

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

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

Die Bedeutung des Insulinrezeptor-Signalweges in der Regulation der kardialen Kontraktilität

Die Rolle der Proteinkinase B

Dissertation

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

vorgelegt von
Dominika Miklós
(2026)

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Dr. med. André Heinen

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Joachim Schmitt

Meiner Mutter

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	II
Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 Die Herzfunktion.....	1
1.2 Elektromechanische Kopplung.....	1
1.3 Die β-adrenerge Stimulierung.....	3
1.4 Insulin und das kardiovaskuläre System	4
1.4.1 PI3K/AKT-Signalweg	4
1.4.2 AKT-Isoformen	6
1.4.3 Insulinvermittelte Effekte am Herzen	7
1.5 Ziele der Arbeit	8
2 Material und Methoden	10
2.1 Das transgene Mausmodell	10
2.2 Das isoliert perfundierte Herz	10
2.2.1 Das Langendorff-Modell	10
2.2.2 Versuchsablauf	11
2.3 Untersuchung der <i>in vivo</i> Herzfunktion	14
2.3.1 Konventionelle Echokardiographie	14
2.3.2 Strain Analyse	15
2.4 Proteinanalyse	17
2.4.1 Antikörper für Western Blot Analyse.....	17
2.4.2 Gele für Western Blot Analyse.....	18
2.4.3 Aufarbeitung des Herzwebes	18
2.4.4 Proteinmengenbestimmung	18
2.4.5 Gelelektrophorese und Transfer	18
2.4.6 Detektion von Proteinen mittels Immunfluoreszenz	19
2.4.7 Visualisierung der Gesamtproteinmenge	19
2.5 Computerprogramme	19
2.6 Statistik	19

3	Ergebnisse	20
3.1	Einfluss von Insulin auf die kardiale Kontraktilität.....	20
3.1.1	Die Injektion von 4-OH-Tamoxifen führte zum kardiomyozytären <i>Knockout</i> beider Isoformen AKT1 und AKT2.....	20
3.1.2	Die Behandlung mit 6 nM Insulin führte zum Anstieg der Insulinrezeptor-Phosphorylierung	21
3.1.3	Insulin verbesserte <i>in vitro</i> die kardiale Funktion der AKT1/2-KO Herzen, aber nicht der WT Herzen.....	22
3.2	<i>In vitro</i> Untersuchung der Funktion von Herzen von Mäusen mit AKT-isoformspezifischem <i>Knockout</i> hinsichtlich eines Insulineffekts	25
3.2.1	Die Injektion von 4-OH-Tamoxifen resultierte in einem kardiomyozytären <i>Knockout</i> von AKT1 oder AKT2	25
3.2.2	Untersuchung der Insulinstimulierung der isoformspezifischen AKT- <i>Knockout</i> Herzen	26
3.2.3	Insulin verbessert die Herzfunktion von isoformspezifischen AKT-KO Mäusen	27
3.3	Untersuchung der Auswirkung von Insulin auf die Zunahme der Kontraktilität durch β-Adrenozeptor-Stimulierung	29
3.4	Insulin bewirkt einen durch AKT-Verlust vermittelten Effekt auf die <i>in vivo</i> kardiale Kontraktilität	31
3.4.1	Die intraperitoneal verabreichte Dosis von Insulin hat den Signalweg ebenfalls aktiviert....	31
3.4.2	Die <i>in vivo</i> Echokardiographie zeigte eine Verbesserung der kardialen Kontraktilität der AKT1/2-KO, aber nicht der WT Herzen nach Insulingabe	32
3.4.3	Der myokardiale Strain war nach der Behandlung mit Insulin höher in der AKT1/2-KO, aber nicht in der WT Gruppe	33
3.5	Molekularbiologische Untersuchungen	35
3.5.1	Western Blot Analyse der GSK-3 β -Phosphorylierung der AKT1/2-KO Herzen	35
3.5.2	Untersuchung des MAP-Kinase-Weges	37
3.5.3	Das Fehlen von AKT1/2 in den Herzen beeinflusste die PKA-Expression nicht	38
3.5.4	Western Blot Analysen der Troponin I-Phosphorylierung.....	39
3.5.5	Die Untersuchung der Herzen aus den <i>in vivo</i> Versuchen ergab keine Unterschiede bezüglich der Phospholamban-Phosphorylierung	41
3.5.6	Die Untersuchung des Phosphorylierungsgrades von Phospholamban in den isoliert perfundierten Herzen.....	43
4	Diskussion	45
4.1	Die Auswirkung von Insulin bei AKT-Verlust auf die kardiale Kontraktilität.....	45
4.2	Die Rolle von Insulin in der β-Adrenozeptor vermittelten Steigerung der kardialen Kontraktilität.....	48

4.3	Untersuchungen auf molekularbiologischer Ebene	49
4.4	Schlussfolgerung	51
	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	52
	Danksagung.....	

Zusammenfassung

Insulin ist ein lebenswichtiges Hormon, das vor allem für die Regulation des Blutzuckerspiegels bekannt ist, aber auch eine wichtige Rolle für die Herzfunktion spielt. Insulin fördert in Kardiomyozyten über dem PI3K/AKT-Signalweg die Glukoseaufnahme, die Fettsäureoxidation und die Energiebereitstellung, was für die Aufrechterhaltung der kontraktilen Funktion essenziell ist. Eine Beeinträchtigung des Insulin-Signalweges kann zum klinischen Bild eines Diabetes mellitus führen, in dessen Rahmen es dann zu einer Verschlechterung der Herzfunktion kommen kann. Somit kommt einem genaueren Verständnis des regulatorischen Einflusses von Insulin auf die kardiale Pumpfunktion sowie der Mechanismen, wie Störungen des Insulin-Signalwegs als Auslöser kardialer Funktionsstörungen fungieren können, eine hohe wissenschaftliche Bedeutung zu. Im Rahmen dieser Dissertation wurde zunächst untersucht, ob Insulin einen direkten Effekt auf die kardiale Kontraktilität besitzt, und wenn ja, ob dieser Effekt AKT-abhängig ist. AKT, auch Proteinkinase B genannt, wird in Kardiomyozyten im Wesentlichen in zwei Isoformen, AKT1 und AKT2, exprimiert. Wir konnten an isoliert perfundierten Herzen von Mäusen mit einem induzierbaren Kardiomyozyten-spezifischen, kombinierten *Knockout* (KO) von AKT1 und AKT2 (AKT1/2-KO) zeigen, dass Insulin in wildtypischen Tieren der Kontrollgruppe keinen Effekt auf die kardiale Funktion hatte. Demgegenüber zeigten die Herzen der Mäuse mit AKT1/2-KO bereits basal eine herabgesetzte kardiale Kontraktilität, welche durch Insulingabe normalisiert wurde. Untersuchungen an Herzen mit isoliertem KO von entweder AKT1 oder AKT2 ergaben keinen Hinweis auf eine Isoformspezifität des Insulineffektes. Echokardiographische Untersuchungen bestätigten *in vivo* sowohl eine reduzierte basale kardiale Funktion in den AKT1/2-KO Mäusen, als auch die Effekte von Insulin, das heißt eine Verbesserung der Pumpfunktion in AKT1/2-KO Mäusen sowie einen fehlenden Insulineffekt in den wildtypischen Mäusen. Des Weiteren haben wir eine mögliche Beeinflussung des positiv inotropen Effektes einer β -Adrenozeptorstimulation durch Insulin an isoliert perfundierten Herzen von wildtypischen Mäusen untersucht. Hierbei ergaben sich keine Hinweise darauf, dass Insulin einen Effekt auf eine β -Adrenozeptor-vermittelten Kontraktilitätssteigerung hat. Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse, dass (1) kardiomyozytäres AKT von zentraler Bedeutung für die Herzfunktion ist, (2) Insulin in wildtypischen Herzen weder *in vitro* noch *in vivo* einen akuten Einfluss auf die kardiale Funktion hat, demgegenüber aber bei Verlust der AKT-Isoformen AKT1 und AKT2 zu einer Normalisierung der Herzfunktion führt, und (3) der positiv inotrope Effekt einer β -Adrenozeptorstimulation nicht durch Insulin beeinflusst wird.

Summary

Insulin is a vital hormone primarily known for its role in regulating blood glucose levels, but it also plays a significant role in cardiac function. Through the PI3K/AKT signalling pathway in cardiomyocytes, insulin promotes glucose uptake, fatty acid oxidation, and energy production, all of which are essential for maintaining contractile function. Impairment of the insulin signalling pathway can lead to the clinical manifestation of diabetes mellitus. Over time, disruption in glucose uptake and the resulting metabolic changes can lead to a decline in cardiac function. Therefore, a comprehensive understanding of the regulatory effects of insulin on cardiac pump function, as well as the underlying mechanisms through which impairments in insulin signalling may contribute to cardiac dysfunction, holds significant scientific relevance. As part of this dissertation, we first investigated whether insulin exerts a direct effect on cardiac contractility and, if so, whether this effect is dependent on AKT signalling. In cardiomyocytes, AKT, also known as protein kinase B, is predominantly expressed in two isoforms: AKT1 and AKT2. Using isolated perfused hearts from mice with an inducible, cardiomyocyte-specific, combined knockout (KO) of AKT1 and AKT2 (AKT1/2-KO), we demonstrated that insulin had no effect on cardiac function in wild-type control animals. In contrast, hearts from AKT1/2-KO mice exhibited reduced basal cardiac contractility, which was then normalised upon insulin treatment. Experiments using hearts with isoform specific knockout of either AKT1 or AKT2 showed no clear evidence of isoform specificity in the insulin effect. Echocardiographic studies confirmed *in vivo* both a reduced basal cardiac function in AKT1/2-KO mice and the effects of insulin; namely, an improvement in pump function in AKT1/2-KO mice and an absence of insulin effects in wild-type mice.

Furthermore, we investigated a potential modulation of the positive inotropic effect of β -adrenoceptor stimulation by insulin. These experiments using isolated perfused hearts from wild-type mice provided no evidence that insulin influences β -adrenoceptor-mediated increases in contractility.

In summary, our results show that (1) cardiomyocyte AKT is critically important for cardiac function, (2) insulin has no acute effect on cardiac function in wild-type hearts either *in vitro* or *in vivo*, but normalises cardiac function in the absence of both AKT1 and AKT2 isoforms, and (3) the positive inotropic effect of β -adrenoceptor stimulation is not modulated by insulin.

Abkürzungsverzeichnis

4-OH-Txf	4-Hydroxytamoxifen	GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
ATP	Adenosintriphosphat	G_s	stimulierendes G-Protein
AGC	Proteinfamilie, verwandt mit der <u>A</u> MP/ <u>G</u> MP Kinase und Proteinkinase <u>C</u>	GSK-3β	Glykogensynthase-Kinase 3 β
B-Mode	<i>Brightness-Mode</i>	H₂O	Wasser
BCA	Bicinchoninsäure-Assay	H₂O₂	Wasserstoffperoxid
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>	HF	Herzfrequenz
BL	basal	HL-1	<i>heart like</i> Zelllinie
BSA	Bovines Serumalbumin	IE	Internationale Einheit
CaCl₂	Kalziumchlorid	IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat	INS	Insulingabe
CF	Koronarfluss	IR	Insulinrezeptor
CICR	Kalzium-induzierte Kalzium- Freisetzung	k	kilo-
Cre	<i>causes recombination</i>	KCl	Kaliumchlorid
Da	Dalton	KH₂PO₄	Kaliumdihydrogenphosphat
DHPR	Dihydropyridinrezeptoren	KHP	Krebs-Henseleit-Puffer
dP/dt_{max}	maximale Druckanstiegs- geschwindigkeit	KO	<i>Knockout</i>
dP/dt_{min}	minimale Druckanstiegs- geschwindigkeit	l	Liter
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	loxP	<i>locus of crossing over</i>
EDV	Enddiastolisches Volumen	LTC	L-Typ-Kalziumkanal
EF	Ejektionsfraktion	LVDP	Linksventrikulärer entwickelter Druck
EGF	<i>epidermal growth factor</i>	m	milli-/Meter
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinases</i>	M	Molar
ESV	Endsystolisches Volumen	MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat- Dehydrogenase	MEK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase
G_i	hemmendes G-Protein	Mer	mutagenisierter Östrogen- rezeptor
GLUT	Glukose-Transporter	MgSO₂	Magnesiumsulfat
GMP	Guanosinmonophosphat	min	Minute
		mmHg	Millimeter Quecksilbersäule

mTORC	<i>mechanistic Target of Rapamycin Complex</i>	SDS	Natrium-Laurylsulfat
n	nano-	SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
NaCl	Natriumchlorid	SERCA	Sarkoplasmatische Kalzium-ATPase
NaHCO₃	Natriumhydrogencarbonat	SR	Sarkoplasmatisches Retikulum / Strain Rate
NAPDH	Nicotinamidadenin-dinukleotidphosphat	T-Tubulus	Transversaltubulus
NCX	Natrium-Kalzium-Austauscher	TBS-T	<i>Tris-buffered saline mit Tween 20</i>
NOX	NAPDH-Oxidase	TEMED	Tetramethylethylendiamin
P	Phospho-	TPS	<i>Total Protein Staining</i>
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung	VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
PDGF	platelet derived growth factor	WT	Wildtyp
PDK	<i>Phosphoinositide-dependent Kinase</i>	ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben
PH	<i>Pleckstrin</i> -Homologie	β-AR	β-Adrenozeptor
PHLPP	<i>PH domain and Leucine rich repeat Protein Phosphatases</i>	μ	mikro-
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase		
PIP₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat		
PIP₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat		
PKA	Proteinkinase A		
PKB	Proteinkinase B		
PLN	Phospholamban		
PP2A	Proteinphosphatase 2A		
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin homolog</i>		
PVDF	Polyvinylidenfluorid		
RAF	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>		
RAS	<i>Rat sarcoma</i>		
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies		
RyR2	Ryanodinrezeptor 2		
SAX	Parasternale kurze Achse		

1 Einleitung

1.1 Die Herzfunktion

Das Herz ist die zentrale Pumpe des Blutkreislaufes und gewährleistet den kontinuierlichen Transport von Blut durch den Körper. Grundlage für die Pumpfunktion ist eine zeitlich und räumlich aufeinander abgestimmte Kontraktion und Relaxation der Herzmuskelzellen. Die quergestreifte Herzmuskulatur besteht aus den ein- oder zweikernigen Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten), die verzweigt aufgebaut sind und untereinander zu Herzmuskelfasern verbunden werden. Die Herzmuskelfasern verlaufen weiter als Bündel zirkulär, schräg und longitudinal und ermöglichen somit eine konzentrische Kontraktion der Ventrikel sowie eine longitudinale Verkürzung. Histologisch zeichnet sich die Herzmuskulatur durch tiefe Einstülpungen der Plasmamembran aus, welche Transversaltubuli (T-Tubuli) genannt werden. Die T-Tubuli verlaufen senkrecht zur Faserrichtung und ermöglichen eine schnellere Übertragung der Depolarisation in das Zellinnere. Hier liegen zusätzlich die L-Typ-Kalziumkanäle, die sich in räumlicher Nähe zu den Terminalzisternen des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) befinden. Im Inneren der Herzmuskelzelle befinden sich die längs angeordneten Myofibrillen, die aus den kontraktilen Proteinen Aktin und Myosin bestehen. Parallel zu den Myofibrillen verläuft das SR, welches Kalzium speichert. Bei Ausbildung eines kardiomyozytären Aktionspotentials kommt es zu einem Anstieg der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration, wodurch die Interaktion von Aktin und Myosin als Grundlage der kardialen Kontraktion ermöglicht wird. Außerdem beinhaltet die Herzmuskelzelle eine hohe Anzahl an Mitochondrien, die für eine beständige Energieversorgung sorgen. Die mechanische Antwort auf die elektrische Erregung wird als elektromechanische Kopplung bezeichnet. Spezialisierte Herzmuskelzellen bilden das Erregungsbildungs- und Erregungsleitungssystem, welches für die zeitlich und örtlich kontrollierte Abfolge von Erregung, Kontraktion und Relaxation sorgt. Über Zellkontakte in den Zellmembranen, die so genannten Glanzstreifen (*Gap Junctions*) zwischen benachbarten Kardiomyozyten, können die elektrischen Signale (Aktionspotenziale) weitergeleitet werden, wodurch letztendlich eine synchrone Kontraktion des Herzens ermöglicht wird [1].

