insgesamt liegt an d21 eine ausgeprägte, globale Veränderung der Kaliumkanalexpression vor. Diese könnte auf Grund der Bedeutung für die Repolarisation zum Teil den beobachteten Verlust der J-Welle in den EKGs der iCM-AKT1/2-KO-Mäuse erklären. Dies wird in der Diskussion erörtert.

#### **$Ca^{2+}$ -Kanäle:**

Tabelle 2 zeigt Expressionsveränderungen der Gene verschiedener  $Ca^{2+}$ -Kanal-Untereinheiten nach iCM-AKT1/2-KO, die vor allem die T-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanäle betreffen. An d10 ist die Transkription des Cacna2d1 Gens (spannungsabhängiger  $Ca^{2+}$ -Kanal) sowie des Cacna1g-Gens (spannungsabhängiger T-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanal) in den Herzen des iCM-AKT1/2-KO gegenüber dem WT vermindert. An d21 ist die Expression mehrerer Gene für spannungsabhängige  $Ca^{2+}$ -Kanäle, am ausgeprägtesten des Cacna1-Gens (spannungsabhängiger T-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanal), im iCM-AKT1/2-KO gegenüber dem WT vermindert,

während die Expression des Cacng7- (spannungsabhängiger Ca<sup>2+</sup>-Kanal) und Cacna1b-Gens (spannungsabhängiger N-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanal) um das jeweils 1,5-fache gegenüber dem WT gesteigert ist.

Gen	Protein	Strom	Expressionsveränderungen nach iCM-AKT1/2-KO als Vielfaches vom WT	
			d10	d21
Kcnb1	Kv2.1	I <sub>K,slow</sub> , spannungsabhängiger verzögernder Auswärtsgleichrichter	n.v.	<b>0,59</b>
Kcnc1	Kv3.1, Kv4	I <sub>kur</sub> , spannungsabhängiger verzögernder Auswärtsgleichrichter	n.v.	<b>0,39</b>
Kcnd2	Kv4.2	I <sub>(to), fast</sub>	n.v.	<b>0,39</b>
Kcnd3	Kv4.3	I <sub>(to), fast</sub>	n.v.	<b>0,52</b>
Kcne1	KCNE1	reguliert I <sub>Ks</sub> , I <sub>Kr</sub>	n.v.	<b>0,60</b>
Kcnh2	ERG1	I <sub>Kr</sub>	n.v.	<b>0,37</b>
Kcnq1	KCNQ	I <sub>Ks</sub>	<b>0,65</b>	<b>0,46</b>
Kcnj3	GIRK1, K <sub>ir</sub> 3.1	I <sub>KAch</sub> , Einwärtsgleichrichter	<b>0,55</b>	<b>0,30</b>
Kcnj5	GIRK4, K <sub>ir</sub> 3.4	I <sub>KAch</sub> , Einwärtsgleichrichter	<b>0,64</b>	<b>0,41</b>
Kcnj11	K <sub>ir</sub> 6.2	I <sub>KATP</sub> , ATP-sensitiver Einwärtsgleichrichter	n.v.	<b>0,38</b>
Kcnj12	K <sub>ir</sub> 2.2	I <sub>K1</sub> , ATP-sensitiver Einwärtsgleichrichter	n.v.	<b>0,61</b>
Kcnk3	K <sub>2p</sub> 3.1	I <sub>kp</sub> , pH sensitiver Auswärtsgleichrichter	n.v.	<b>0,50</b>
Kcnj14	IRK4, K <sub>ir</sub> 2.4	ATP-sensitiver Einwärtsgleichrichter	n.v.	<b>8,00</b>

**Tabelle 1: Genexpression von K<sup>+</sup>-Kanälen in iCM-AKT1/2-KO Herzen**

Die Tabelle zeigt die Ergebnisse von Microarray-Analysen zu Expressionsunterschieden kardialer K<sup>+</sup>-Kanäle zwischen WT und iCM-AKT1/2-KO an d10 und d21 nach Induktion des KOs.  
n.v.= nicht verändert.

Gen	Protein	Strom	Expressionsveränderungen nach iCM-AKT1/2-KO als Vielfaches vom WT	
			d10	d21
Cacna2d1	alpha2/delta subunit 1	spannungsabhängiger Calciumkanal	<b>0,76</b>	<b>0,59</b>
Cacnb2	beta 2 subunit (Cacnb2), transcript variant 1	spannungsabhängiger Calciumkanal	n.v.	<b>0,62</b>
Cacna1g	alpha 1G subunit (Cacna1g)	spannungsabhängiger Calciumkanal, T-Typ	<b>0,60</b>	<b>0,28</b>
Cacng6	gamma subunit 6 (Cacng6)	spannungsabhängiger Calciumkanal	n.a.	<b>0,56</b>
Cacng7	gamma subunit 7	spannungsabhängiger Calciumkanal	n.a.	<b>1,51</b>
Cacna1b	alpha 1B subunit (Cacna1b)	spannungsabhängiger Calciumkanal, N-Typ	n.a.	<b>1,52</b>

**Tabelle 2: Genexpression von Ca<sup>2+</sup>-Kanälen in iCM-AKT1/2-KO Herzen**

Die Tabelle zeigt die Ergebnisse von Microarray-Analysen zu Expressionsunterschieden kardialer Ca<sup>2+</sup>-Kanäle zwischen WT und iCM-AKT1/2-KO an d10 und d21 nach Induktion des KOs.  
n.v.=nicht verändert.

## **4. Diskussion**

Veränderungen des AKT-Signallings spielen eine wichtige Rolle in vielen pathologischen kardiovaskulären Prozessen wie Atherosklerose, kardialer Hypertrophie und vaskulärem Remodelling (Abeyrathna and Su, 2015). Im Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie der HHU wurden Mäuse mit induzierbarer, kardiomyozytenspezifischer Inaktivierung der Gene für die Isoformen AKT1 und AKT2 sowohl als Einzel-KO, als auch als Doppel-Knockout beider Isoformen (iCM-AKT1/2-KO) untersucht. Bei den iCM-AKT1/2-KO-Mäusen kam es nach Induktion des Knockouts durchschnittlich 24,4 Tage nach der ersten OH-Tamoxifen-Injektion zum Tod der Tiere in Folge einer progredienten Herzinsuffizienz (Gödecke et. al in Vorbereitung). Ziele dieser Arbeit waren die Analyse AKT-abhängiger Signalwege im Herzen sowie den Einfluss der AKT1/2-Inaktivierung auf die kardiale Erregungsausbreitung zu untersuchen, um mögliche Mechanismen, die zur Entstehung der Herzinsuffizienz im iCM-AKT1/2-KO beitragen, zu identifizieren.

### **4.1 Überprüfung von iCM-AKT-KO und Stimulation**

Der Nachweis einer erfolgreichen Inaktivierung von AKT1 und AKT2 im Herzen ist die wesentliche Voraussetzung für nachfolgende Untersuchungen zur Funktion der Gene in Kardiomyozyten.

Die Untersuchung der kardialen AKT1-/2-Proteinmengen in WT- und iCM-AKT1/2-KO-Herzen an d7 nach Beginn der 4OH-Tamoxifen-Injektion belegte die Effektivität der AKT-Deletion mit Reduktion der kardialen AKT-Menge auf 20% (AKT1) bzw. 11% (AKT2) im Vergleich zum Expressionsniveau in WT-Herzen. Dabei ist das Restprotein vermutlich auf die Expression in kardialen Fibroblasten, Endothelzellen und anderen nicht kardiomyozytären Zellen zurückzuführen.