1.2 Elektromechanische Kopplung

Die Umwandlung eines Aktionspotenzials in eine mechanische Kontraktion am Kardiomyozyten wird als elektromechanische Kopplung [2] bezeichnet (Abb. 1). Der Herzzyklus umfasst die Systole (Kontraktionsphase) und die Diastole (Erschlaffungsphase). Im Wesentlichen wird dieser Prozess durch den aufeinanderfolgenden Anstieg und Abfall der zytosolischen Kalziumkonzentration gesteuert, wobei das Ausmaß der kardiomyozytären Kontraktionskraft

maßgeblich von der zytosolischen Kalziumkonzentration abhängt [2]. Eine durch das Erregungsleitungssystem koordinierte Kontraktion der Kardiomyozyten ermöglicht die reguläre Pumpfunktion des Herzens und somit die Aufrechterhaltung des Blutkreislaufes. Im Rahmen der elektromechanischen Kopplung führt die Entstehung eines Aktionspotenzials zur Öffnung von spannungsaktivierten L-Typ-Kalziumkanälen (LTC, Dihydropyridinrezeptoren = DHPR), die einen Einstrom von Kalzium entlang seines elektrochemischen Gradienten in die Zelle bewirken. Der Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration vermittelt das Signal für eine zusätzliche und quantitativ noch größere Freisetzung weiterer Kalziumionen aus dem SR, welches sich in räumlicher Nähe zu den LTCs befindet, in das Zytosol [1]. Dieser KalziumEinstrom wird als Kalzium-induzierte Kalzium-Freisetzung (CICR) bezeichnet und erfolgt über den Ryanodin-Rezeptor 2 (RyR2) [3]. Der plötzliche und massive Anstieg des Kalziumspiegels im Zytosol leitet die mechanische Kontraktion ein. Für den Kontraktionszyklus ist die Interaktion der Myofilamente Aktin und Myosin notwendig. Während der Diastole wird dies durch Tropomyosin und den Troponin-Komplex, bestehend aus Troponin T, Troponin I und Troponin C, verhindert. Kalzium kann an Troponin C binden und somit zu einer Konformationsänderung des hemmenden Komplexes führen [2]. Dadurch wird die Interaktion von Aktin und Myosin ermöglicht, und es kommt zur Kontraktion. Danach folgt die Relaxation, die durch ein Absinken der Kalziumkonzentration im Zytosol hervorgerufen wird. Die sarkoplasmatische Kalzium-ATPase 2a (SERCA2a) ist in der Lage, Kalzium rasch und aktiv zurück in das SR zu pumpen. Im SR ist das Kalzium hauptsächlich an einem Kalzium-Speicherprotein, an Calquestrin gebunden. Die SERCA2a wird durch Phospholamban (PLN) gehemmt [4]. PLN kommt als aktives Monomer sowie als Pentamer vor, wobei die Pentamere mutmaßlich als Speicher von Monomeren dienen [5]. Durch die cAMP-abhängigen Proteinkinasen wird PLN phosphoryliert, dadurch wird die Aktivität der SERCA2a enthemmt und die Wiederaufnahme von Kalzium in das SR gesteigert. Außerdem befindet sich ein Natrium-Kalzium-Austauschcarrier (NCX) in der Plasmamembran, der durch die Natrium-Kalium-ATPase verursachten Natriumgradienten getrieben wird und Kalzium aus dem Zytosol in den Extrazellularraum befördert. Die Kalzium-ATPase der Zellmembran transportiert Kalzium aktiv aus der Zelle.

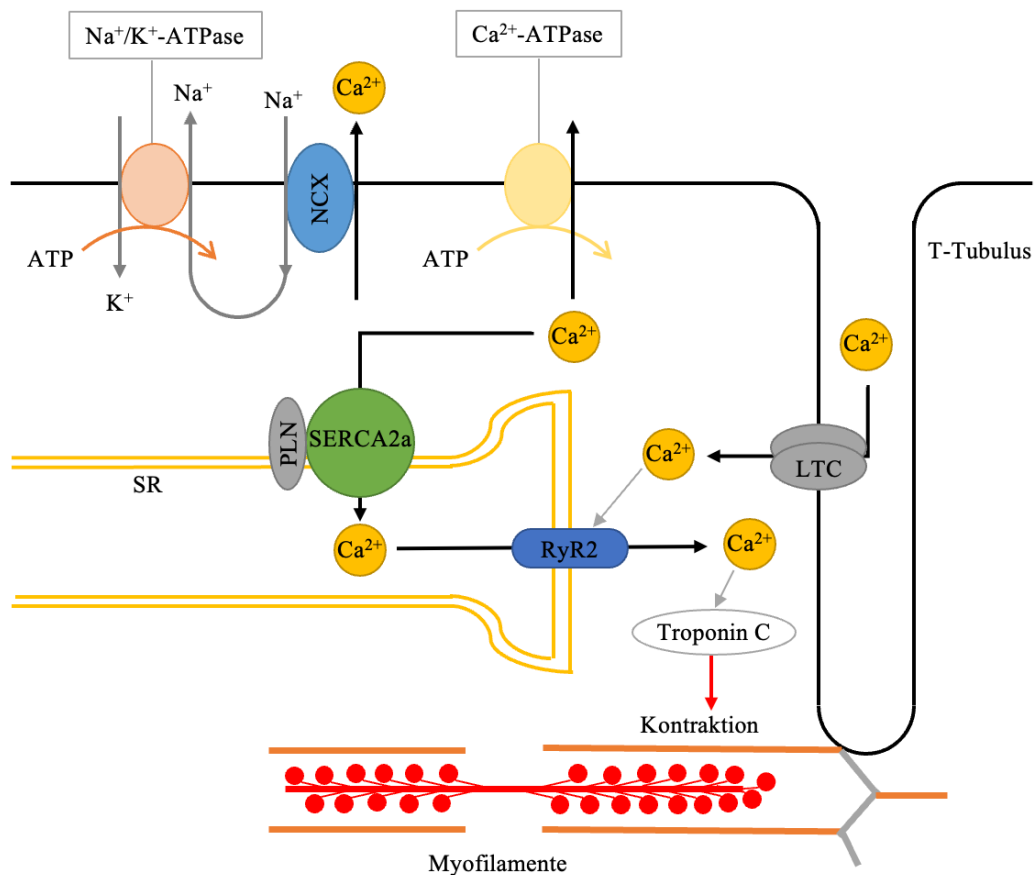


Abb. 1: Kalziumhomöostase im Kardiomyozyten. Durch die Öffnung der spannungsgesteuerten L-Typ Kalziumkanäle (LTC) strömt Kalzium ins Zytosol ein. Der Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration bewirkt die Öffnung von Ryanodin-Rezeptor 2 (RyR2) am sarkoplasmatischen Retikulum (SR), wodurch große Mengen an Kalzium ins Zytosol strömen. Dies führt zur Kontraktion der Myofilamente. Die Eliminierung des Kalziums aus dem Zytosol erfolgt über zwei Mechanismen. Die sarkoplasmatische Kalzium-ATPase 2a (SERCA2a) ermöglicht den aktiven Rücktransport in das SR und wird durch Phospholamban (PLN) reguliert. Der Natrium-Kalzium-Austauscher (NCX), die Kalzium-ATPase transportieren Kalzium in den Extrazellarraum. [6]

1.3 Die β -adrenerge Stimulierung

Die Anpassung der Kontraktilität des Myokards (Inotropie) an Situationen, welche eine gesteigerte Herzleistung erfordern, zum Beispiel Stress oder körperliche Belastung, ist unerlässlich für die Aufrechterhaltung einer stabilen Kreislauffunktion. Die Inotropie kann hauptsächlich durch die Beeinflussung der im Zytosol vorliegenden Kalziumkonzentration reguliert werden. Ein Mechanismus, der die Steigerung der Inotropie bewirken kann, ist die Aktivierung des β -Adrenozeptors (β -AR) durch zum Beispiel Noradrenalin und Adrenalin. Der β -AR gehört zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) und ist an ein stimulierendes G-Protein (G_s)

gekoppelt. Die membrangebundene Adenylylcyclase wird aktiviert, die die Synthese von zyklischem AMP (cAMP) aus ATP katalysiert und somit den intrazellulären cAMP-Spiegel ansteigen lässt. Dadurch ist der sekundäre Botenstoff cAMP in der Lage, die Serin-/Threonin-Kinase Proteinkinase A (PKA) zu aktivieren [7]. Anschließend kann die PKA ihre Zielproteine phosphorylieren und somit die kardiale Kontraktilität beeinflussen. Zunächst phosphoryliert die PKA den membranständigen Kalziumkanal, sodass Kalzium in das Zellinnere strömen und die CICR bewirken kann. PKA führt zur Phosphorylierung der RyR2 und somit zur erhöhten Freisetzung von Kalzium aus dem SR. Die hohe Menge an Kalzium als Bindungspartner für Troponin C wirkt positiv inotrop. Außerdem hebt die PKA-vermittelte Phosphorylierung von PLN deren inhibitorische Wirkung auf die SERCA2a auf, wodurch mehr Kalzium schneller ins SR zurückgepumpt werden kann [8]. Dieser Effekt verkürzt die Relaxationszeit und wird als positiv lusitrop bezeichnet. Darüber hinaus phosphoryliert die PKA Troponin I und führt zu einer Abnahme der Kalziumsensitivität der Myofilamente [9], das heißt Kalzium kann schneller vom Troponin C abdissoziieren, das ebenfalls zur positiv lusitropen Wirkung beiträgt. Die β -adrenerge Stimulation kann somit zu einer physiologischen Steigerung der Herzleistung führen und die Herzleistung an die Bedürfnisse des Organismus anpassen.

Eine chronisch erhöhte pathophysiologische β -adrenerge Stimulierung fördert ein kardiales *Remodeling*, welches zur Entwicklung von Herzhypertrophie, Fibrose und Herzinsuffizienz führt [10]. Es gibt Hinweise dafür, dass eine anhaltende und übermäßige Stimulation der β -AR nicht nur zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz führen kann, sondern auch mit der Pathogenese einer Insulinresistenz im Herzen verbunden sein kann [11]. Letztlich sind aber die pathologischen Folgen der Interaktion zwischen dem β -AR und der Insulinsensitivität, sowie der Mechanismus, durch den eine Überstimulation des β -AR die Insulinresistenz fördert, jedoch noch unklar [11].

1.4 Insulin und das kardiovaskuläre System

1.4.1 PI3K/AKT-Signalweg

Die Signalübertragung von Insulin erfolgt über den PI3K/AKT-Signalweg (Abb. 2). Die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) kann entweder über die Rezeptor-Tyrosin-Kinase (RTK) durch Wachstumsfaktoren wie Insulin, *Insulin-like growth factor 1* (IGF-1), *platelet derived growth factor* (PDGF), *epidermal growth factor* (EGF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *basic fibroblast growth factor* (bFGF) oder über GPCR aktiviert werden. Dadurch kann die PI3K an der Plasmamembran die Umwandlung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP_3) katalysieren. PIP_3 ist in der Lage als Dockingstelle für Proteine mit *Pleckstrin*-homologischen (PH) Domänen, insbesondere *Phosphoinositide-dependent Kinase-1* (PDK1) und AKT zu dienen. Durch diese Rekrutierung werden AKT, auch Proteinkinase B (PKB) genannt, und PDK1 in unmittelbarer Nähe zueinander auf der Zellmembran

positioniert. Daraufhin wird AKT durch zwei aufeinanderfolgende Phosphorylierungsschritte aktiviert. PDK1 phosphoryliert AKT an Threonin 308 [12]. Im zweiten Schritt erfolgt die Phosphorylierung von AKT an Serin 473 durch den *mechanistic Target of Rapamycin Complex 2* (mTORC2) [13]. Nur nach diesen zwei Phosphorylierungsschritten kann das aktivierte AKT in das Zytoplasma und den Nukleus translozieren und deren Substrate phosphorylieren. Die Inaktivierung von AKT kann entweder durch das *Phosphatase and Tensin homolog* (PTEN) erfolgen, welches PIP_3 zu PIP_2 dephosphoryliert und somit indirekt die Aktivität von AKT hemmt [14], oder durch eine direkte Dephosphorylierung von AKT durch die Proteinphosphatase 2A (PP2A) und/oder die *PH domain and Leucine rich repeat Protein Phosphatases* (PHLPP) [15, 16].

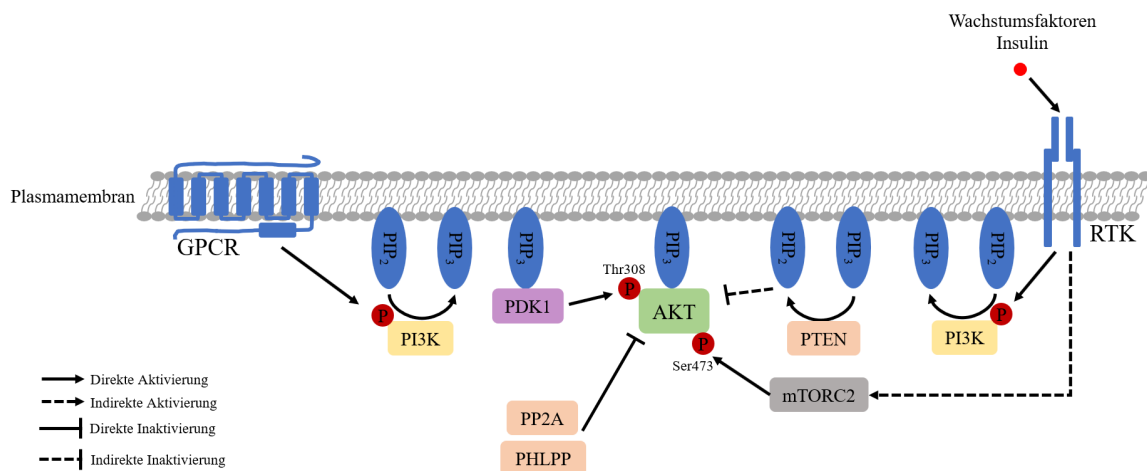


Abb. 2: PI3K/AKT-Signalweg. Durch die Ligandenaktivierung von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) oder G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) wird die membrangebundene Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) phosphoryliert und kann die Umwandlung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP_3) katalysieren. Anschließend werden PDK1 und AKT über deren *Pleckstrin*-Homologie Domänen rekrutiert, dies ermöglicht die Phosphorylierung von AKT an Threonin (Thr) 308 durch PDK1. Eine zweite zusätzliche Phosphorylierung von AKT an Serin (Ser) 473 durch das *mechanistic Target of Rapamycin Complex 2* (mTORC2) führt zur vollständigen Aktivierung von AKT. Die Inaktivierung kann direkt durch die Dephosphorylierung von AKT durch PP2A und PHLPP erfolgen oder indirekt durch die Dephosphorylierung von PIP_3 zu PIP_2 vermittelt über PTEN. [12]

Der PI3K/AKT-Signalweg spielt eine zentrale Rolle bei der Vermittlung der insulinabhängigen Signalübertragung. Eine der wichtigsten Funktionen von Insulin ist die Aufrechterhaltung der Glukosehomöostase, die für den ungestörten Ablauf des kardialen Stoffwechsels notwendig ist. Diese wird hauptsächlich über die insulinvermittelte Translokation von Glukose-Transporter 4 (GLUT4) aus intrazellulären Speichern in die Zellmembran reguliert [17], sodass in der Anwesenheit von Insulin mehr Glukose in die Zellen aufgenommen werden kann. Der ebenfalls in der Zellmembran lokalisierte GLUT1 sorgt für die basale Glukoseaufnahme in die Zelle.

Die Aktivierung von AKT ist maßgeblich für die Regulation zahlreicher zellulärer Prozesse. Das durch Insulin aktivierte AKT kann die Glykogensynthase-Kinase 3 β (GSK-3 β) an Serin 9

phosphorylieren und somit die GSK-3 β inaktivieren [18]. Die GSK-3 β spielt eine Rolle in der Regulation der Glykogensynthese, indem sie in ihrem aktivierten Zustand die Glykogensynthase phosphoryliert und somit inaktiviert [19]. Die GSK-3 β interagiert darüber hinaus mit zahlreichen Transkriptionsfaktoren und kann die Proliferationsrate von Zellen kontrollieren [20].

Außerdem führt Insulin über einen mehrstufigen Prozess, durch den *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) Signalweg, zu einer Phosphorylierung von ERK1/2. Das an der Plasmamembran lokalisierte RAS wird im ersten Schritt durch Insulin aktiviert, welches im Anschluss die RAF-Kinase aktiviert und im Folgenden die MEK-Kinase, welche in der Lage ist ERK zu phosphorylieren [21]. Die somit aktivierte ERK kann in den Nukleus translozieren, um dann mit Transkriptionsfaktoren zu interagieren und die Zellproliferation zu regulieren.

1.4.2 AKT-Isoformen

AKT besitzt eine zentrale Rolle in der Regulation zellulärer Prozesse wie Wachstum, Proliferation, Zellüberleben und Metabolismus. AKT wurde 1991 gleichzeitig von drei verschiedenen Forschungsgruppen entdeckt [22-24]. Die Serin/Threonin-Kinase gehört zu der AGC-Kinase Familie (verwandt mit der AMP/GMP Kinase und Proteinkinase C). Sie besteht aus der N-terminalen PH, der zentralen katalytischen und der C-terminalen regulatorischen Domäne. Im Genom der Säugetiere kommt die PKB in drei Isoformen vor, die durch drei verschiedene Gene kodiert werden: *AKT1*, *AKT2*, *AKT3*. Alle Isoformen besitzen eine hohe Sequenzhomologie und üben im Herz-Kreislaufsystem wichtige und vielfältige Aufgaben aus. Sie sind ubiquitär im Organismus vorhanden, weisen jedoch unterschiedliche Verteilungsmuster auf. AKT1 ist weit verbreitet, während AKT2 vermehrt in insulinsensitiven Geweben exprimiert wird, wie zum Beispiel Skelettmuskel, Herz, Pankreas und Leber. AKT3 spielt im Gehirn, Ovarien und Testis eine entscheidende Rolle in der Gewebshomöostase. Funktionen, welche auf die verschiedene Isoformen zurückzuführen sind, wurden mittels isoformspezifischen AKT-*Knockout* (KO) Mäusen untersucht. Die Depletion von AKT1 resultierte in Wachstumsretardierung und Zunahme von Apoptose, jedoch waren die AKT1-KO Mäuse immer noch lebensfähig [25]. Bei den AKT2-KO Mäusen wurden erhöhte Blutglukose-Spiegel und eine Insulinresistenz gefunden, somit bestanden Ähnlichkeiten zu einem diabetischen Phänotyp [26]. Demzufolge besitzt AKT2 die Aufgabe der Aufrechterhaltung einer normalen Glukosehomöostase. Der Verlust von AKT3 führte zu einer Einschränkung der Gehirnentwicklung und dadurch zu einer Reduktion der Hirngröße und Hirnmasse [27, 28]. Untersuchungen von Mäusen mit kombiniertem Verlust der AKT-Isoformen AKT1 und AKT2 (AKT1/2-KO) zeigten schwerwiegende Wachstumseinschränkungen, und die Mäuse starben kurz nach der Geburt. Außerdem hatten diese AKT1/2-KO Mäuse eine durchsichtige Haut, eine zellulär bedingte Skelettmuskelatrophie, eine verzögerte Ossifikation der Knochen sowie eine schwere Behinderung der Adipogenese [29].

Im Herzmuskel dominieren die Isoformen AKT1 und AKT2. Gezielte Untersuchungen der Herzen von AKT1-KO Mäusen zeigten, dass AKT1 die pathologische Hypertrophie des Herzes hemmt und gleichzeitig die physiologische Hypertrophie unterstützt [30]. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass AKT2 die insulinvermittelte Glukoseaufnahme fördert und eine anti-apoptotische Rolle im Herzen besitzt, aber keinen Einfluss auf das physiologische oder pathologische Wachstum des Myokards ausübt [31].

1.4.3 Insulinvermittelte Effekte am Herzen

Seit der Entdeckung von Insulin im Jahre 1921 wurde die Funktion von Insulin ausführlich untersucht, wobei die Untersuchungen insbesondere an Geweben mit einer hohen Dichte von Insulinrezeptoren wie der Leber, dem Fettgewebe oder der Skelettmuskulatur durchgeführt wurden. Die Effekte von Insulin werden über dem PI3K/AKT-Signalweg vermittelt, wobei jedoch noch nicht annähernd vollständig entschlüsselt wurde, insbesondere am Herzen, welche weiteren Signalwege durch den Insulin-Signalweg moduliert werden [32].

Ein Diabetes mellitus stellt eine chronisch fortschreitende Stoffwechselerkrankung dar, die durch eine gestörte Insulin-Signalübertragung, welche beispielsweise durch einen Insulinmangel und / oder eine Insulinresistenz gekennzeichnet ist. Die hierbei auftretenden erhöhten Blutzuckerwerte (Hyperglykämie) führen unter anderem zu einer Beeinträchtigung der Herzfunktion und können das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen erhöhen. Mit einem Diabetes mellitus sind auch eine erhöhte Inzidenz von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, zerebrovaskulären Erkrankungen sowie der peripheren arteriellen Erkrankung assoziiert [33]. Eine diabetische Kardiomyopathie wird als eine linksventrikuläre Dysfunktion definiert, die unabhängig von Risikofaktoren wie einer koronaren Herzerkrankung oder arteriellen Hypertonie bei Patienten mit Diabetes mellitus auftritt [34]. Eines der ersten Zeichen für das Vorliegen einer diabetischen Kardiomyopathie ist eine linksventrikuläre diastolische Dysfunktion, entweder allein oder zusammen mit einer systolischen Dysfunktion [35]. Bei diabetischen Herzen wurden strukturelle Veränderungen im Myokard beobachtet, unter anderem eine Hypertrophie der Kardiomyozyten sowie eine Myokardfibrose. Einer der Hauptmechanismen der diabetischen Kardiomyopathie scheint eine durch ein Kollagen-*Remodeling* verursachte extrazelluläre Matrixveränderung zu sein, welche zur interstitiellen Fibrose des Myokardiums führt [36]. Die Myokardfibrose beeinträchtigt die *Compliance* des Herzens, wobei die erhöhte kardiale Steifigkeit zu einer reduzierten linksventrikulären Füllung, sowie erhöhten Füllungsdrücken beiträgt. Zu den weiteren nachteiligen kardiovaskulären Effekten von Diabetes mellitus gehören eine reduzierte systolische Funktion des linken Ventrikels, sowie eine erhöhte linksventrikuläre Muskelmasse und Wanddicke [37].

IGF-1 ist sowohl strukturell als auch funktionell mit Insulin verwandt, und spielt eine entscheidende Rolle bei der Stimulierung der physiologischen linksventrikulären Hypertrophie und schützt vor kardialer Dysfunktion [38]. Bei der Untersuchung der Folgen der kardialen Überexpression des

IGF1-Rezeptors zeigte sich eine deutliche Reduktion der diabetesinduzierten Kollagenablagerung und dadurch bedingte Verhinderung der Entwicklung der Myokardfibrose und der diastolischen Dysfunktion [39].

Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine reduzierte PI3K-Aktivität die Entwicklung der diabetischen Kardiomyopathie beschleunigt, und dass eine verstärkte PI3K-Aktivität das kardiale *Remodeling* und Dysfunktion beim Diabetes mellitus verhindern kann [40]. Andersherum konnte in Patienten mit Herzinsuffizienz und dilatativer Kardiomyopathie eine Insulinresistenz beobachtet werden [41]. Interessanterweise ist die Inzidenz von Herzinsuffizienz bei Patienten mit Diabetes mellitus deutlich höher als bei Patienten ohne Diabetes mellitus [42]. Es ist hervorzuheben, dass die Herzinsuffizienz durch eine Dysregulation des sympathischen Nervensystems gekennzeichnet ist, welche wiederum zu einer verstärkten Stimulation des β -AR führt und mit der Pathogenese der Insulinresistenz im Herzen assoziiert ist [11].

Die genauen Mechanismen, die den Zusammenhang zwischen der Überstimulation von β -AR und Beeinträchtigung der Insulinaktivität im Herzen beschreiben, sind noch nicht vollständig erforscht. In der Literatur wird eine Interaktion des β -Adrenozeptor-Signalweges und des Insulin-Signalweges am Herzen beschrieben, indem Insulin die β -adrenerg-vermittelte Kontraktilitätssteigerung herabgesetzt hat [43]. In den Untersuchungen der metabolischen und inotropen Signalwege im isolierten Kardiomyozyten konnte gezeigt werden, dass Insulin den durch ein β -adrenerge Stimulierung verursachten kontraktilitätssteigernden Effekt inhibiert [44]. Eine weitere Arbeit beschrieb ähnliche Ergebnisse an isolierten Kardiomyozyten sowie an isoliert perfundierten Herzen, indem die β -adrenerg-induzierte Kontraktilitätssteigerung durch Insulin herabgesetzt wurde [43]. Die kardiale Insulinresistenz geht mit einem gestörten Insulin-*Signalling* einher. Es gibt Hinweise, dass die Beeinträchtigung des PI3K/AKT-Signalweges zu einer gestörten Kalziumregulation führen kann [45]. Außerdem ließen sich anhand quantitativer Phosphoproteomanalysen isolierter Kardiomyozyten Phosphorylierungsstellen identifizieren, die einen Zusammenhang zwischen AKT und der Kopplung von Erregung und Kontraktion unterstützen [46]. Zu diesen nachgewiesenen Phosphoproteinen gehören unter anderem der L-Typ Kalziumkanal, der Ryanodin-Rezeptor, das PLN und noch weitere. Diese Ergebnisse könnten auf eine direkte Regulation der kardialen Kontraktilität durch Insulin hindeuten.

1.5 Ziele der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit bestand in einer Erkenntnisgewinnung über den Einfluss von Insulin auf die kardiale Kontraktilität. Insulin übernimmt im Kardiomyozyten eine zentrale Rolle in der Regulation des Metabolismus und beeinflusst weitere zelluläre Prozesse, die für das Zellüberleben notwendig sind. Ob und auf welcher Ebene der PI3K/AKT-Signalweg in der Regulation der kardialen Kontraktilität eine Rolle spielt ist jedoch noch nicht ausreichend geklärt. Es gibt bereits Hinweise

auf eine Auswirkung von Insulin auf die kardiale Kraftentwicklung, indem Insulin den kontraktilitätssteigernden Effekt der β -adrenergen Stimulierung reduziert hat [44]. Dieses Erkenntnis, welche in Experimenten an isolierten Kardiomyozyten gewonnen wurde, deutete auf eine Interaktion der beiden Signalwege, also vom PI3K/AKT- und vom β -Adrenozeptor-Signalweg, hin.

Die vorliegende Arbeit beinhaltet 4 Hauptfragen, worauf die Untersuchungen aufgebaut sind:

1. Beeinflusst Insulin an isoliert perfundierten Herzen die kardiale Kontraktionskraft und wird dieser Effekt AKT-abhängig vermittelt?
2. Ist eine Beeinflussung der kardialen Kontraktilität durch Insulin AKT-isoformspezifisch?
3. Reduziert Insulin an isoliert perfundierten Herzen die positiv inotrope Wirkung einer β -adrenergen Stimulation?
4. Hat Insulin *in vivo* Effekte auf die kardiale Pumpfunktion?

Erstens haben wir an isoliert perfundierten Herzen untersucht, ob Insulin einen Effekt auf die kardiale Pumpfunktion hat, und ob dieser Insulineffekt von kardiomyozytären AKT-abhängig ist. Um diese Fragestellung zu beantworten, wurden sowohl an Wildtyp Mäusen, als auch an Mäusen mit einem gestörten kardialen Insulin-Signalweg aufgrund eines induzierbaren Kardiomyozyten-spezifischen AKT-*Knockouts* der beiden Isoformen (AKT1 und AKT2) Experimente durchgeführt. Es wurde die kardiale Kontraktilität vor und nach Insulingabe der beiden Gruppen verglichen.

Um die zweite Frage zu beantworten, haben wir an induzierbaren Kardiomyozyten-spezifischen AKT-Einzel*knockout*, also AKT1- oder AKT2-*Knockout* Herzen, die funktionelle Bedeutung der beiden Isoformen bei der Regulation der Herzfunktion im isoliert perfundierten Herzen überprüft.

Zur Klärung der dritten Frage haben wir an isoliert perfundierten Herzen von Wildtyp Mäusen die Auswirkung von Insulin auf die kardiale Pumpfunktion weiter analysiert. Insbesondere hat uns interessiert, ob sich die durch Isoproterenol verursachte gesteigerte kardiale Kontraktilität der isoliert perfundierten Herzen durch eine Vorbehandlung mit Insulin verändert.

Mit der vierten Frage wollten wir den Effekt von Insulin auf die Herzfunktion von Wildtyp und AKT1/2-KO Mäusen unter *in vivo* Bedingungen mittels Echokardiographie untersuchen, und somit die Übertragbarkeit der Ergebnisse vom isoliert perfundierten Herzen auf den Organismus prüfen.

Übergreifend zu den einzelnen Fragestellungen wurden erste Hinweise gesucht, die auf potenziell beteiligte Signalwege schließen lassen. Es konnten bereits veränderte Phosphorylierungsmuster in Proteinen gefunden werden, die einen Zusammenhang von AKT und der Kopplung von Erregung und Kontraktion unterstützen [46]. Zum Verständnis der möglicherweise veränderten zellulären Abläufe, wurden Western Blot Analysen von Proteinen durchgeführt, die entweder im PI3K/AKT-Signalweg oder generell in der Regulation der kardialen Kontraktilität eine Rolle spielen.