Wie in der Einleitung ausführlich beschrieben, kommt es nach IGF1- oder Insulinstimulation zur PI3K-abhängigen Phosphorylierung und Aktivierung von AKT (Manning and Toker, 2017). Daher nimmt der zelluläre phospho-AKT/ pan-AKT-Quotient nach IGF1- oder Insulinstimulation zu und kann so zur Quantifizierung der Insulin- bzw. IGF1-abhängigen Stimulation genutzt werden. In WT-Herzen führte Insulinstimulation, die Effektivität der Stimulation belegend, zu einer deutlichen Zunahme phosphorylierter AKTs. Da in den Herzen der iCM-AKT1/2-KO Mäuse die gesamte kardiomyozytäre AKT-Proteinmenge stark gegenüber dem WT reduziert ist, kann die Aktivierung des Insulin-/ IGF1-Signalweges in diesen Herzen nur eingeschränkt anhand des phospho-AKT/ pan-AKT-Quotienten beurteilt werden. In den iCM-AKT-KO-Herzen wurde deshalb die Phosphorylierung des Insulin- (Tyr1146) bzw. IGF1- (Tyr1131) Rezeptors zur Überprüfung der Stimulation untersucht, die bei Stimulation vor der Aktivierung/ Phosphorylierung von AKT erfolgt. Wie unter 3.1 beschrieben, führte Insulin zu einer gesteigerten Phosphorylierung des Insulin-/ IGF1-Rezeptors in AKT1/2-KO-Herzen und wurde daher in den weiteren Analysen in WT- und iCM-AKT1/2-KO-Herzen eingesetzt.

## **4.2 Zelluläre Signaltransduktion in iCM-AKT-KO-Herzen**

### **4.2.1 Signaltransduktion in iCM-AKT1/2-KO-Herzen**

Echokardiographische Untersuchungen hatten gezeigt, dass die Herzfunktion an d7 nach Induktion des iCM-AKT1/2-KOs noch unverändert ist, während an d14 eine deutliche, im weiteren Verlauf progrediente Einschränkung vorliegt (Gödecke et. al, persönliche Mitteilung). Die Identifikation von Prozessen, die schon vor der deutlichen Einschränkung kardialer Funktion verändert sind, sollte dazu beitragen, Veränderungen, die möglicherweise kausal zur Entstehung der Herzinsuffizienz beitragen, zu identifizieren.

#### **4.2.1.1 mTORC1-Signaltransduktion**

Wie in der Einleitung erörtert, wird die Förderung von Zell-, Gewebe- und Organismuswachstum durch PI3K und AKT nach Wachstumsfaktorstimulation primär durch die AKT-vermittelte Aktivierung von mTORC1 reguliert (Manning and Toker, 2017). Es sollte daher untersucht werden, inwiefern die AKT-abhängige Phosphorylierung verschiedener Substrate des mTORC1-Signalwegs in iCM-AKT1/2-KO-Herzen an d7 nach erster Tamoxifen-Injektion beeinträchtigt ist.

In der Tat zeigte sich eine deutliche Einschränkung der AKT-abhängigen insulinstimulierten Phosphorylierung von Proteinen des mTORC1-Signalwegs.

Für p-mTOR (Ser2481), p-P70S6K (Thr389), p-S6 (Ser235/236) und p-PRAS40 (Thr246) lag in den WT-, jedoch nicht in den iCM-AKT1/2-KO-Herzen eine signifikant gesteigerte Phosphorylierung nach Insulinstimulation gegenüber den jeweils unstimulierten Herzen vor. Auch zwischen den insulinstimulierten Herzen beider Genotypen bestand ein signifikanter Unterschied mit geringerer Phosphorylierung im iCM-AKT1/2-KO. Die Ergebnisse weisen auf eine deutliche Beeinträchtigung der stimulierten AKT-abhängigen Phosphorylierung dieser Proteine bereits an d7 nach Beginn der Induktion des iCM-AKT1/2-KOs hin. Gleichzeitig gab es keine Veränderung der kardialen mTOR-Proteinmenge nach iCM-AKT1/2-KO an d7, sodass die reduzierte Phosphorylierung in iCM-AKT1/2-KO-Herzen auf die AKT-Inaktivierung und nicht auf eine veränderte Expression zurückzuführen ist. Die reduzierte kardiale PRAS40-Menge in iCM-AKT1/2-KO-Herzen könnte generell eine geringere Phosphorylierung erwarten lassen. Allerdings ist ausgehend von einer geringeren Proteinmenge kein vergleichbarer Anstieg im Phosphorylierungsgrad nachweisbar.

Wie in der Einleitung erläutert, besitzen unterschiedlich phosphorylierte Formen von 4E-BP1 geringfügig unterschiedliche elektrophoretischer Mobilität und werden von 3 Banden im Western Blot repräsentiert:  $\alpha$  (un- oder hypophosphorylierte Form),  $\beta$  (phosphorylierte Form),  $\gamma$  (hyperphosphorylierte Form) (Ayuso et al., 2010). Die Beobachtung, dass in den WT-Herzen nach Insulingabe die

hyperphosphorylierte  $\gamma$ -Form eine verstärkte Intensität im Vergleich zum basalen Zustand aufweist, während die  $\beta$ -Form nach Stimulation eine verminderte Intensität aufweist und die  $\alpha$ -Form nach Stimulation nicht mehr abzugrenzen ist, zeigt den Stimulationseffekt von Insulin im WT. Diese Veränderung des Bandenmusters im Western Blot nach Insulinstimulation fehlt bei den iCM-AKT1/2-KO-Herzen. Diese unterschiedlichen Muster belegen die eingeschränkte Wirkung der Insulinstimulation auf 4E-BP1 in iCM-AKT1/2-KO-Herzen. Um die Veränderungen auf statistische Signifikanz zu prüfen wäre eine getrennte Quantifizierung von  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Form erforderlich gewesen, die aufgrund nicht ausreichender gelelektrophoretischer Trennbarkeit der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Form nicht möglich war.

Für p-mTOR Ser2448 wurde kein signifikanter Stimulationseffekt in WT- und in iCM-AKT1/2-KO-Mäusen und kein Unterschied der Phosphorylierung zwischen den jeweils stimulierten Genotypen gemessen. Demzufolge bieten die Ergebnisse keinen Hinweis auf eine Bedeutung von AKT1/ AKT2 für die Ser2448-Phosphorylierung von mTORC1. Hier muss berücksichtigt werden, dass die Ser2448-Phosphorylierung von der p70S6K im Rahmen eines negativen Feedback-Loops zur Feinregulierung der mTOR-Aktivität und nicht von AKT direkt vermittelt wird. Die Ser2448-Phosphorylierung sollte daher nicht als Maß der mTORC1-Aktivität verwendet werden (Figueiredo et al., 2017).

Zusammengenommen wurden deutliche Einschränkungen der Insulin-abhängigen mTORC1-Signaltransduktion in Herzen von iCM-AKT1/2-KO-Mäusen nachgewiesen.

Auf Grund der Bedeutung von mTORC1 für die Vermittlung stimulierter Wachstumsprozesse ist von einer Beeinträchtigung dieser Prozesse in iCM-AKT1/2-KO-Herzen auszugehen. mTORC1 fördert die Proteinsynthese vor allem durch die Phosphorylierung der zwei Schlüsseffektoren p70S6 Kinase 1 (S6K1) und eIF4E-Binding protein (4E-BP) (Saxton and Sabatini, 2017). Die Aktivität von 4E-BPs wird durch Phosphorylierung reguliert und multiple Phosphorylierung von S6 ist eine Voraussetzung für gesteigerte Raten der Initiation bei der Proteinsynthese und des folgenden Zellwachstums als Antwort auf Mitogene und Wachstumsfaktoren (Ayuso et al., 2010; Ferrari et al., 1991). Aufgrund der beschriebenen Abhängigkeit der Funktion von S6 und 4E-BP1 von deren Phosphorylierung liegt es nahe, dass die veränderte Phosphorylierung von S6 und 4E-BP1 in iCM-AKT1/2-KO Herzen eine Beeinträchtigung der Proteinsynthese bedingt.