2 Material und Methoden

2.1 Das transgene Mausmodell

In dieser Arbeit wurden männliche und weibliche C57Bl/6J Mäuse oder transgene männliche und weibliche Mäuse mit induzierbarem Kardiomyozyten-spezifischem AKT1-*Knockout* (AKT1-KO), AKT2-*Knockout* (AKT2-KO), AKT1/2-*Knockout* (AKT1/2-KO) verwendet, wobei wildtypische Geschwistertiere vom gleichen Geschlecht als Kontrolltiere für die KO-Mäuse eingesetzt wurden (Aktenzeichen: 84-02.04.2014.A308; Organentnahme: O16/04). Alle Mäuse wurden in den Tierställen der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gehalten. Die Mäuse hatten Zugang zu Futter und Wasser *ad libitum*. Die *Knockout*-Mauslinien wurden im Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf hergestellt [47]. Für die Generierung des *Knockouts* wurde das Cre/loxP System benutzt, bei dem das Cre Rekombinase-Enzym (Cre, von englisch *causes recombination*) an zwei loxP Seiten (*locus of crossing over*) schneidet und somit eine DNA-Sequenz zwischen den loxP Seiten entfernen kann [48, 49]. Das Cre-Enzym wurde mit einem herzspezifischen Promotor, α MHC (*Myosin Heavy Chain*) kombiniert, um einen gewebespezifischen *Knockout* zu generieren [50]. Für die zeitliche Kontrolle wurde das Cre zusätzlich mit zwei mutierten Hormon-Bindungs-Domänen des Östrogenrezeptors (Mer) fusioniert (MerCreMer) [51, 52], wodurch der Rezeptor durch 4-Hydroxytamoxifen (4-OH-Txf), ein Östrogenrezeptormodulator, aktiviert werden kann, allerdings nicht durch endogenes Östrogen [51]. Dadurch wurde das Cre erst durch die intraperitoneale Applikation von 500 μ g 4-OH-Txf, täglich an 5 aufeinander folgenden Tagen, aktiviert und somit die gewünschte DNA-Sequenz zwischen zwei loxP Seiten entfernt. Dies erfolgte bei den Mäusen im Alter von ca. 3 Monaten. Somit standen an Tag 7 nach der ersten 4-OH-Txf-Applikation adulte Mäuse mit Kardiomyozyten-spezifischem *Knockout* bestimmter AKT-Isoformen für Experimente zur Verfügung. Um dabei den Einfluss möglicher Kompensationsmechanismen zu minimieren wurde ein früher Zeitpunkt, Tag 7 nach Induktion des *Knockouts*, für die Durchführung der Versuche gewählt.

2.2 Das isoliert perfundierte Herz

2.2.1 Das Langendorff-Modell

Um die Herzfunktion zu untersuchen haben wir das Langendorff-Modell gewählt. Das experimentelle Modell wurde von Oscar Langendorff 1895 etabliert und spielt seitdem eine wichtige Rolle in der Untersuchung der Physiologie des Herzes. Im Langendorff-Modell war es möglich, verschiedene Substanzen zu verabreichen und gleichzeitig deren Auswirkungen auf die Herzfunktion, sowie auf die intrazelluläre Signalübertragung zu beobachten [53].

2.2.2 Versuchsablauf

Vier Stunden vor den jeweiligen Experimenten wurde den Versuchstieren der Zugang zu Nahrung verwehrt; die Tiere hatten weiterhin Zugang zu Wasser. Das Körpergewicht der Tiere wurde vor dem Versuch ermittelt.

Die Versuchstiere wurden durch zervikale Dislokation getötet und die Herzen entnommen. Unmittelbar nach der Entnahme des Herzens wurde die Aorta kanüliert und das Herz in die Langendorff-Apparatur gehängt (Abb. 3A) und retrograd perfundiert. Die Perfusion des Herzens erfolgte mit steril-filtriertem und mit Carbogen begastem Krebs-Henseleit-Puffer (KHP), welcher auf 37 °C temperiert war. Der KHP wurde aus folgenden Bestandteilen zusammengesetzt: 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,2 mM KH_2PO_4 , 25 mM NaHCO_3 , 0,5 mM EDTA, 8,32 mM Glucose $\cdot \text{H}_2\text{O}$, 1 mM Lactat, 0,1 mM Pyruvat, 2,25 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Der Perfusionsdruck wurde bei 80 mmHg konstant gehalten. Die isolierten Herzen wurden mit einer Herzfrequenz von 550 Schlägen pro Minute stimuliert. Um die kardiale Funktion zu beurteilen, wurde der linksventrikuläre Druck mit Hilfe eines selbst hergestellten Ballonkatheters (Abb. 3B) bestimmt, welcher über die Mitralklappe in den linken Ventrikel zugeführt wurde. Der Ballonkatheter wurde mit einer Feindosierspritze mit Wasser gefüllt, bis ein diastolischer Druck von 5 mmHg erreicht wurde. Die Spritzen mit den verwendeten Substanzen wurden luftblasenfrei in den Polyethylenschlauch oberhalb der Kanüle gestochen.

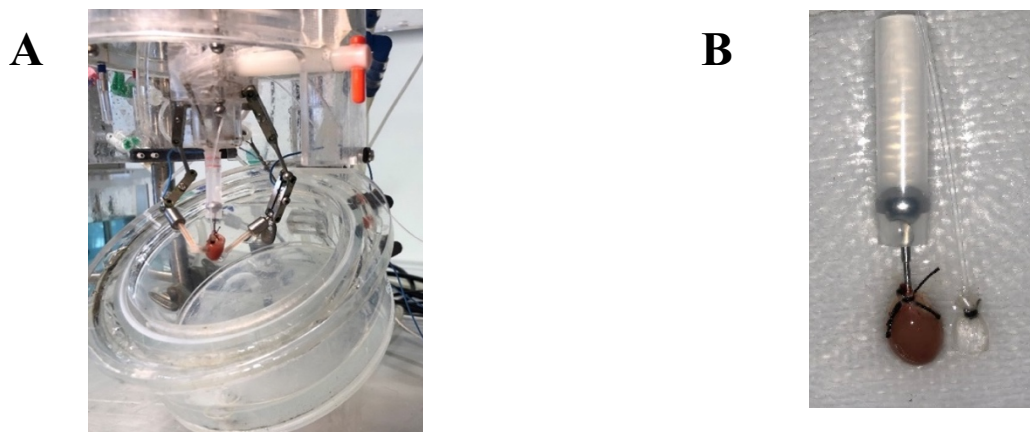


Abb. 3: Das isoliert perfundierte Herz. (A) Isoliert perfundiertes Herz in der Langendorff-Anlage mit Ballonkatheter und Elektroden. (B) Nahaufnahme des kanülierten Herzens und des Ballonkatheters.

Nach einer Stabilisierungsphase von 20 Minuten wurden die verschiedenen Substanzen (Insulin und Isoproterenol) mit Hilfe eines Infusionspumpensystems appliziert und flussadaptiert verabreicht. Aufgezeichnet und analysiert wurden folgende Parameter: Herzfrequenz, Koronarfluss, linksventrikulärer Druck und die maximale und minimale Druckanstiegsgeschwindigkeit ($\text{dP}/\text{dt}_{\text{max}}$ und $\text{dP}/\text{dt}_{\text{min}}$). Die gemessenen Parameter am Ende der Stabilisierungsphase wurden mit den Parametern am Ende der jeweiligen Applikationsphase verglichen. Am Ende des Versuches wurde

das Herz aus der Apparatur entfernt, die Ventrikel halbiert, gewogen und schließlich bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Um die erste Frage dieser Arbeit beantworten zu können, haben wir den Effekt von Insulin auf die kardiale Pumpfunktion an isoliert perfundierten Herzen von transgenen Mäusen mit kardiomyozytärem AKT1/2-KO sowie deren wildtypischen Geschwistertieren (WT) untersucht (Abb. 4). Hierbei wurde nach der 20-minütigen Stabilisierungsphase Insulin über einen Zeitraum von 10 Minuten in einer Endkonzentration von 6 nM verabreicht. Die aufgezeichneten Parameter wurden zu zwei Zeitpunkten ermittelt und miteinander verglichen: zum basalen Messpunkt unmittelbar vor Insulingabe (BL), sowie am Ende der Insulingabe (INS).

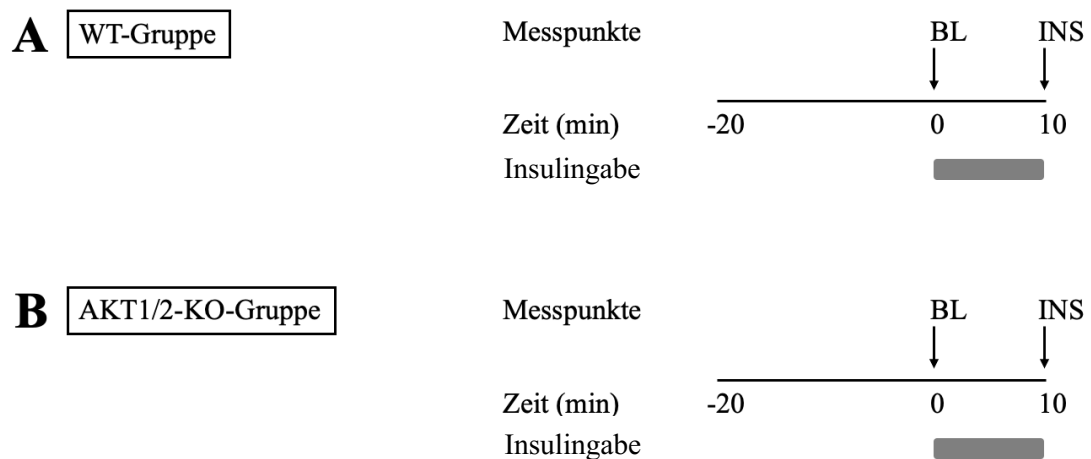


Abb. 4: Versuchsablauf: Isoliert perfundierte Herzversuche mit Insulinbehandlung.

Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus des isoliert perfundierten Herz-Experimentes, basaler Messpunkt (BL) und nach Insulingabe (INS). Versuchsablauf der Wildtyp-Gruppe (A, WT-Gruppe) und der AKT1/2-KO-Gruppe (B).

Um die zweite Frage zu beantworten, ob die Beeinflussung der kardialen Kontraktilität AKT-isoformspezifisch ist, haben wir die Herzfunktion von isoliert perfundierten Herzen von WT Mäusen (Abb. 5A) und von kardiomyozytären AKT1-KO (Abb. 5B) und AKT2-KO Mäusen (Abb. 5C) untersucht. Hierbei wurde ebenfalls nach einer 20-minütigen Stabilisierungsphase 10 Minuten lang Insulin verabreicht und die oben genannten Parameter basal (BL) und am Ende der Insulingabe (INS) bestimmt und miteinander verglichen.

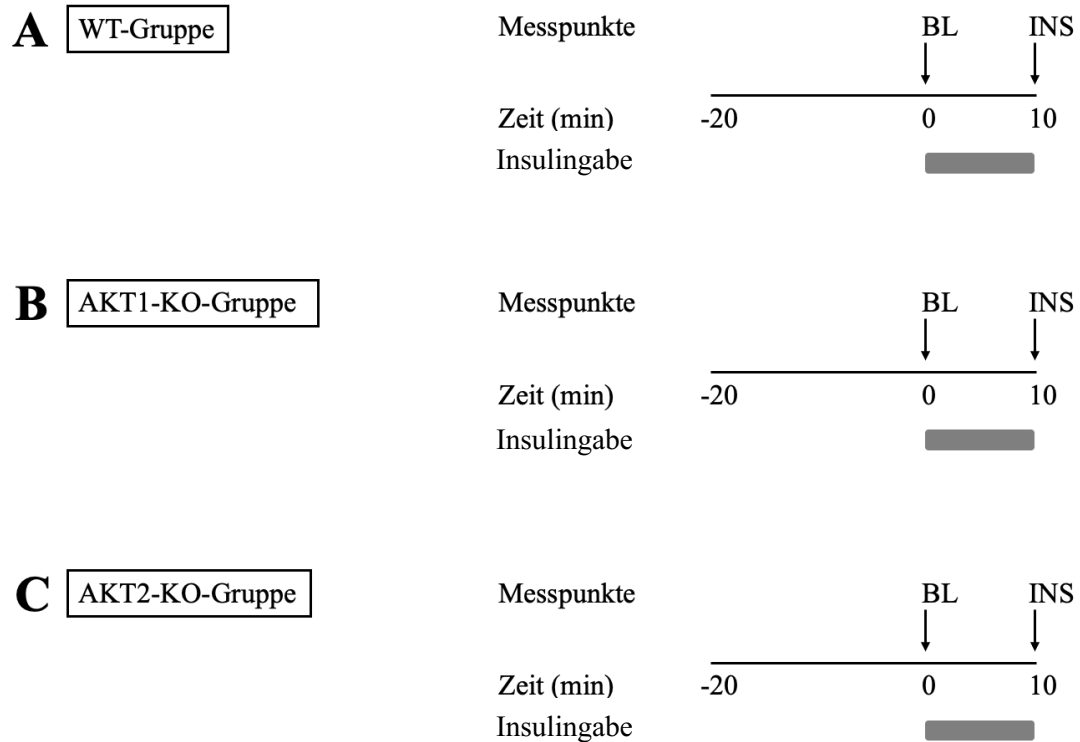


Abb. 5: Versuchsablauf: Isoliert perfundierte Herzversuche mit Insulinbehandlung an den AKT-isoformspezifischen *Knockout* Herzen. Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus des isoliert perfundierten Herz-Experimentes, basaler Messpunkt (BL) und nach Insulingabe (INS). Versuchsablauf der Wildtyp-Gruppe (A, WT-Gruppe), der AKT1-KO-Gruppe (B) und der AKT2-KO-Gruppe (C).

Für die Beantwortung der dritten Frage, ob Insulin die positiv inotrope Wirkung einer β -adrenergen Stimulation reduziert, wurden isoliert perfundierte Herzen von Wildtyp Mäusen entweder mit Isoproterenol allein (Abb. 6A) oder mit Isoproterenol in Kombination mit Insulin (Abb. 6B) behandelt. Isoproterenol wurde in beiden Versuchsgruppen in einer Endkonzentration von 1 nM für 5 Minuten appliziert. In der Insulin + Isoproterenol Gruppe wurde zusätzlich Insulin in einer Endkonzentration von 6 nM für 15 Minuten appliziert, wobei die Applikation 10 Minuten vor Beginn der Isoproterenolgabe begonnen wurde. Die oben genannten gemessenen Parameter wurden zu drei Zeitpunkten bestimmt und miteinander verglichen: basaler Messwert (baseline), nach 10 Minuten (10 min - Insulin) und nach 15 Minuten (15 min - Isoproterenol).