Die hier durchgeführten Analysen zur Signaltransduktion bieten eine wesentliche Grundlage zum Verständnis des Atrophie-Phänotyps der iCM-AKT1/2-KO-Mäuse. Sie zeigen nämlich, dass bereits vor dem messbaren Nachweis der veränderten Proteinbiosynthese an d10 die wesentlichen Signalwege, die die Proteinsynthese regulieren, in ihrer Funktion erheblich eingeschränkt sind.

#### **4.2.1.2 GSK3 $\beta$ -Signaltransduktion**

Wie in der Einleitung erörtert besitzt die GSK3 unter unstimulierten Bedingungen eine hohe Kinaseaktivität und wird durch extrazelluläre Signale, die einen Anstieg der Ser9-/21-Phosphorylierung der GSK3 induzieren, inhibiert (Kaidanovich-Beilin and Woodgett, 2011). Die GSK3-Inhibition ist eine

Schlüsselkomponente der zellulären Antwort auf Wachstumsfaktoren und Insulin (Hermida et al., 2017). Mora et. al beschrieben, dass die GSK3-Inaktivierung der wichtigste regulatorische Schritt ist, über den Insulin die Glykogensynthese (GS) im Herzmuskel stimuliert. (Mora et al., 2005). Auf Grund der Bedeutung der GSK3-Inhibition für die Insulin-Signaltransduktion sollte untersucht werden, inwiefern nach iCM-AKT1/2-KO Veränderungen der Phosphorylierung von GSK3 $\beta$  (Ser9) und GS (Ser641) auftreten.

In den Herzen von WT-Mäusen an d7 wurde eine nicht signifikante Zunahme des Ser9-Phosphorylierungsgrades der GSK3 $\beta$  (Zunahme des p-GSK3 $\beta$  (Ser9) /GSK3 $\beta$ -Verhältnisses) nach Insulinstimulation gemessen. In iCM-AKT1/2-KO-Herzen hatte die Insulinstimulation keinen Einfluss auf die Ser9-Phosphorylierung, die im stimulierten und basalen Zustand im iCM-AKT1/2-KO der im unstimulierten (basalen) WT entsprach.

Die Ser641-Phosphorylierung der GS nahm in den WT-Herzen nach Insulinstimulation signifikant ab. Sie war im Einklang mit der fehlenden Steigerung der Ser9-Phosphorylierung und somit fehlenden Hemmung der GSK3 $\beta$  im iCM-AKT1/2-KO nach Insulinstimulation unverändert. Dass für GSK3 $\beta$  und GS jeweils kein signifikanter Unterschied zwischen stimuliertem WT und stimuliertem iCM-AKT1/2-KO gemessen wurde, könnte durch Beeinflussung der GSK3 $\beta$  durch andere Faktoren neben der AKT-abhängigen Phosphorylierung bedingt sein. So kann die Aktivität der GSK neben AKT auch von anderen Kinasen, wie z.B. PKA, p90RSK, p70S6K, PKC sowie von Regulatoren der Phosphatase-1 moduliert werden (Kaidanovich-Beilin and Woodgett, 2011).

Die Ergebnisse weisen auf eine gesteigerte GSK3 $\beta$ -Signaltransduktion hin. Dieser Befund könnte für eine verminderte kardiale Glykogensynthese an d7 nach iCM-AKT1/2-KO sprechen, da die GS stärker gehemmt sein dürfte.

In den Herzen der iCM-AKT1/2-KO-Mäuse wurde in vivo ab d10 ein progredient vermindertes PCr/ATP-Verhältnis als Indikator für energetische Verarmung gemessen, das ab d15 signifikant erniedrigt war (Goeddecke et. al persönliche Mitteilung). Im Zustand beginnenden Energiemangels könnte es vorteilhaft sein, vorhandene Glukose direkt für die Energiegewinnung zu metabolisieren, anstatt sie in Form von Glykogen zu speichern. Daher könnte eine verminderte Glykogensynthese ein vorteilhafter Mechanismus für die Energieversorgung in iCM-AKT1/2-KO-Herzen sein.

Um weitere Evidenz für veränderte Glykogensynthese nach iCM-AKT-KO zu gewinnen, wäre es für kommende Projekte interessant, den kardialen Glykogengehalt in iCM-AKT1/2-KO-Herzen zu messen.

#### **4.2.1.3 Thr172-Phosphorylierung der AMPK**

Die AMP-abhängige Proteinkinase (AMPK) ist bedeutend für die Aufrechterhaltung der Energiehomöostase in eukaryotischen Zellen und für die Regulation des Gesamtkörper-Energiemetabolismus mehrzelliger Organismen (Carling, 2017). Für die volle Kinaseaktivität muss AMPK an Thr172 der katalytischen  $\alpha$ -Untereinheit phosphoryliert sein, und die AMPK-Aktivität und Thr172-Phosphorylierung

steigen bei zunehmendem zellulärem AMP/ATP Verhältnis (Schultze et al., 2012).

In früheren MRI-Messungen an iCM-AKT1/2-KO-Mäusen in vivo wurde an d15 ein verminderter PCr/ATP-Spiegel als Indikator für energetische Verarmung nachgewiesen (Gödecke et. al in Vorbereitung). Um genauer zu untersuchen, ob sich an d7 bereits Hinweise auf einen Energiemangel ergeben, wurde der Thr172-Phosphorylierungsgrad der AMPK in iCM-AKT1/2-KO-Herzen untersucht. Dieser könnte als Zeichen beginnender Energiedepletion mit Verschiebung des zellulären Verhältnisses von AMP/ADP zu ATP in den iCM-AKT1/2-KO-Herzen gesteigert sein. In den Western Blots wurde keine signifikante Steigerung der Thr172-Phosphorylierung der AMPK in den Herzen von iCM-AKT1/2-KO Mäusen an d7 gemessen. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass es an d7 noch nicht zu einer deutlichen Aktivierung der AMPK im iCM-AKT1/2-KO kommt. Das spricht gegen eine ausgeprägte Energiedepletion zu diesem Zeitpunkt und steht im Einklang mit den beschriebenen Ergebnissen der MRI-Messungen.

#### **4.2.1.4 Phosphorylierung von PTEN**

Wie in der Einleitung beschrieben, terminiert die Proteinphosphatase PTEN die PI3K-PIP<sub>3</sub>-Signaltransduktion durch PIP<sub>3</sub>-Dephosphorylierung (Manning and Toker, 2017). Phosphorylierung von PTEN am C-terminalen Ende an Ser380, Thr382, Thr383 und Ser385 kann seine Phosphataseaktivität inhibieren und seine Stabilität fördern (Song et al., 2012). CK2 und GSK3 $\beta$  können diese Phosphorylierungen katalysieren (Dempsey and Cole, 2018).

Da eine gesteigerte Ser380-Phosphorylierung von PTEN dessen Phosphataseaktivität inhibieren und dadurch fördernd auf die PI3K-PIP<sub>3</sub>-Signaltransduktion wirken kann, könnte eine gesteigerte Ser380-Phosphorylierung für ein kompensatorisch gesteigertes PI3K-Signalling nach iCM-AKT1/2-KO sprechen.

Es wurde keine Veränderung der Ser380-Phosphorylierung von PTEN durch Insulinstimulation in WT- oder iCM-AKT1/2-KO-Herzen sowie kein Unterschied zwischen WT- und iCM-AKT1/2-KO-Tieren im Hinblick auf diese Phosphorylierung gemessen. Die Analyse der Phosphorylierung weiterer Positionen von PTEN könnte helfen einzuordnen, ob es nach iCM-AKT1/2-KO zu veränderter inhibitorischer Phosphorylierung von PTEN kommt. Die Expression und Funktion von PTEN wird über verschiedene Mechanismen reguliert. Dazu zählen transkriptionelle Regulation, post-transkriptionelle Regulation durch nicht-kodierende RNAs, post-translationale Modifikationen und Protein-Protein-Interaktionen (Song et al., 2012). Folglich könnten für die Beurteilung eines möglichen Effekts des iCM-AKT1/2-KO auf die PTEN-Funktion auch andere Regulationsmechanismen zusätzlich zur Phosphorylierung interessant sein.

#### **4.2.2 Signaltransduktion in iCM-AKT1- und iCM-AKT2-KO-Herzen**

Wie in der Einleitung erwähnt sind AKT1 und AKT2 die dominanten Isoformen im Herzen, während AKT3 nur sehr gering exprimiert ist (Easton et al., 2005; Schultze et al., 2011). Dabei wird der Großteil der AKT-Substrate von allen drei AKT-Isoformen phosphoryliert (Manning and Toker, 2017).

Ausgehend von der gemessenen Einschränkung in der Signaltransduktion über den mTORC1- und GSK3 $\beta$ - Signalweg im iCM-AKT1/2-KO sollte untersucht werden, ob es in Kardiomyozyten Unterschiede im Beitrag einer einzelnen der beiden kardialen AKT-Isoformen AKT1 und AKT2 zur Phosphorylierung der Substrate dieser Signalwege gibt.

Die Ergebnisse aus dem ersten Teil zur Einschränkung der insulinstimulierten Phosphorylierung von p70S6K (Thr389), S6 (Ser235/236), 4E-BP1 (Thr37/46), PRAS40 (Thr246), GSK3 $\beta$  (Ser9) und pGS (Ser641) im iCM-AKT1/2-KO wurden bestätigt. In den iCM-AKT1- und iCM-AKT2-Einzel-KO-Mäusen wurden für die genannten Proteine ebenfalls Einschränkungen der insulinstimulierten Phosphorylierung gemessen, die jedoch weniger stark ausgeprägt waren als im iCM-AKT1/2-KO. Dies belegt die teilweise überlappenden Funktionen der Isoformen AKT1 und AKT2 bei der Phosphorylierung der betreffenden Substrate des mTORC1- und GSK3  $\beta$ -Signalwegs in Kardiomyozyten.

#### **4.2.3 AKT-abhängige Substratphosphorylierung bei Insulin- und IGF-Stimulation isolierter, nach Langendorff-perfundierter Herzen an d7 nach iCM-AKT1/2-KO**

Wie im Abschnitt „Material & Methoden“ erwähnt, bietet die isolierte kardiale Perfusion nach Langendorff die Möglichkeit, das Herz isoliert von anderen Organsystemen und exokriner Kontrolle zu untersuchen (Bell et al., 2011). Nach Langendorff-Perfusion ist die Phosphorylierung kardialer Proteine durch Auswaschen von Zytokinen und Wachstumsfaktoren auf ein Basalniveau reduziert. So konnte in nach Langendorff-perfundierten, insulinstimulierten Herzen der Einfluss der Stimulation auf die Phosphorylierung der Proteine des mTORC1- und GSK3 $\beta$ -Signalwegs spezifischer untersucht werden als in der in vivo Situation. Um die Bedeutung der Insulin- und IGF1-vermittelten AKT-abhängigen Signaltransduktion in Kardiomyozyten zu vergleichen, wurden zusätzlich IGF1-stimulierte Herzen auf die gleiche Weise untersucht.

In den Experimenten mit den insulinstimulierten, nach Langendorff-perfundierten Herzen konnten die bereits bei den Herzen der in vivo insulinstimulierten Mäuse erhobenen Ergebnisse hinsichtlich der deutlichen Einschränkung der stimulierten Phosphorylierung von Proteinen des mTORC1- und GSK3 $\beta$ -Signalwegs nach iCM-AKT1/2-KO nochmals bestätigt werden. Für pGSK3 $\beta$  (Ser9) und pGS (Ser641) konnten die Effekte des KO noch deutlicher als bei den Herzen der in vivo stimulierten Mäuse herausgearbeitet und jeweils statistisch signifikante Unterschiede zwischen stimuliertem iCM-AKT1/2-KO und stimuliertem WT gemessen werden.

Für die IGF1-stimulierten, nach Langendorff perfundierten Herzen wurden im Wesentlichen ähnliche Ergebnisse wie bei den insulinstimulierten Herzen erhoben. In der gewählten Konzentration von IGF1 wurden anders als bei den insulinstimulierten Herzen keine signifikanten Unterschiede zwischen basalem und stimuliertem WT und keine signifikanten Unterschiede zwischen stimuliertem WT und stimuliertem iCM-AKT1/2-KO für p-mTOR (Ser2481) und p-S6 (Ser235/236) gemessen, bei in der Tendenz jedoch ähnlichen Ergebnissen. Dies könnte auch durch die geringe Signalintensität der betreffenden Blots mit IGF1-stimulierten Herzen beeinflusst sein.

Die Ergebnisse belegen die teilweise überlappende Funktion von Insulin und IGF1 hinsichtlich der AKT-abhängigen Phosphorylierung des mTORC1- und GSK3-Signalwegs in Kardiomyozyten.

Interessanterweise wurde in Insulin- und IGF1-stimulierten Herzen auch im iCM-AKT1/2-KO eine signifikant gesteigerte Phosphorylierung der GSK3 $\beta$  (Ser9) in stimulierten Herzen im Vergleich mit den basalen Herzen beobachtet. Der gemessene Stimulationseffekt könnte auf nicht-kardiomyozytäre Zelltypen wie Endothelzellen und Fibroblasten zurückzuführen sein, in denen die AKT-Funktion nach iCM-AKT1/2-KO nicht vermindert sein sollte. Wie in der Einleitung erörtert, kann die N-terminale Ser9-Phosphorylierung der GSK3 $\beta$  nach zellulärer Stimulation mit Wachstumsfaktoren oder Insulin neben AKT auch von anderen Kinasen wie p90RSK und PKA vermittelt (Hermida et al., 2017). Daher wäre eine Steigerung der Ser9-Phosphorylierung der GSK3 $\beta$  nach Stimulation in iCM-AKT1/2-KO-Hezen vermittelt durch andere Kinasen denkbar, die aber auch durch Insulin stimuliert werden müssten.

### **4.3 Kardiale GLUT1- und GLUT4-Proteinmenge nach iCM-AKT1/2-KO**

Das Herz wird häufig auch als „metabolischer Omnivore“ bezeichnet, da es je nach Substratangebot seinen Energiebedarf durch Fettsäuren, Glukose, Lactat oder Ketonkörper decken kann. Daher wechselt das Herz für die optimierte Energieproduktion ständig zwischen verschiedenen Substraten in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit und dem hormonalen Status (Bertrand et al., 2020). Normalerweise wird über die Fettsäureoxidation mindestens 60% des myokardialen ATPs produziert und Glukose generiert ca. 25-30% der Gesamtenergie. (Szablewski, 2017).