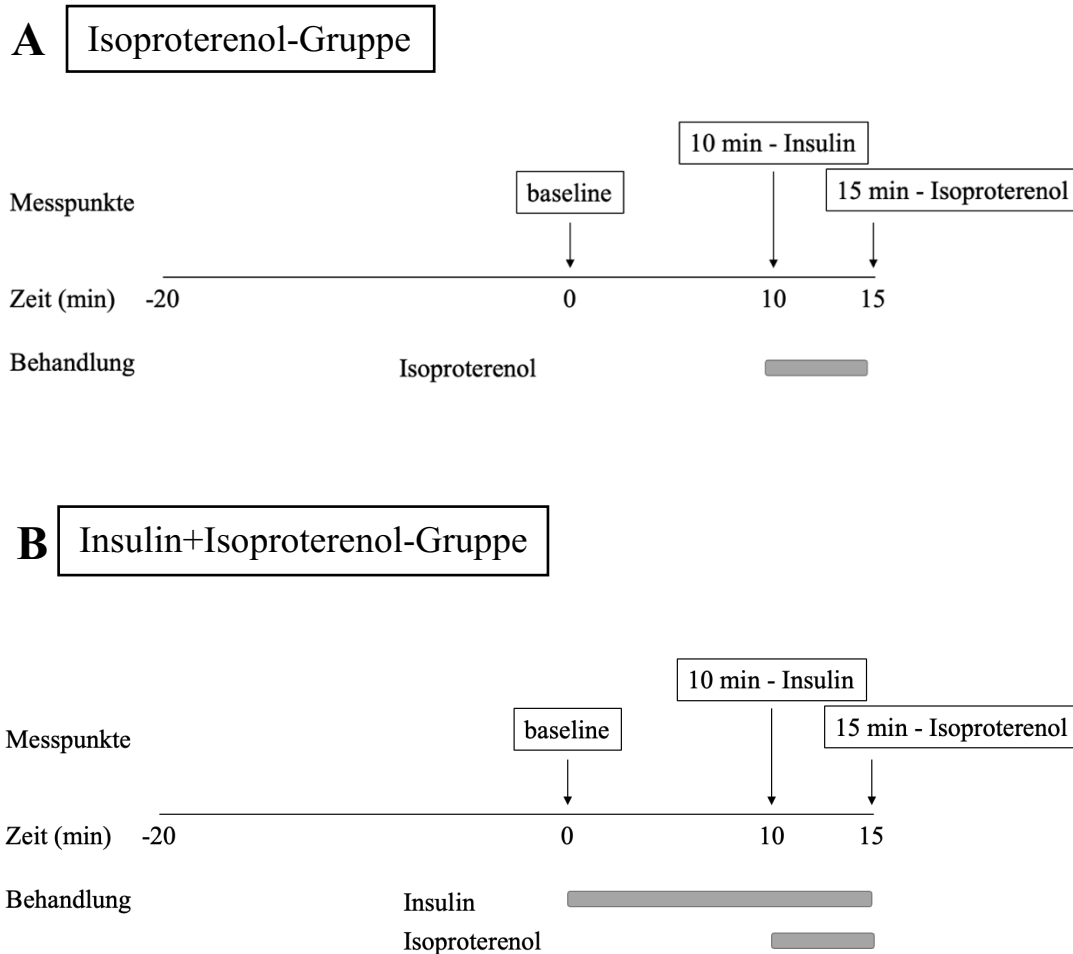


Abb. 6: Versuchsablauf: Isoliert perfundierte Wildtyp-Herzversuche mit Insulin und Isoproterenol. Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus des isoliert perfundierten Herz-Experimentes, basaler Messpunkt (baseline). Die Versuche wurden an Wildtyp-Herzen durchgeführt und es wurde entweder Insulin (A) oder Insulin und Isoproterenol (B) verabreicht.

2.3 Untersuchung der *in vivo* Herzfunktion

2.3.1 Konventionelle Echokardiographie

Zur nicht-invasiven Untersuchung der *in vivo* Herzfunktion wurde die Echokardiographie gewählt. Die Analyse der linksventrikulären Funktion erfolgte mit dem Vevo2100 System (Visualsonics). Für die Untersuchung war bei der Maus eine Narkose nötig, die in einer geschlossenen Kammer mit 3,5 % Isofluran eingeleitet wurde. Die anschließende Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte mit 2 % Isofluran. Die Maus wurde dafür auf einem speziellen Multifunktionstisch in Rückenlage positioniert. Um die Körpertemperatur aufrecht zu erhalten, wurde während der Untersuchung die Maus bei 37 °C temperiert, bei Bedarf wurde zusätzlich eine Rotlichtlampe benutzt. Außerdem wurde ein Elektrokardiogramm abgeleitet, und die Herz-, sowie Atemfrequenz überwacht.

Der Brustkorb der Maus wurde enthaart und vorgewärmtes Ultraschallgel aufgetragen. In einer speziellen Halterung auf Schienen befand sich der Schallkopf, somit waren minimale Bewegungen möglich, um präzise Einstellungen der Aufnahmen zu generieren.

Die Aufnahmezeit betrug mindestens 200 Bilder pro Sekunde. Es wurden zu Beginn des Versuches zur Ermittlung der basalen Herzfunktion *Brightness* (B)-Mode Aufnahmen der parasternalen kurzen Achse (SAX) auf midventrikulärer Höhe angefertigt. Im Anschluss wurde 0,1 µg/g Körpergewicht Insulin intraperitoneal appliziert. Nach 10 min erfolgten erneute Aufnahmen in identischen Einstellungen. Die Aufzeichnungen dienten zur Ermittlung des enddiastolischen Volumens (EDV), des endsystolischen Volumens (ESV), der Ejektionsfraktion (EF), sowie der Herzfrequenz (HF). Nach der Echokardiographie wurde das Herz entnommen, halbiert, in eiskaltem PBS gespült und für weitere Analysen bei -80 °C gelagert.

2.3.2 Strain Analyse

Die (B)-Mode Aufnahmen der konventionellen Echokardiographie wurden des Weiteren mithilfe der Auswertesoftware VevoStrain (FUJIFILM VisualSonics) analysiert. Diese Methode diente zu einer genaueren Untersuchung der linksventrikulären Funktion [54]. Anhand der Verfolgung bestimmter Muster in den echokardiographischen Aufnahmen (*speckles*, Abb. 7B) entlang des Endokards und Epikards konnte die Verformung (Strain) des Arbeitsmyokards während eines Herzzyklus analysiert werden. Strain ist eine dimensionslose Einheit und wird durch die fraktionelle Längenveränderung eines myokardialen Segmentes gekennzeichnet [55].

Die Berechnung des sogenannten Langrangian Strains ($S_L(t)$) erfolgte automatisch im Analyse-Programm anhand der folgenden Formel:

$$S_L(t) = \frac{L(t) - L_0}{L_0}$$

$L(t)$: Länge zu einem bestimmten Zeitpunkt

L_0 : Referenzlänge, meistens die Länge am Ende der Diastole

Dabei wurde der linke Ventrikel automatisch in 6 Segmente aufgeteilt (Abb. 7A) und deren regionale Funktion, aber auch die globale Funktion der 6 Segmente zusammen bestimmt.

Die Verformung findet in der SAX-Sicht in zwei Richtungen statt: radial und zirkumferentiell. Während der Systole verdickt sich die Wand, gleichzeitig verkürzt sich der Umfang des Ventrikels (Abb. 7C). Daraus lässt sich ableiten, dass der radiale Strain zunimmt (positiver Wert), der Wert des zirkumferentiellen Strains jedoch abnimmt (negativer Wert). In der Diastole geschieht dies in die umgekehrte Richtung. Die durchgeführten echokardiographischen Untersuchungen in der kurzen Achse erlaubten uns die Berechnungen der radialen und zirkumferentiellen Maximalwerte, welche basal (BL) und 10 Minuten nach Insulingabe (INS) ermittelt wurden.

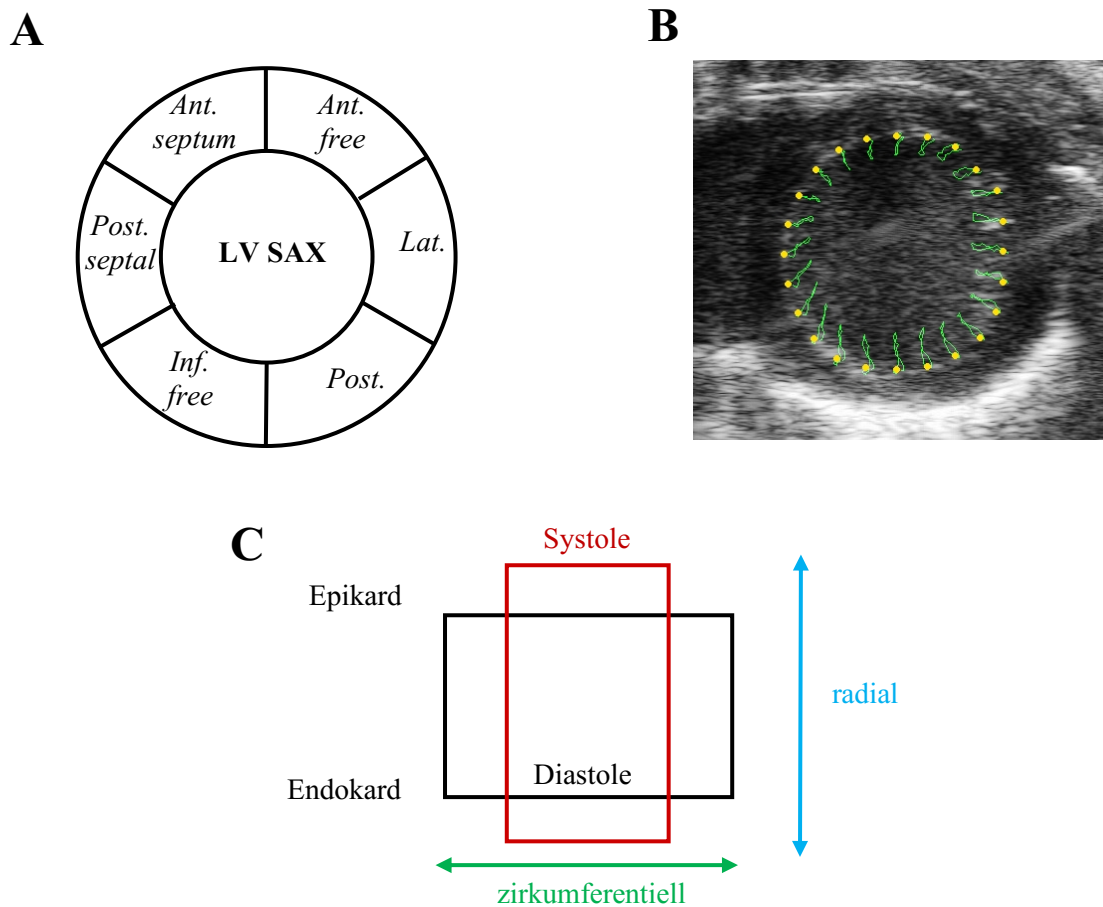


Abb. 7: Strain Analyse. (A) Schematische Darstellung der Segmente des linken Ventrikels in der kurzen Achse (SAX). Ant.: *anterior*, Post.: *posterior*, Inf.: *inferior*, Lat.: *lateral*. (B) Beispielbild der Strain Analyse, die gelben Punkte repräsentieren die verfolgten *speckles* und die grünen Linien stehen für ihre zurückgelegten Strecken. (C) Skizze der Formveränderung eines Beispielsegmentes während eines Herzzyklus. Im Rahmen der Systole kommt es zu einer Verkürzung der Muskelfasern in zirkumferentielle Richtung, somit nimmt der Innendurchmesser des Ventrikels ab. Gleichzeitig führt die Kontraktion während der Systole in radialer Richtung zu einer Verdickung der Wand.

2.4 Proteinanalyse

2.4.1 Antikörper für Western Blot Analyse

Antikörper	Hersteller	Produktnummer	Verdünnung
AKT	Cell Signaling	2920	1:2000
Phospho-AKT (Ser473)	Cell Signaling	9271	1:1000
AKT1	Cell Signaling	2967	1:1000
Phospho-AKT1 (Ser473)	Cell Signaling	9018	1:1000
AKT2	Cell Signaling	3063	1:1500
AKT2	Cell Signaling	5239	1:1000
Phospho-AKT2 (Ser474)	Cell Signaling	8599	1:1000
p44/42 MAPK	Cell Signaling	9107	1:2000
Phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204)	Cell Signaling	4370	1:1000
Insulinrezeptor	Cell Signaling	3020	1:1000
Phospho-Insulinrezeptor (Tyr1361)	Cell Signaling	3023	1:1000
GSK-3 β	BD Biosciences	610202	1:1000
Phospho- GSK-3 β (Ser9)	Cell Signaling	9336	1:1000
GAPDH	Cell Signaling	2118	1:1000
Troponin I	Cell Signaling	4002	1:1000
Phospho-Troponin I (Ser23/24)	Cell Signaling	4004	1:2000
PKC α	Abcam	32376	1:20.000
Phospho- PKC α (Thr497)	Abcam	76016	1:10.000
PKA α katalytische Untereinheit	Santa cruz	Sc-903	1:1250
Phospholamban	Badrilla	A010-14	1:5000
Phospho-Phospholamban (Ser16)	Badrilla	A010-12AP	1:5000
Phospho-Phospholamban (Thr17)	Badrilla	A010-13AP	1:5000

Tabelle 1: Verwendete primäre Antikörper für Western Blot Analysen. Die Antikörper wurden in 5 % BSA und TBS-T wie oben angegeben verdünnt.

Antikörper	Hersteller	Produktnummer	Verdünnung
IRDye 680RD Ziege Anti-Maus IgG	Odyssey	926-68070	1:10.000
IRDye 800CW Ziege Anti-Kaninchen IgG	Odyssey	926-32211	1:10.000

Tabelle 2: Verwendete sekundäre Antikörper für Western Blot Analysen. Die Antikörper wurden in Blocking-Lösung/TBS-T (1:1) wie oben angegeben verdünnt.

2.4.2 Gele für Western Blot Analyse

SDS-Acrylamidgele (für zwei kleine Gele):

- Sammelgel: 3,7 ml H₂O, 625 µl Rotiphorese Gel 40, 625 µl 1 M Tris (pH 6,8), 50 µl 10 % SDS, 10 µl TEMED, 15 µl 10 % APS
- Trenngel 7,5 %: 5,625 ml H₂O, 1,875 ml Rotiphorese Gel 40, 2,5 ml 1,5 M Tris (pH 8,8), 100 µl 10 % SDS, 20 µl TEMED, 25 µl 10% APS
- Trenngel 10 %: 5 ml H₂O, 2,5 ml Rotiphorese Gel 40, 2,5 ml 1,5 M Tris (pH 8,8), 100 µl 10 % SDS, 20 µl TEMED, 25 µl 10% APS
- Trenngel 12,5 %: 4,375 ml H₂O, 3,125 ml Rotiphorese Gel 40, 2,5 ml 1,5 M Tris (pH 8,8), 100 µl 10% SDS, 20 µl TEMED, 25 µl 10% APS
- Trenngel 15 %: 3,75 ml H₂O, 3,75 ml Rotiphorese Gel 40, 2,5 ml 1,5 M Tris (pH 8,8), 100 µl 10% SDS, 20 µl TEMED, 25 µl 10% APS

2.4.3 Aufarbeitung des Herzgewebes

Die eingefrorenen Herzen aus den oben beschriebenen Experimenten wurden mit Lysispuffer und Protease- und Phosphataseinhibitoren versetzt und mithilfe eines Gewebszerkleinerers für 30 Sekunden aufgearbeitet. Nach dem Zentrifugieren bei 16.000 g und 4 °C für 10 min wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml Gefäß überführt.

2.4.4 Proteinmengenbestimmung

Für die Proteinmengenbestimmung mittels *BCA-Assay* (*BCA Protein Assay Kit*; Thermo Scientific) wurde eine 96 well Platte mit flachem Boden benutzt. Zur Eichung wurde in die oberste Reihe eine Verdünnungsreihe mit BSA gefüllt und die Platte bei 570 nm im Plattenreader abgelesen. Danach wurden die Proben mit Lämmli-Puffer versetzt und bei 95 °C für 5 min denaturiert. Die Proben, die für die Analyse von Phospholamban benutzt wurden, wurden auf 40 °C für ebenfalls 5 min erwärmt.

2.4.5 Gelelektrophorese und Transfer

Die Auftrennung der Proteine nach Molekulargewicht erfolgte durch eine *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE). Zur Größenbestimmung wurde ein Standardmarker verwendet (5 µl *Prestained Protein Ladder*, #26616, Thermo Scientific). Nach der Auftrennung wurden die Proteine auf eine *Blotting*-Membran (Nitrozellulose- oder PVDF-Membran) transferiert. Um unspezifische Bindungen der primären Antikörper zu verhindern, wurde die Membran anschließend für mindestens eine Stunde in Blocking-Lösung bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert.

2.4.6 Detektion von Proteinen mittels Immunfluoreszenz

Um erste Hinweise zu untersuchen, welche Signalwege möglicherweise beteiligt waren, haben wir Western Blot Analysen von Proteinen durchgeführt, die entweder im PI3K/AKT-Signalweg eine Rolle spielen, oder generell für die Beeinflussung der Kontraktilität verantwortlich sind.

Die Membran wurde mit den ausgewählten primären Antikörpern (Tabelle 1) schwenkend über Nacht inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran 3-mal für je 10 min mit TBS-*Tween* gewaschen und für 55 min mit dem sekundären Antikörper (Tabelle 2) bei Raumtemperatur in Dunkelheit schwenkend inkubiert. Danach folgten 2-mal 10 min Waschen mit TBS-*Tween* und um das Tween zu entfernen, ein letzter Waschschrift mit TBS. Im Anschluss erfolgte die Visualisierung im Odyssey-Scanner. Die Analyse der Signalstärken wurde mit Image Studio Lite 5.2 durchgeführt.

2.4.7 Visualisierung der Gesamtproteinmenge

Die Gesamtproteinmenge wurde mittels *Revert 700 Total Protein Stain Kit* (926-11014; Licor) bestimmt und zur Normierung benutzt. Hierzu wurde die Membran für 4 min mit dem Färbemittel in Dunkelheit bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert und kurz in TBS gewaschen. Im Anschluss an die Visualisierung erfolgte die Entfärbung mit der Entfärbelösung für 3 min.

2.5 Computerprogramme

- | | |
|---------------------|-------------------------|
| • GraphPad PRISM | Graphpad Software, Inc. |
| • Image Studio Lite | Licor |
| • LabChart 7 | ADInstruments |
| • Microsoft Office | Microsoft |
| • SigmaPlot 13.0 | Systat Software Inc. |
| • Vevo | VisualSonics |

2.6 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm Sigmaplot. Die Ergebnisse sind zusammenfassend als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung dargestellt. Die zur Ermittlung der Signifikanz benutzten statistischen Tests sind jeweils bei den Ergebnissen angegeben. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant gesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von Insulin auf die kardiale Kontraktilität

3.1.1 Die Injektion von 4-OH-Tamoxifen führte zum kardiomyozytären *Knockout* beider Isoformen AKT1 und AKT2

Zur Überprüfung des kardiomyozytären *Knockouts* von AKT1 und AKT2 wurden Western Blot Analysen von Herzventrikel-Lysaten von AKT1/2-KO Mäusen und WT Mäusen angefertigt (Abb. 8A). Dabei wurden AKT1 und AKT2 visualisiert und die beiden Gruppen miteinander verglichen (Abb. 8B).

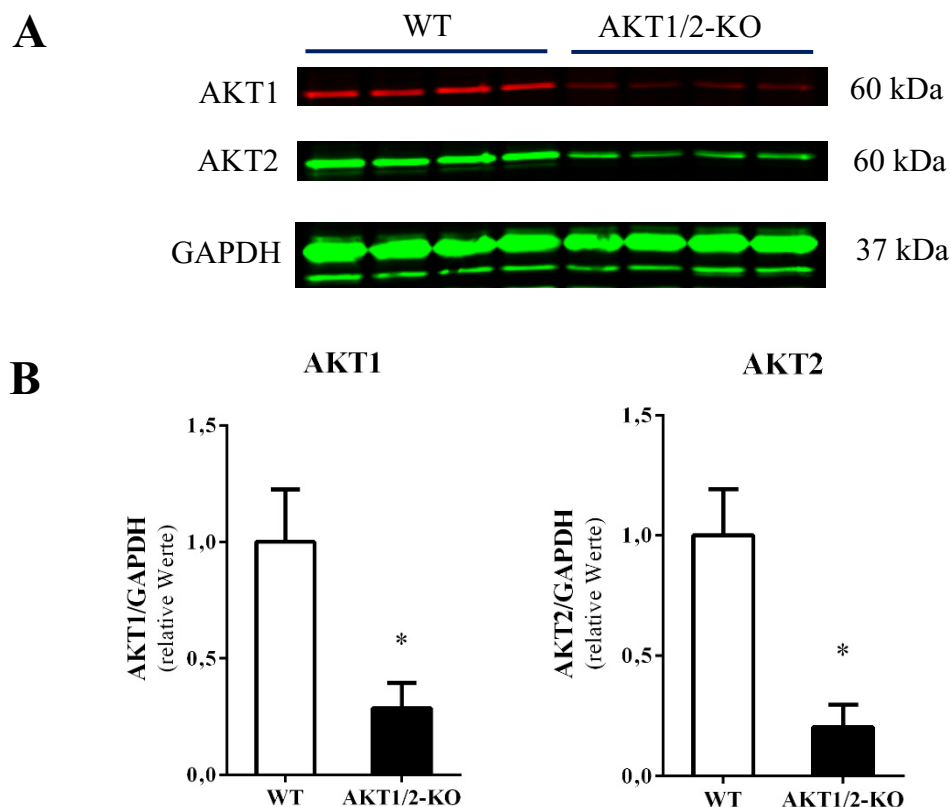


Abb. 8: Western Blot Analyse der *Knockout*-Effizienz von AKT1 und AKT2. Alle Mäuse erhielten 5 Tage lang 500 µg 4-OH-Tamoxifen täglich intraperitoneal. Die untersuchten Herzventrikel-Lysate stammten aus den isoliert perfundierten Herzversuchen und wurden 10 Minuten mit 6 nM Insulin (WT, AKT1/2-KO) behandelt. (A) Immunfluoreszenz-Aufnahmen von Western Blots. (B) Zusammenfassende normierte Darstellung der ermittelten Signalstärken. Die Signalstärken wurden zum Referenzprotein GAPDH normiert. Die Werte sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung, $n = 4$, ungepaarter t-Test, * $p < 0,05$ vs. WT.

Im Vergleich zu den WT Proben lässt sich in den AKT1/2-KO Herzen eine deutlich geringere Expression sowohl an AKT1 als auch an AKT2 erkennen (Abb. 8A). Bei der Berechnung der normierten Signalstärken besteht ein signifikanter Unterschied zwischen der WT und der AKT1/2-

KO Gruppe in Bezug auf AKT1 und AKT2 (Abb. 8B). Somit wurde die KO-Effizienz von AKT1 und AKT2 auf Proteinebene in den Herzventrikeln nachgewiesen.

3.1.2 Die Behandlung mit 6 nM Insulin führte zum Anstieg der Insulinrezeptor-Phosphorylierung

Da in dieser Arbeit unter anderem die Auswirkung von Insulin untersucht wurde, war es unerlässlich die Aktivierung des Insulin-Signalweges zu überprüfen. Dies erfolgte anhand der Phosphorylierung des Insulinrezeptors (IR) an Tyrosin 1361. Hierfür wurden mittels Western Blot Analysen Herzventrikel-Lysate von isoliert perfundierten WT und AKT1/2-KO Herzen nach Insulingabe mit WT Herzen ohne Insulin verglichen (Abb. 9A).

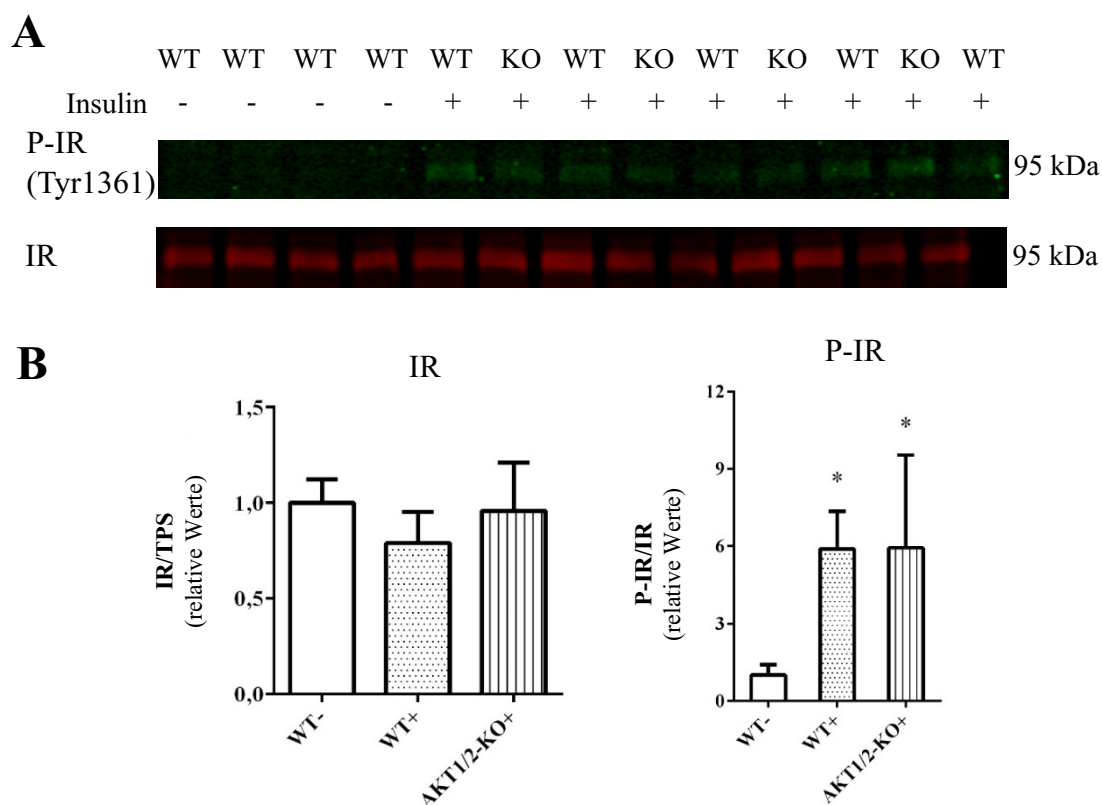


Abb. 9: Die Verabreichung von 6 nM Insulin führte zu einer gesteigerten Phosphorylierung des Insulinrezeptors. Die mittels Western Blot Analyse untersuchten Herzventrikel-Lysate stammten aus den isoliert perfundierten Herzversuchen und wurden 10 Minuten lang mit 6 nM Insulin (WT+, AKT1/2-KO+) behandelt oder erhielten Krebs-Henseleit-Puffer (WT-). (A) Immunfluoreszenz-Aufnahmen von Western Blots. (B) Zusammenfassende normierte Darstellung der ermittelten Signalstärken. Die Signalstärke des phosphorylierten Insulinrezeptors (P-IR) wurde mit der Signalstärke des Insulinrezeptors (IR) ins Verhältnis gesetzt. Der Insulinrezeptor wurde im Verhältnis zum *Total Protein Stain* (TPS) in den Proben dargestellt. Die Werte sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung. $n = 4-5$, one-way ANOVA mit Tukey post-hoc Test, * $p < 0,05$ vs. WT.

Mit Hilfe der Western Blot Analyse konnte der Insulinrezeptor und dessen phosphorylierte Form detektiert werden. Die Gesamtexpression des Insulinrezeptors in den Proben zeigte keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Verabreichung von 6 nM Insulin über 10 min führte zu einer ca. 6-fach höheren Phosphorylierung des Rezeptors in den mit Insulin behandelten Proben verglichen mit den Proben ohne Insulin (Abb. 9B). Dies diente als Nachweis des aktivierten Insulin-Signalweges in den isoliert perfundierten Herz-Experimenten.

3.1.3 Insulin verbesserte *in vitro* die kardiale Funktion der AKT1/2-KO Herzen, aber nicht der WT Herzen

Um der ersten Frage nachzugehen, ob Insulin allein und wenn ja, dann AKT-abhängig die kardiale Kontraktilität reguliert, haben wir an isoliert perfundierten Herzen von Wildtyp (WT) und kardiomyozytären AKT1/2-KO Mäusen Versuche durchgeführt.

Statistik mitgerechnet. Die Werte sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung, two-way repeated measures ANOVA mit Tukey post-hoc Test. $^{\#}p < 0,05$ vs. WT.

(C) Insulin führte zu einer Verbesserung der kontraktilen Parameter im Vergleich zu basalen Bedingungen in den AKT1/2-KO Herzen. Hier wurden die gemessenen Werte zu den basalen Werten (BL) der Wildtyp Gruppe ins Verhältnis gesetzt und als prozentuale Werte abgebildet. Die Werte sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung, two-way repeated measures ANOVA mit Tukey post-hoc Test, $^*p < 0,05$, $^{**}p < 0,01$, $^{****}p < 0,0001$, ns = nicht signifikant.

Anhand der in Abb. 10A gezeigten Druckverläufe lassen sich die Unterschiede im zeitlichen Verlauf der beiden Genotypen charakterisieren. Bereits zum Anfang der Versuche zeigte die AKT1/2-KO Gruppe eine eingeschränkte Herzfunktion, wobei die $dP/dt_{\min}$ und $dP/dt_{\max}$ Werte im Vergleich zum WT reduziert waren (Abb. 10B). Während der Insulingabe zeigten die Wildtyp Herzen lediglich eine leichtgradige Verbesserung des linksventrikulären Druckes, jedoch keine Veränderung der $dP/dt_{\min}$ und $dP/dt_{\max}$ Werte (Abb. 10C). Interessanterweise zeigte sich in der AKT1/2-KO Gruppe ein stimulierender Effekt von Insulin. Insulin führte zu einer Verbesserung der kontraktilen Parameter, sodass der initiale Unterschied mit den reduzierten kontraktilen Parametern im Vergleich zur WT Gruppe aufgehoben wurde. Der Vergleich der Parameter nach Insulingabe der beiden Gruppen zeigte keine Unterschiede mehr. Wird jedoch die Dynamik der Versuchsabläufe der zwei Genotypen verglichen, also die relativen Werte vor und nach Insulingabe, können wir einen deutlichen Unterschied erkennen. Die AKT1/2-KO Gruppe zeigte eine Verbesserung aller kontraktilen Parameter um ca. 30 %.