Der kardiale Glukosetransport wird vor allem durch Glukosetransporter der GLUT-Familie vermittelt. GLUT1 und GLUT4 sind die prädominant im Herz exprimierten Isoformen. Der am stärksten in adulten Kardiomyozyten exprimierte Glukosetransporter GLUT4 ist unter basalen Bedingungen vor allem in intrazellulären Vesikeln, sogenannten GLUT4 *storage vesicles* (GSV) lokalisiert, weshalb die basale Glukoseaufnahme relativ gering ist (Bertrand et al., 2020). Aktivierung des Insulin-Signallings in Kardiomyozyten führt zu einer Steigerung der Glukoseaufnahme durch Förderung der Translokation von GSVs an die Plasmamembran. (Riehle and Abel, 2016). Der erste und wichtigste Schritt dabei ist die Aktivierung des PI3K/AKT-Pathways (Bertrand et al., 2020). Daher ist davon auszugehen, dass es nach AKT-Inaktivierung zu verminderter GLUT4 Translokation und zu verminderter GLUT4-vermittelter Glukoseaufnahme kommt. Im Gegensatz zum GLUT 4 ist der GLUT1-Transporter für den basalen kardialen Glukosetransport verantwortlich (Szablewski, 2017). Er ist konstitutiv an der Plasmamembran lokalisiert (Bertrand et al., 2020).

Die Auswertung der mRNA-Microarrays zeigte, dass bei unveränderter GLUT4-Transkription die GLUT1-Transkription in den Herzen von iCM-AKT1/2-KO-Mäusen hochreguliert ist (d10: 1,64-fach, d21: 3,12-fach). Zusätzlich wurde gezeigt, dass es nach AKT1/2-Deletion auch zu einer Zunahme der kardialen GLUT1-Proteinmenge gegenüber WT-Mäusen an d7, d10 und d21 kommt. Zu keinem der Messzeitpunkte wurden Veränderungen der kardialen GLUT4-Menge nach AKT-Deletion gemessen.

Die Ergebnisse weisen auf eine Steigerung des basalen, insulinunabhängigen Glukosetransports über

GLUT1 in iCM-AKT1/2-KO-Herzen hin. Durch die Heraufregulation könnte GLUT1 eine verminderte insulinabhängige, GLUT4-vermittelte Glukoseaufnahme teilweise kompensieren. Dafür spricht auch, dass in vielen experimentellen Untersuchungen in denen Herzversagen durch TAC (transversale Aortenkonstriktion, entspricht Druckbelastung) oder Koronararterienligatur induziert wird, die basale Glukoseaufnahme durch vermehrte GLUT1-Expression gesteigert ist (Riehle and Abel, 2016).

Es ist wahrscheinlich, dass GLUT1 und GLUT4 abweichende und überlappende Rollen in der Modulation myokardialer Glukoseaufnahme im Herzversagen haben. Während die myokardiale Glukoseverstoffwechslung im Verlauf des Herzversagens gesteigert sein könnte, könnte sie in Herzen von Patienten und Tieren mit fortgeschrittenem Herzversagen reduziert sein (Riehle and Abel, 2016).

Da Glukose einen großen Anteil an der kardialen Substratversorgung hat, könnte veränderte Glukoseaufnahme die Gesamtenergieversorgung der Herzen von iCM-AKT1/2-KO-Mäusen stark beeinflussen. Um die Rolle der Glukoseversorgung für die kardiale Energieversorgung der iCM-AKT1/2-KO-Mäuse zu beurteilen, könnte der Glukosestoffwechsel in zukünftigen Projekten im Zusammenhang des Gesamtenergiemetabolismus und der Verstoffwechslung anderer Substrate wie Fettsäuren betrachtet werden.

#### **4.4 Einfluss von AKT auf die kardiale Erregungsleitung**

##### **4.4.1 Einfluss von Insulinstimulation auf Oberflächen-EKGs wildtypischer Mäuse**

Connexin43 ist das prädominante ventrikuläre Gap junction Protein in Kardiomyozyten und kritisch für die Aufrechterhaltung normaler kardialer Erregungsleitung (Danik et al., 2004). Veränderungen der Connexin43-Phosphorylierung koordinieren die Interaktion von Connexin43 mit verschiedenen Proteinen und die Dynamik kardialer *Gap junctions* (Solan and Lampe, 2014). Verschiedene Kinasen wie AKT, PKA, PKC, ERK1/2 und src phosphorylieren Connexin43 (Solan and Lampe, 2014). Die AKT Phosphorylierung von Cx43 an S373 hemmt die ZO-1 Bindung und ermöglicht so die Bildung größerer *Gap junctions* und verstärkte Kommunikation über die *Gap junctions* (Dunn and Lampe, 2014).

Ausgehend davon sollte untersucht werden, ob sich Veränderungen der Erregungsleitung im Oberflächen-EKG nach AKT-Aktivierung durch Insulinstimulation nachweisen lassen. Dazu wurden EKGs von wildtypischen Mäusen vor und nach Insulinstimulation untersucht.

Nach Insulingabe traten bei WT-Mäusen keine Veränderungen der EKG-Kurvenmorphologie oder Intervall-Dauern im Zeitverlauf von 15 min nach Stimulation auf. Die Ergebnisse sprechen gegen einen direkt im Oberflächen-EKG messbaren Effekt der AKT-Aktivierung durch Insulinstimulation auf die Erregungsleitung.

##### **4.4.2 Veränderungen muriner Oberflächen-EKGs nach AKT-Deletion**

Um zu untersuchen, ob der AKT-Verlust in iCM-AKT1/2-KO-Mäusen im Oberflächen-EKG zu messbaren Veränderungen der Erregungsleitung führt, wurden EKGs von WT- und iCM-AKT1/2-KO-

Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion des Knockouts analysiert.

In WT- und iCM-AKT1/2-KO-Mäusen wurden jeweils signifikant niedrigere Herzfrequenzen an den späteren verglichen mit den ersten Messstagen gemessen. Dabei traten zu keinem Messzeitpunkt signifikante Unterschiede der mittleren HF zwischen den Genotypen auf. PR-Intervall und P-Dauer nahmen in WT und iCM-AKT1/2-KO jeweils im Zeitverlauf zu, ohne signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen.

Da entsprechende Veränderungen im WT nicht zu erwarten waren, stellt sich die Frage, ob es sich bei den beschriebenen Veränderungen im Zeitverlauf um einen biologischen Effekt oder eher experimentell induzierte Veränderungen handelt.

So führt eine Isoflurananästhesie (1,5 %) zu einer Herzfrequenzabnahme und QT-Intervall-Verlängerung in Mäusen (Speerschneider and Thomsen, 2013). Daher ist ein Beitrag der verwendeten Narkose (2 % Isoflurane gelöst in sauerstoffangereichertem Gasgemisch) zur Abnahme der HF denkbar, die wiederum zu einer Zunahme des PR-Intervalls führen sollte.

Insgesamt spricht die gleichsinnige Veränderung von Herzfrequenz, PR-Intervall und P-Welle in WT- und iCM-AKT1/2-KO-Mäusen gegen einen primär iCM-AKT1/2-KO-spezifischen Effekt.