Die Kernaussagen dieser Versuche waren, dass basal bereits eine Einschränkung der Herzfunktion der AKT1/2-KO Herzen bestand. Außerdem zeigte sich eine Verbesserung nach Insulinbehandlung bei den AKT1/2-KO Herzen, beziehungsweise wurde die basal eingeschränkte Pumpfunktion durch die Insulingabe aufgehoben. Insulin hatte keine eindeutige Auswirkung auf die Herzfunktion der WT Gruppe.

3.2 *In vitro* Untersuchung der Funktion von Herzen von Mäusen mit AKT-isoformspezifischem *Knockout* hinsichtlich eines Insulineffekts

3.2.1 Die Injektion von 4-OH-Tamoxifen resultierte in einem kardiomyozytären *Knockout* von AKT1 oder AKT2

Der Nachweis des konditionalen kardiomyozytären AKT1-, bzw. AKT2-*Knockouts* erfolgte mit Hilfe von Western Blot Analysen. Hier wurden Herzventrikel-Lysate von AKT1-KO und AKT2-KO Mäusen auf das Vorhandensein von AKT1 und AKT2 untersucht und mit den WT Proben verglichen (Abb. 11A und B).

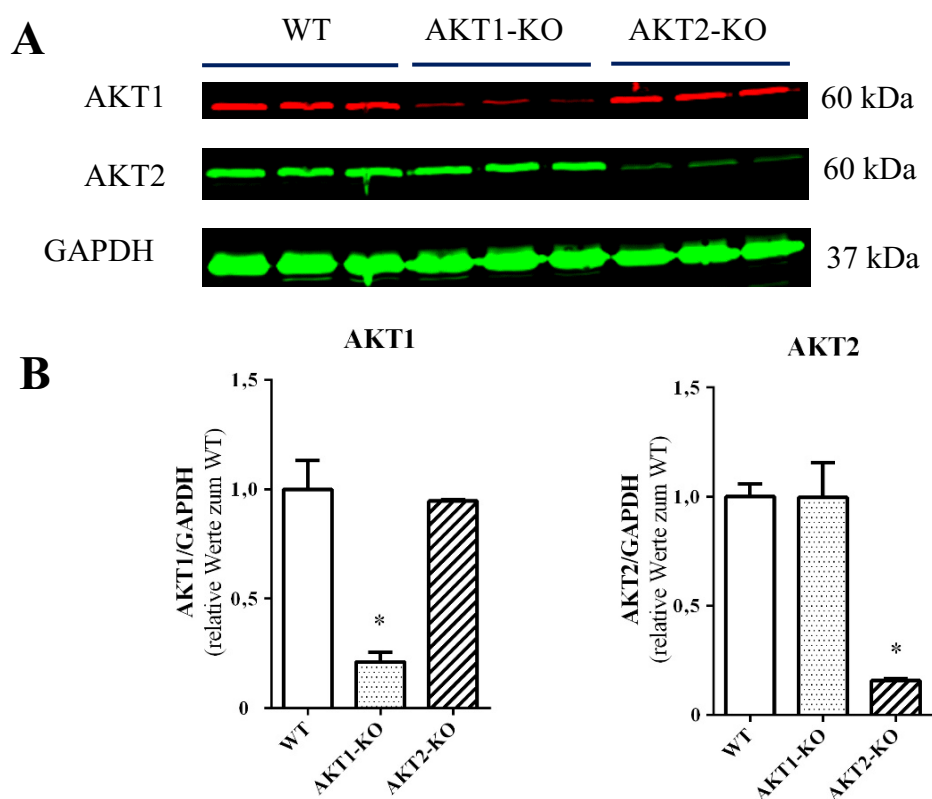


Abb. 11: Western Blot Analysen zur Untersuchung des kardiomyozytären *Knockouts* von AKT1 und AKT2. Alle Mäuse erhielten 5 Tage lang 500 µg 4-OH-Tamoxifen täglich intraperitoneal. Die untersuchten Herzventrikel-Lysate stammten aus den isoliert perfundierten Herzversuchen und wurden 10 Minuten mit 6 nM Insulin (WT, AKT1-KO, AKT2-KO) behandelt. (A) Immunfluoreszenz-Aufnahmen von Western Blots.

(B) Zusammenfassende normierte Darstellung der ermittelten Signalstärken. Die Signalstärken wurden zum Referenzprotein GAPDH normiert. Die Werte sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung. n= 3, one-way ANOVA mit Tukey post-hoc Test, *p < 0,05 vs. WT.

Wir konnten in den KO-Gruppen eine geringere Expression der depletierten AKT-Isoform im Vergleich zum WT zeigen (Abb. 11A), das heißt AKT1 war in den AKT1-KO Proben und AKT2 in

den AKT2-KO Proben im Vergleich zu WT vermindert exprimiert. Gleichzeitig konnten wir nachweisen, dass AKT1 in den AKT2-KO Proben und AKT2 in den AKT1-KO Proben unverändert exprimiert wurden, und keine Unterschiede zu den WT Proben aufwiesen. Die Western Blot Analysen zeigten den erfolgreichen isoformspezifischen AKT-*Knockout*.

3.2.2 Untersuchung der Insulinstimulierung der isoformspezifischen AKT-*Knockout* Herzen

Die Überprüfung der Aktivierung des PI3K-Signalweges in den isoliert perfundierten isoformspezifischen AKT-*Knockout* Herzen erfolgte durch die Untersuchung der Phosphorylierung der zwei AKT-Isoformen. Die Auswertung der mit Insulin behandelten AKT1-KO oder AKT2-KO Herzen erfolgte im Vergleich zum WT ohne Insulin (Abb. 12A). Der Anteil an phosphoryliertem AKT1 oder AKT2 bezog sich auf die Signalstärke der jeweiligen AKT-Isoform (Abb. 12B).

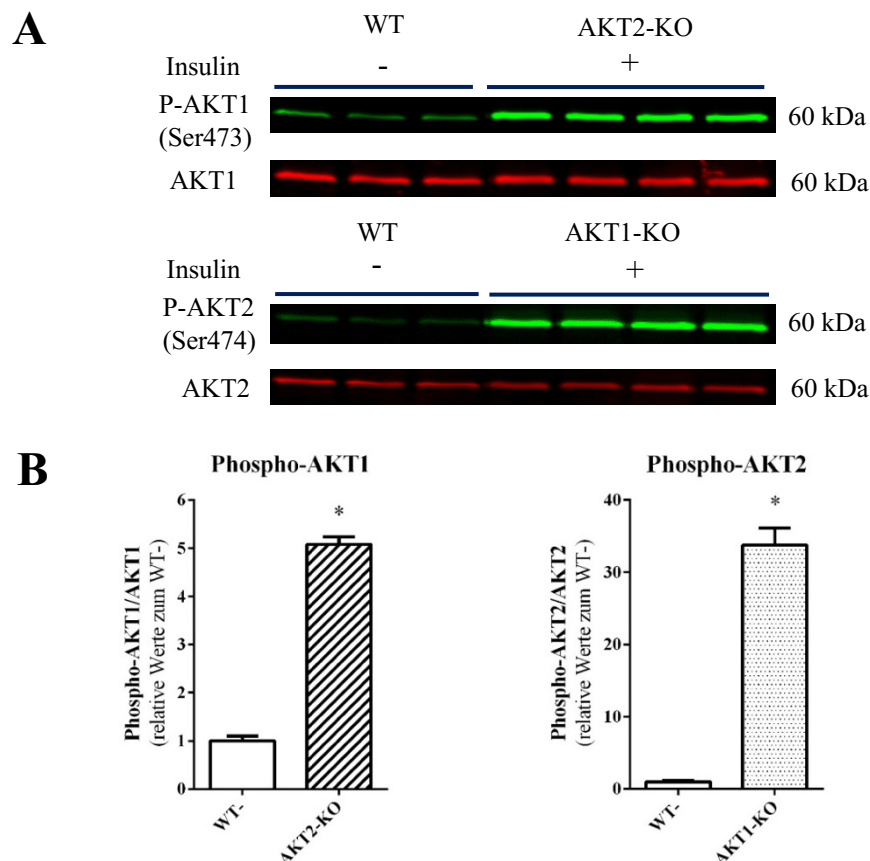


Abb. 12: Die Verabreichung von 6 nM Insulin führte zu einer deutlichen Phosphorylierung der intakten AKT-Isoform. Die Herzventrikel-Lysate stammten aus den isoliert perfundierten Herzversuchen und wurden über 10 Minuten entweder mit Puffer (WT-) oder mit 6 nM Insulin behandelt (AKT1-KO, AKT2-KO). (A) Immunfluoreszenz-Aufnahmen von Western Blots. (B) Zusammenfassende normierte Darstellung der ermittelten Signalstärken. Die Werte sind als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung dargestellt. $n=4-5$, ungepaarter t-test, $*p < 0,05$ vs. WT-.

Die Analyse zeigte ein signifikant stärkeres Signal der phosphorylierten AKT1 oder AKT2 der mit Insulin behandelten Proben im Vergleich zum Wildtyp ohne Insulinbehandlung (Abb. 12B). Die Insulingabe führte zu einer Phosphorylierung der noch vorhandenen AKT-Isoform in den isoformspezifischen AKT-*Knockout* Herzen. Somit konnten wir bei den isoformspezifischen AKT-*Knockout* Herzen die Aktivierung des PI3K-Signalweges durch Insulingabe nachweisen.

3.2.3 Insulin verbessert die Herzfunktion von isoformspezifischen AKT-KO Mäusen

Um die zweite Frage zu beantworten, ob die Beeinflussung der kardialen Kontraktilität durch Insulin AKT-isoformspezifisch erfolgt, haben wir an isoliert perfundierten Herzen von Mäusen mit kardiomyozytärem AKT1-KO oder kardiomyozytärem AKT2-KO, bzw. wildtypischen Geschwistertieren Versuche durchgeführt. Im Folgenden wurde der in 2.2.2 beschriebene Versuchsablauf an AKT1-KO und AKT2-KO Herzen angewendet.

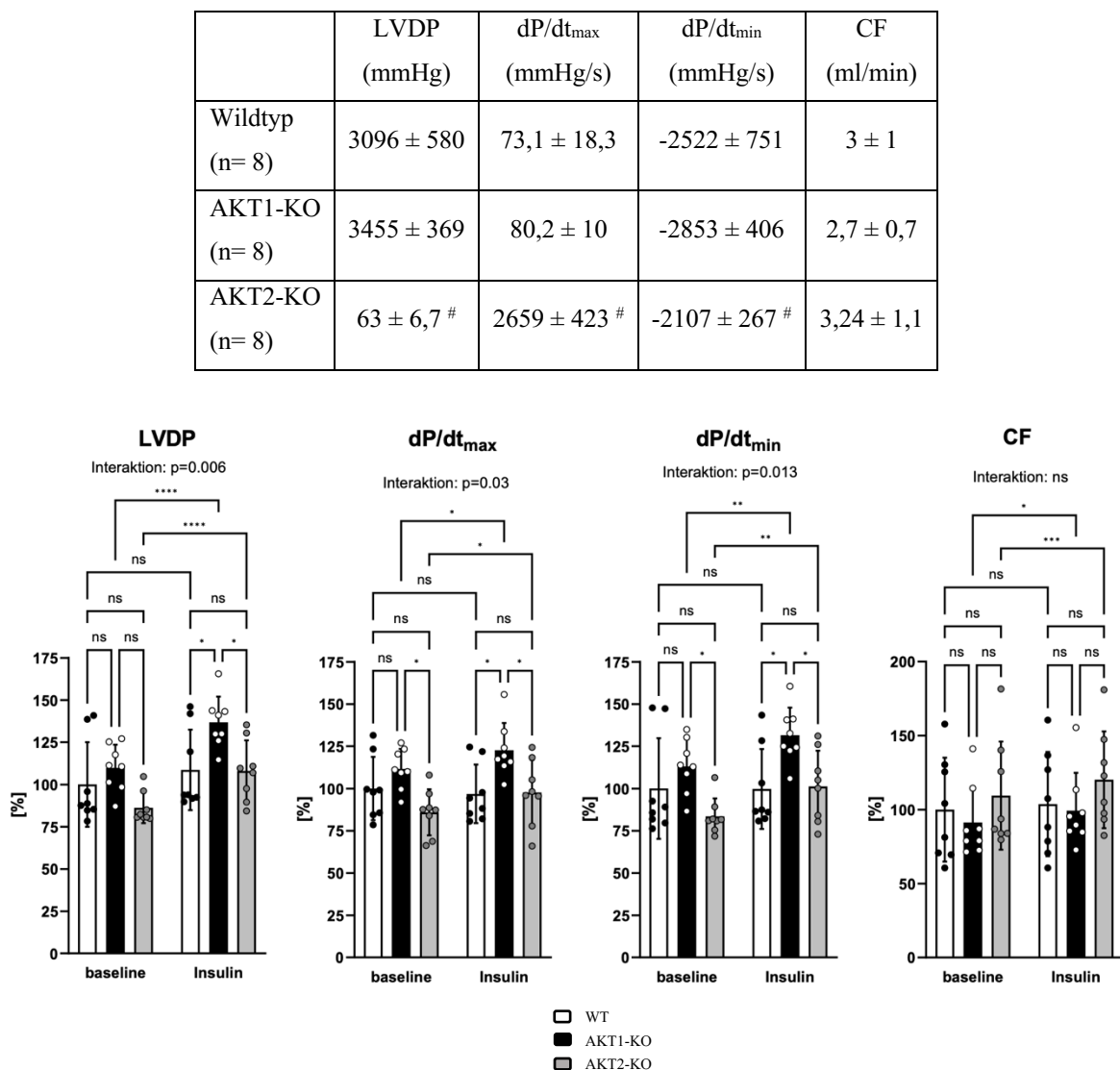
A

Abb. 13: Vergleich der Herzfunktion vor und nach Insulingabe von Wildtyp Herzen mit AKT1-KO und AKT2-KO Herzen im isoliert perfundierten Mausmodell. (A) Tabellarische Darstellung der Absolutwerte zu basalen Bedingungen. Die isoliert perfundierten Herzen wurden mit 6 nM Insulin für 10 min behandelt. Die drei Gruppen in der ersten Spalte stehen für die drei untersuchten Genotypen: Wildtyp (WT; n= 8), AKT1-KO (n= 8) und AKT2-KO (n= 8). Hier sind die Parameter Koronarfluss (CF), linksventrikulärer entwickelter Druck (LVDP), Minimum (dP/dt_{min}) und Maximum (dP/dt_{max}) der intraventrikulären Druckanstiegsgeschwindigkeit basal (BL) tabellarisch abgebildet. Die Parameter der drei Gruppen nach Insulingabe wurden zur besseren Übersicht hier nicht abgebildet, jedoch bei der Statistik mitgerechnet. Die Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung, two-way repeated measures ANOVA mit Tukey post-hoc Test. [#]p < 0,05 vs. AKT1-KO.

(B) Die prozentuale Zunahme der kontraktile Parameter nach Insulingabe war in der AKT2-KO Gruppe am höchsten. Hier wurden die gemessenen Werte zu den basalen Werten (BL) der Wildtyp Gruppe ins Verhältnis gesetzt und als prozentuale Werte abgebildet. Die Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung, two-way repeated measures ANOVA mit Tukey post-hoc Test. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001, ns = nicht signifikant.