Morphologisch fielen in den Oberflächen-EKGs der iCM-AKT1/2-KO-Mäuse ab d14 deutliche Veränderungen auf. Es fehlte in den iCM-AKT1/2-KO-Mäusen der den Beginn der J-Welle markierende Schnittpunkt mit der isoelektrischen Linie, der nach der negativen S-Zacke den Beginn der positiv konfigurierten J-Welle kennzeichnet. Dabei war in den Ableitungen I, II und III jeweils keine klare J-Welle abgrenzbar, was gegen eine Änderung des Lagetyps als Ursache spricht. Wie in der Einleitung erörtert, repräsentiert die J-Welle die frühe Repolarisation, während der QRS-Komplex die Depolarisation der Ventrikel repräsentiert (Boukens et al., 2014; Kaese and Verheule, 2012).

Als Kriterium für das Ende des QRS-Komplexes wurde der Schnittpunkt der S-Zacke mit der isoelektrischen Linie genutzt. Dieser Schnittpunkt markiert den Beginn der J-Welle (Boukens et al., 2014). Das Fehlen der J-Welle in den EKGs von Mäusen ab d14 nach AKT-Deletion führt dazu, dass die Begrenzung des QRS-Komplexes nicht wie oben angegeben möglich war. Bei den betreffenden EKGs wurde als Marker für das Ende des QRS-Komplexes der Beginn des deutlichen Abflachens des positiven Anstiegs aus der S-Zacke verwendet. Dies schränkt die Beurteilbarkeit der QRS-Dauer nach AKT-Deletion im Zeitverlauf erheblich ein. Die signifikante Interaktion, die für den QRS-Komplex gemessen wurde, ist auf Grund der genannten Probleme sehr eingeschränkt interpretierbar.

Es ist denkbar, dass der J-Verlust in iCM-AKT1/2-KO-Mäusen auf Veränderungen der Repolarisation der Ventrikel hinweist.

Die T-Welle repräsentiert die Repolarisation (Boukens et al., 2014). Es ist bekannt, dass die T-Welle im Maus-EKG bedingt durch die trianguläre Form des murinen ventrikulären Aktionspotentials oft nicht adäquat abgrenzbar ist (Calvet and Seebeck, 2023; Kaese and Verheule, 2012). Auch in den in dieser Arbeit analysierten EKGs war weder bei WT- noch bei iCM-AKT1/2-KO-Mäusen eine klare T-Welle abgrenzbar. Das Fehlen einer klaren T-Welle erschwert die Untersuchung der ventrikulären

Repolarisation im murinen Oberflächen-EKG (Kaese and Verheule, 2012). Für die Untersuchung der ventrikulären Erregungsleitung in der Maus empfiehlt sich ventrikuläres Mapping (optisch oder elektrisch) (Boukens et al., 2014). Weiterführende Untersuchungen der kardialen Erregungsleitung von iCM-AKT1/2-KO-Mäusen mittels ventrikulärem Mapping könnten helfen, aufbauend auf den beobachteten Veränderungen der Morphologie des Übergangs von S-Zacke zu J-Welle ab d14, Veränderungen der Repolarisation nach AKT-Deletion genauer zu charakterisieren.

Auch Speerschneider und Thomsen beobachteten bereits in EKGs von Mäusen nach Induktion einer Herzinsuffizienz (EF<40%) komplett negative JT-Segmente in Ableitung II ohne klare Trennbarkeit von J- und T-Welle (Speerschneider and Thomsen, 2013). Die Ähnlichkeit der von Speerschneider und Thomsen beschriebenen morphologischen Veränderungen der Oberflächen-EKGs herzinsuffizienter Mäuse mit den Auffälligkeiten in den EKGs der iCM-AKT-KO Mäuse im Bereich der J-Welle spricht dafür, dass diese typische Folgen einer Herzinsuffizienz sein könnten. Hier wäre es interessant, zu untersuchen, über welche Mechanismen es im Kontext der AKT-Deletion dazu kommt.

Es ist denkbar, dass die morphologischen Auffälligkeiten nach AKT-Deletion (Verlust der J-Welle) durch eine veränderte Expression und Funktion kardialer Ionenkanäle bedingt sind.

Aus diesem Grund wurden die von Dr. S. Gödecke zur Verfügung gestellten mRNA-Microarray-Transkriptomanalysen von iCM-AKT1/2-KO-Herzen an d10 und d21 nach Beginn der Tamoxifen-Injektion im Hinblick auf die Expression kardialer Ionenkanäle untersucht.

Die stärksten Veränderungen wurden bei K<sup>+</sup>- und in geringerem Maß bei Ca<sup>2+</sup>-Kanälen gefunden, während die Expression von Na<sup>+</sup>- und Cl<sup>-</sup>-Kanälen wenig verändert war.

In den iCM-AKT1/2-KO-Herzen waren unter anderem die K<sup>+</sup>-Kanäle für die Ströme I<sub>to,f</sub>, I<sub>Kur</sub> und I<sub>K1</sub> an d21 nach iCM-AKT1/2-KO deutlich herunterreguliert. Diese sind an der frühen und späten Repolarisation muriner ventrikulärer Myozyten beteiligt (Boukens et al., 2014; Nerbonne Jeanne M. et al., 2001). Eine Verminderung des K<sup>+</sup>-Stroms ist ein bekannter Befund bei Herzinsuffizienz. Gemeinsamer Effekt der K<sup>+</sup>-Strom-Verminderung bei verschiedenen Modellen der Herzinsuffizienz ist die Verlängerung der Aktionspotentialdauer (Aiba and Tomaselli, 2012). Die veränderte Expression der K<sup>+</sup>-Kanäle in iCM-AKT1/2-KO-Herzen könnte zu einer verlängerten Aktionspotentialdauer von Kardiomyozyten mit verlangsamer Repolarisation führen. Dies könnte morphologische Veränderungen im Bereich der J-Welle nach AKT-Deletion erklären. Elektrophysiologische Untersuchungen an isolierten Kardiomyozyten, könnten ergänzend hilfreich sein, um Veränderungen der Aktionspotentiale nach iCM-AKT1/2-KO genauer zu charakterisieren.

Die Veränderungen von Ca<sup>2+</sup>-Kanälen auf Transkriptionsebene an d21 nach iCM-AKT1/2-KO sind geringer ausgeprägt als die Expressionsveränderungen der K<sup>+</sup>-Kanäle.

Der depolarisierende I<sub>Ca,L</sub>-Strom spielt eine Rolle für die Balance depolarisierender und repolarisierender Ströme, die die Repolarisation des murinen ventrikulären Aktionspotentials charakterisiert (Kaese et al., 2013; Kaese and Verheule, 2012). In den Herzen der iCM-AKT1/2-KO-Mäuse wurden keine

ausgeprägten Transkriptionsveränderungen der entsprechenden Kanäle gemessen. Daher ist eine beeinträchtigte Repolarisation durch veränderten  $I_{CaL}$  nach iCM-AKT1/2-KO unwahrscheinlich. In den iCM-AKT1/2-KO-Mäusen war vor allem die Expression der T-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanäle bereits an d10 und noch stärker an d21 vermindert. Die Bedeutung der  $Ca^{2+}$ -Kanal-Expressionsveränderungen nach iCM-AKT1/2-KO für das Membranpotential ist auf Grund der im Vergleich zum  $K^{+}$ -Strom geringen Ausprägung schwer abzuschätzen. Eine Computersimulation könnte helfen, Veränderungen des Membranpotentials ausgehend von den gemessenen Transkriptionsveränderungen der  $K^{+}$ - und  $Ca^{2+}$ -Kanäle zu beurteilen.

#### **4.5 Schlussfolgerung**

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die AKT-abhängige Signaltransduktion über den für die Proteinsynthese bedeutsamen mTORC1-Signalweg und über den für die Glykogensynthese wichtigen GSK3 $\beta$ -Signalweg schon an d7 nach Induktion des iCM-AKT1/2-KOs, also vor deutlich messbaren Einschränkungen der kardialen Funktion, beeinträchtigt ist.

Die Experimente mit iCM-AKT1- bzw. iCM-AKT2-Einzel-KO-Mäusen zeigten, dass für die untersuchten Substrate der mTORC1- und GSK3-Signalwege beide Isoformen zur Phosphorylierung in Kardiomyozyten beitragen. Zwar kommt es in den Einzel-KO-Herzen zur beeinträchtigten Phosphorylierung verglichen mit dem WT, diese ist jedoch geringer ausgeprägt als bei den iCM-AKT1/2-KO-Herzen. Dass es nach iCM-AKT1- oder iCM-AKT2-KO nicht zur kardialen Funktionseinschränkung kommt, spricht dafür, dass trotz veränderter Signaltransduktion funktionell eine Kompensation des Verlusts einer AKT-Isoform gelingt. Anschließende Messungen des kardialen Glykogengehalts könnten ergänzend durchgeführt werden, um weitere Evidenz für eingeschränkte kardiale Glykogensynthese nach iCM-AKT1/2-KO zu erhalten.

Die Arbeit zeigt zudem, dass GLUT1 in iCM-AKT1/2-KO-Herzen auf mRNA- und auf Proteinebene hochreguliert ist. Dies könnte einer verminderten Glukoseaufnahme über den GLUT4-Transporter, der nach iCM-AKT1/2-KO vermindert an der Plasmamembran lokalisiert sein sollte, zum Teil entgegenwirken. In ergänzenden Experimenten könnte versucht werden, die zelluläre Lokalisation der GLUT 4-Transporter in iCM-AKT1/2-KO-Herzen darzustellen und die Glukoseaufnahme zu messen.

Auffälligkeiten in EKGs von Mäusen ab d14 nach iCM-AKT1/2-KO weisen auf Veränderungen der ventrikulären Erregungsleitung im Bereich der Repolarisation hin. Ursächlich könnten gemessene Transkriptionsveränderungen kardialer Kaliumkanäle sein. Untersuchungen der Erregungsausbreitung in den Herzen dieser Mäuse durch genauere Darstellung der Erregungsleitung, z.B. mittels optical Mapping, könnten helfen, Limitationen des Oberflächen-EKGs bei der Charakterisierung veränderter Erregungsleitung zu umgehen und Veränderungen nach iCM-AKT1/2-KO präziser zu beschreiben.

## **Literatur- und Quellenverzeichnis**

- 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>
- Aiba, T., Tomaselli, G., 2012. Electrical remodeling in dyssynchrony and resynchronization. *J Cardio-vasc Transl Res* 5, 170–179. <https://doi.org/10.1007/s12265-012-9348-9>
- Ayuso, M.I., Hernández-Jiménez, M., Martín, M.E., Salinas, M., Alcázar, A., 2010. New hierarchical phosphorylation pathway of the translational repressor eIF4E-binding protein 1 (4E-BP1) in ischemia-reperfusion stress. *J Biol Chem* 285, 34355–34363. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.135103>
- Bell, R.M., Mocanu, M.M., Yellon, D.M., 2011. Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 50, 940–950. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2011.02.018>
- Bertrand, L., Auquier, J., Renguet, E., Angé, M., Cumps, J., Horman, S., Beauloye, C., 2020. Glucose transporters in cardiovascular system in health and disease. *Pflugers Arch* 472, 1385–1399. <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02444-8>
- Boukens, B.J., Rivaud, M.R., Rentschler, S., Coronel, R., 2014. Misinterpretation of the mouse ECG: “musing the waves of *Mus musculus*.” *The Journal of physiology* 592, 4613–26. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.279380>
- Calvet, C., Seebeck, P., 2023. What to consider for ECG in mice-with special emphasis on telemetry. *Mamm Genome* 34, 166-179 (2023). <https://doi.org/10.1007/s00335-023-09977-0>
- Carling, D., 2017. AMPK signalling in health and disease. *Curr Opin Cell Biol* 45, 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2017.01.005>
- Colella, A.D., Chegenii, N., Tea, M.N., Gibbins, I.L., Williams, K.A., Chataway, T.K., 2012. Comparison of Stain-Free gels with traditional immunoblot loading control methodology. *Anal. Biochem.* 430, 108–110. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.08.015>
- Danik, S.B., Liu, F., Zhang, J., Suk, H.J., Morley, G.E., Fishman, G.I., Gutstein, D.E., 2004. Modulation of cardiac gap junction expression and arrhythmic susceptibility. *Circ Res* 95, 1035–1041. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000148664.33695.2a>
- Dempsey, D.R., Cole, P.A., 2018. Protein Chemical Approaches to Understanding PTEN Lipid Phosphatase Regulation. *Methods Enzymol* 607, 405–422. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2018.05.007>
- Dummler, B., Hemmings, B.A., 2007. Physiological roles of PKB/Akt isoforms in development and disease. *Biochem Soc Trans* 35, 231–235. <https://doi.org/10.1042/BST0350231>
- Dunn, C.A., Lampe, P.D., 2014. Injury-triggered Akt phosphorylation of Cx43: a ZO-1-driven molecular switch that regulates gap junction size. *J Cell Sci* 127, 455–464. <https://doi.org/10.1242/jcs.142497>
- Dunn, C.A., Su, V., Lau, A.F., Lampe, P.D., 2012. Activation of Akt, not connexin 43 protein ubiquitination, regulates gap junction stability. *J Biol Chem* 287, 2600–2607. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.276261>

- Easton, R.M., Cho, H., Roovers, K., Shineman, D.W., Mizrahi, M., Forman, M.S., Lee, V.M.-Y., Szabolcs, M., de Jong, R., Oltersdorf, T., Ludwig, T., Efstratiadis, A., Birnbaum, M.J., 2005. Role for Akt3/protein kinase Bgamma in attainment of normal brain size. *Mol Cell Biol* 25, 1869–1878. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.5.1869-1878.2005>
- Ferrari, S., Bandi, H.R., Hofsteenge, J., Bussian, B.M., Thomas, G., 1991. Mitogen-activated 70K S6 kinase. Identification of in vitro 40 S ribosomal S6 phosphorylation sites. *J Biol Chem* 266, 22770–22775.
- Figueiredo, V.C., Markworth, J.F., Cameron-Smith, D., 2017. Considerations on mTOR regulation at serine 2448: implications for muscle metabolism studies. *Cell Mol Life Sci* 74, 2537–2545. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2481-5>
- Garfin, D.E., 1990. One-dimensional gel electrophoresis. *Meth. Enzymol.* 182, 425–441. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)82035-z](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)82035-z)
- Gavini, K., Parameshwaran, K., 2020. Western Blot (Protein Immunoblot), in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Hakuno, F., Takahashi, S.-I., 2018. IGF1 receptor signaling pathways. *J Mol Endocrinol* 61, T69–T86. <https://doi.org/10.1530/JME-17-0311>
- Hermida, M.A., Dinesh Kumar, J., Leslie, N.R., 2017. GSK3 and its interactions with the PI3K/AKT/mTOR signalling network. *Adv Biol Regul* 65, 5–15. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2017.06.003>
- Hernández-Sánchez, C., Blakesley, V., Kalebic, T., Helman, L., LeRoith, D., 1995. The role of the tyrosine kinase domain of the insulin-like growth factor-I receptor in intracellular signaling, cellular proliferation, and tumorigenesis. *J Biol Chem* 270, 29176–29181. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.49.29176>
- Hers, I., Vincent, E.E., Tavaré, J.M., 2011. Akt signalling in health and disease. *Cellular Signalling* 23, 1515–1527. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.05.004>
- Herzig, S., Shaw, R.J., 2018. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19, 121–135. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.95>
- Hoess, R.H., Ziese, M., Sternberg, N., 1982. P1 site-specific recombination: nucleotide sequence of the recombining sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 3398–3402. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.11.3398>
- Hunter, T., 2012. Why nature chose phosphate to modify proteins. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 367, 2513–2516. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0013>
- Kaese, S., Frommeyer, G., Verheule, S., van Loon, G., Gehrman, J., Breithardt, G., Eckardt, L., 2013. The ECG in cardiovascular-relevant animal models of electrophysiology. *Herzschrittmacherther Elektrophysiol* 24, 84–91. <https://doi.org/10.1007/s00399-013-0260-z>
- Kaese, S., Verheule, S., 2012. Cardiac electrophysiology in mice: a matter of size. *Frontiers in physiology* 3, 345. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00345>
- Kaidanovich-Beilin, O., Woodgett, J.R., 2011. GSK-3: Functional Insights from Cell Biology and Animal Models. *Front Mol Neurosci* 4, 40. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2011.00040>

- Ladner, C.L., Yang, J., Turner, R.J., Edwards, R.A., 2004. Visible fluorescent detection of proteins in polyacrylamide gels without staining. *Anal. Biochem.* 326, 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2003.10.047>
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- 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>
- Mahmood, T., Yang, P.-C., 2012. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci* 4, 429–434. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>
- 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>
- Mendoza, M.C., Er, E.E., Blenis, J., 2011. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends Biochem Sci* 36, 320–328. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.03.006>
- Mora, A., Sakamoto, K., McManus, E.J., Alessi, D.R., 2005. Role of the PDK1-PKB-GSK3 pathway in regulating glycogen synthase and glucose uptake in the heart. *FEBS Lett* 579, 3632–3638. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.05.040>
- Moritz, C.P., 2017. Tubulin or Not Tubulin: Heading Toward Total Protein Staining as Loading Control in Western Blots. *Proteomics* 17. <https://doi.org/10.1002/pmic.201600189>
- Nerbonne Jeanne M., Nichols Colin G., Schwarz Thomas L., Escande Denis, 2001. Genetic Manipulation of Cardiac K<sup>+</sup> Channel Function in Mice. *Circulation Research* 89, 944–956. <https://doi.org/10.1161/hh2301.100349>
- Obata, T., Yaffe, M.B., Leparo, G.G., Piro, E.T., Maegawa, H., Kashiwagi, A., Kikkawa, R., Cantley, L.C., 2000. Peptide and protein library screening defines optimal substrate motifs for AKT/PKB. *J Biol Chem* 275, 36108–36115. <https://doi.org/10.1074/jbc.M005497200>
- Patel, P., Woodgett, J.R., 2017. Glycogen Synthase Kinase 3: A Kinase for All Pathways? *Curr Top Dev Biol* 123, 277–302. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2016.11.011>
- 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>
- Riehle, C., Abel, E.D., 2016. Insulin Signaling and Heart Failure. *Circ Res* 118, 1151–1169. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.306206>
- Rivero-Gutiérrez, B., Anzola, A., Martínez-Augustín, O., de Medina, F.S., 2014. Stain-free detection as loading control alternative to Ponceau and housekeeping protein immunodetection in Western blotting. *Anal. Biochem.* 467, 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.08.027>
- Saxton, R.A., Sabatini, D.M., 2017. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* 168, 960–976. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.004>
- Schultze, S.M., Hemmings, B.A., Niessen, M., Tschopp, O., 2012. PI3K/AKT, MAPK and AMPK signalling: protein kinases in glucose homeostasis. *Expert Rev Mol Med* 14, e1. <https://doi.org/10.1017/S1462399411002109>
- Schultze, S.M., Jensen, J., Hemmings, B.A., Tschopp, O., Niessen, M., 2011. Promiscuous affairs of PKB/AKT isoforms in metabolism. *Arch Physiol Biochem* 117, 70–77.

<https://doi.org/10.3109/13813455.2010.539236>

- 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 bicinchoinic 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)
- 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>
- Solan, J.L., Lampe, P.D., 2014. Specific Cx43 phosphorylation events regulate gap junction turnover in vivo. *FEBS Lett* 588, 1423–1429. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.01.049>
- Song, M.S., Salmena, L., Pandolfi, P.P., 2012. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 283–296. <https://doi.org/10.1038/nrm3330>
- Speerschneider, T., Thomsen, M.B., 2013. Physiology and analysis of the electrocardiographic T wave in mice. *Acta physiologica (Oxford, England)* 209, 262–71. <https://doi.org/10.1111/apha.12172>
- 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)
- Sutherland, F.J., Hearse, D.J., 2000. The isolated blood and perfusion fluid perfused heart. *Pharmacol. Res.* 41, 613–627. <https://doi.org/10.1006/phrs.1999.0653>
- Szablewski, L., 2017. Glucose transporters in healthy heart and in cardiac disease. *International Journal of Cardiology* 230, 70–75. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.12.083>
- Vanhaesebroeck, B., Alessi, D.R., 2000. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J* 346 Pt 3, 561–576.
- Vasudevan, K.M., Garraway, L.A., 2010. AKT signaling in physiology and disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 347, 105–133. [https://doi.org/10.1007/82\\_2010\\_66](https://doi.org/10.1007/82_2010_66)
- Vazquez-Martin, A., Sauri-Nadal, T., Menendez, O.J., Oliveras-Ferreros, C., Cufi, S., Corominas-Faja, B., López-Bonet, E., Menendez, J.A., 2012. Ser2481-autophosphorylated mTOR colocalizes with chromosomal passenger proteins during mammalian cell cytokinesis. *Cell Cycle* 11, 4211–4221. <https://doi.org/10.4161/cc.22551>
- Yang, Z.-Z., Tschopp, O., Hemmings-Mieszczak, M., Feng, J., Brodbeck, D., Perentes, E., Hemmings, B.A., 2003. Protein kinase B alpha/Akt1 regulates placental development and fetal growth. *J Biol Chem* 278, 32124–32131. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302847200>
- 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>

## **Danksagung**

Zuallererst gilt mein Dank meiner Betreuerin Stefanie Gödecke und meinem Doktorvater Professor Axel Gödecke für die gute Betreuung während der Doktorarbeit. Ich habe die freundliche Arbeitsatmosphäre, die fachlichen Anregungen aber auch den persönlichen Austausch sehr geschätzt.

Herrn Professor Björn Stork danke ich für die Übernahme der Co-Betreuung.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei den Mitarbeitern des Instituts für Herz- und Kreislaufphysiologie Susanne Küsters, Daniela Müller, Julia Albrecht, Rianne Nederlof, Lisa Kalfhues, André Heinen und nochmals Stefanie Gödecke für die gerade in der Anfangszeit große Geduld bei der Einarbeitung und die Ratschläge bei Schwierigkeiten.

Darüber hinaus danke ich dem IRTG 1902, insbesondere Sandra Berger, Janett Schindler und Professor Axel Gödecke, für die Möglichkeit zur Teilnahme an diesem Projekt.

Meiner Frau Julia danke ich herzlich für die tolle Unterstützung während des gesamten Verlaufs des Projekts.

Zuletzt danke ich meinen Eltern für Unterstützung und Zuspruch während des Projekts und des gesamten Studiums. Danke auch an meine Schwestern und den Rest der Familie.