Vor der Insulingabe war die Funktion der AKT1-KO Herzen vergleichbar mit den WT Herzen. Die AKT2-KO Herzen zeigten jedoch eine schlechtere linksventrikuläre Funktion im Vergleich zu den AKT1-KO Herzen (Abb. 13A).

Bei der Verabreichung von Insulin war eine Zunahme der Herzfunktion in beiden isoformspezifischen AKT-KO Gruppen zu beobachten, während die WT Gruppe keine deutliche Veränderung gezeigt hat.

Die beiden Gruppen mit isoformspezifischem AKT-KO zeigten nach Insulingabe einen um ca. 20 % höheren linksventrikulären entwickelten Druck (Abb. 13B). Die Veränderungen der dp/dt_{min} und dp/dt_{max} Werte waren bei beiden Gruppen mit isoformspezifischem AKT-KO ebenfalls um ca. 20 % signifikant höher im Vergleich zu den basal gemessenen Parameter der WT Gruppe.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das Fehlen von AKT2 eine negative Auswirkung auf die basale Herzfunktion hat, während das Fehlen von AKT1 die Herzfunktion nicht beeinträchtigt hat. Interessanterweise war eine Verbesserung der Kontraktilität in beiden isoformspezifischen AKT-KO Gruppen zu beobachten, wobei die WT Gruppe weiterhin unverändert blieb. Insgesamt ergab sich somit kein Hinweis auf einen AKT-isoformspezifischen Effekt einer Insulingabe auf die kardiale Funktion.

3.3 Untersuchung der Auswirkung von Insulin auf die Zunahme der Kontraktilität durch β -Adrenozeptor-Stimulierung

In den Versuchen an AKT1/2-KO Herzen haben wir einen durch Insulin vermittelten Effekt auf die kardiale Kontraktilität bei AKT-Verlust beobachtet. Zur weiteren Untersuchung einer möglichen Interaktion des Insulin- und des β -Adrenozeptor-Signalweges, wurden Experimente an isoliert perfundierten Herzen von Wildtyp Mäusen durchgeführt. Hierbei wurde die dritte Frage untersucht, ob Insulin die positiv inotrope Wirkung einer β_1 -adrenergen Stimulierung reduziert. Nach der 20-minütigen Stabilisierungsphase erhielten die Tiere der Insulin + Isoproterenol Gruppe zunächst 6 nM Insulin allein (10 min - Insulin), und im Anschluss in Kombination mit 1 nM Isoproterenol für 5 min (15 min - Isoproterenol). Die Tiere der Isoproterenol Gruppe erhielten 1 nM Isoproterenol ohne Insulingabe (siehe 2.2.2 und Abb. 6). Die gemessenen Werte wurden basal (baseline), nach 10 min (10 min - Insulin) und schließlich nach weiteren 5 min (15 min - Isoproterenol) verglichen.

A

	LVDP (mmHg)	dP/dt _{max} (mmHg/s)	dP/dt _{min} (mmHg/s)	CF (ml/min)
Isoproterenol (n= 4)	70,4 ± 12,2	3172 ± 523	-2333 ± 488	2,5 ± 0,5
Insulin + Isoproterenol (n= 5)	67 ± 8,3	2952 ± 464	-2190 ± 369	1,97 ± 0,1 [#]

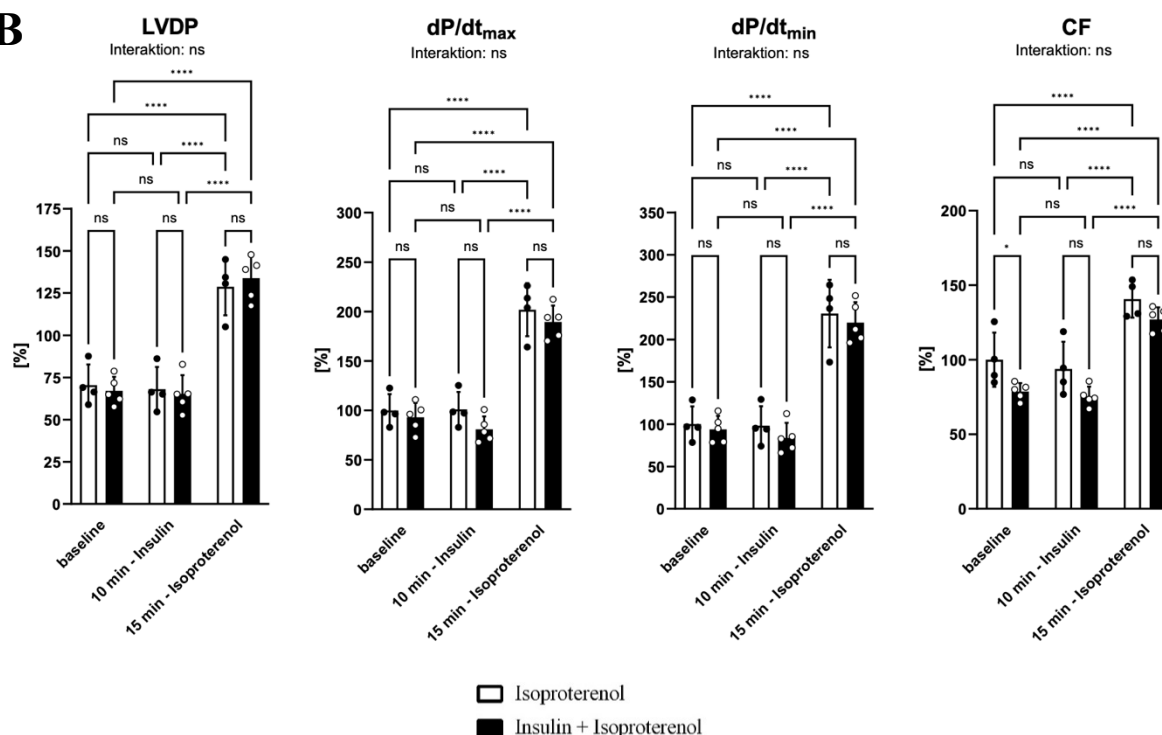
B

Abb. 14: Insulin hat den kontraktilitätssteigernden Effekt von Isoproterenol nicht beeinflusst.

(A) Tabellarische Darstellung der basal gemessenen Werte. Die isoliert perfundierten Herzen wurden entweder mit 1 nM Isoproterenol für 5 min (Isoproterenol; n=4) oder mit 6 nM Insulin für 10 min und zusätzlich 5 min lang zusätzlich mit 1 nM Isoproterenol (Insulin + Isoproterenol; n=5) behandelt. Hier wurden ausschließlich die basalen Messwerte (baseline) tabellarisch zusammengefasst: Koronarfluss (CF), linksventrikulärer entwickelter Druck (LVDP), Minimum (dP/dt_{min}) und Maximum (dP/dt_{max}) der intraventrikulären Druckanstiegsgeschwindigkeit. Die Parameter der beiden Gruppen nach 10 Minuten und nach 15 Minuten wurden zur besseren Übersicht hier nicht abgebildet, jedoch bei der Statistik mitgerechnet. Die Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung, two-way repeated measures ANOVA mit Tukey post-hoc Test. [#]p < 0,05 vs. Isoproterenol.

(B) Hier wurden die gemessenen Werte zu einem Zeitpunkt, entweder nach 10 Minuten oder nach 15 Minuten, zu den basalen Werten (baseline) ins Verhältnis gesetzt und als prozentuale Werte abgebildet. Die Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung, two-way repeated measures ANOVA mit Tukey post-hoc Test. *p < 0,05, ****p < 0,0001, ns = nicht signifikant.

Zu Beginn des Experimentes zeigte sich hinsichtlich der kontraktilen Parameter kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen, lediglich war der Koronarfluss in der Insulin + Isoproterenol Gruppe leichtgradig erniedrigt (Abb. 14A).

Die Applikation von 1 nM Isoproterenol führte zu einer Zunahme aller kontraktiler Parameter (Abb. 14B). Die Vorbehandlung mit 6 nM Insulin veränderte die Antwort auf die β_1 -adrenerge Stimulierung nicht.

Zusammenfassend ergibt sich aus diesen Ergebnissen kein Hinweis darauf, dass Insulin die positiv inotrope Wirkung einer β_1 -adrenergen Stimulierung beeinflusst. Isoproterenol führte in beiden Gruppen, unabhängig von der Insulingabe, zu einer gleich ausgeprägten Steigerung der gemessenen kontraktilen Parameter.

3.4 Insulin bewirkt einen durch AKT-Verlust vermittelten Effekt auf die *in vivo* kardiale Kontraktilität

3.4.1 Die intraperitoneal verabreichte Dosis von Insulin hat den Signalweg ebenfalls aktiviert

In den *in vivo* echokardiographischen Untersuchungen wurden 0,1 $\mu\text{g/g}$ Körpergewicht Insulin intraperitoneal verabreicht. Die Verwendung der Dosis ist bereits am Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf etabliert, sodass hier nur eine repräsentative Untersuchung erfolgt ist.

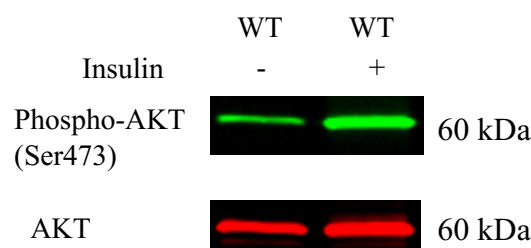


Abb. 15: Die intraperitoneale Applikation von Insulin erhöht die Phosphorylierung von AKT am Herzen. Western Blot Analyse von Herzventrikel-Lysaten ohne Insulin oder 10 Minuten nach intraperitonealer Insulingabe (0,1 $\mu\text{g/g}$ Körpergewicht).

Es konnte eine erhöhte Phosphorylierung von AKT nach Insulingabe gemessen werden, während die Signalstärke von AKT in den beiden Proben vergleichbar war (Abb. 15).

3.4.2 Die *in vivo* Echokardiographie zeigte eine Verbesserung der kardialen Kontraktilität der AKT1/2-KO, aber nicht der WT Herzen nach Insulingabe

Wir konnten bereits am isoliert perfundierten Herzen zeigen, dass Insulin bei einem kombinierten Verlust von AKT1 und AKT2 die Herzfunktion beeinflussen kann. Daraus ergab sich die vierte Frage, ob diese Beobachtungen auf ein *in vivo* Modell übertragen werden können. Hierfür haben wir echokardiographische Untersuchungen an Wildtyp und AKT1/2-KO Mäusen durchgeführt. Um die Auswirkung von Insulin zu untersuchen, wurden die Parameter vor (BL) und 10 Minuten nach (INS) Bolusgabe von Insulin ermittelt.

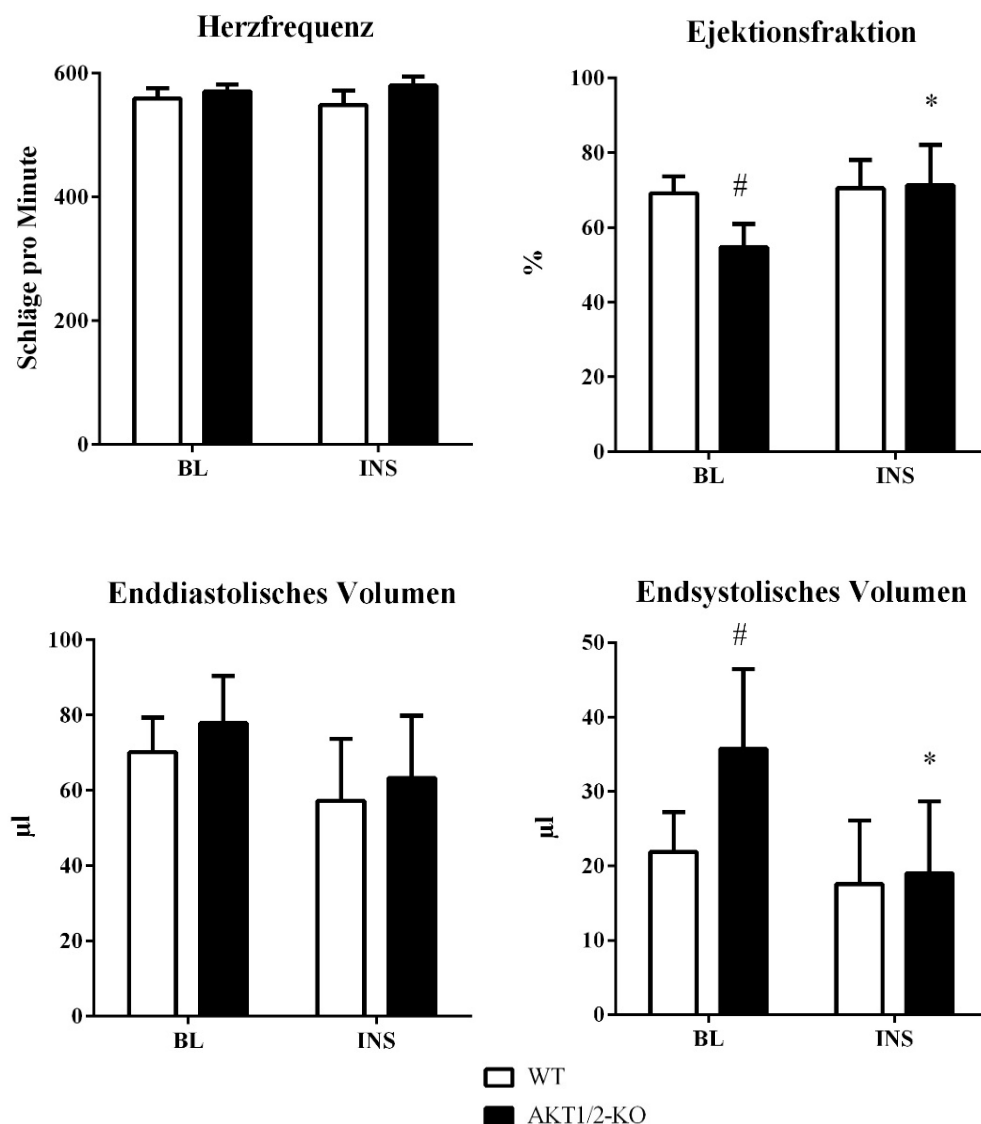


Abb. 16: Zusammenfassung der echokardiographisch gemessenen Parameter vor und 10 Minuten nach Insulingabe. Es wurde 0,1 μg/g Körpergewicht Insulin intraperitoneal appliziert. Die echokardiographischen Messungen erfolgten vor (BL) und 10 min nach Insulin (INS). Die zwei Gruppen stehen für die zwei untersuchten Genotypen: Wildtyp (WT; n= 5) und AKT1/2-KO (n= 4). Die Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung, two-way repeated measures ANOVA mit Tukey post-hoc Test. *p < 0,05 vs. BL der gleichen Gruppe; #p < 0,05 vs. WT zum gleichen Zeitpunkt.

Die Herzfrequenz der Versuchstiere zeigte keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen und blieb nach Insulingabe stabil. Interessanterweise war zu Beginn die Herzfunktion der AKT1/2-KO Gruppe schlechter, sie wies eine niedrigere EF und ein höheres ESV im Vergleich zur WT Gruppe auf. 10 Minuten nach der Verabreichung von Insulin blieb die Herzfunktion von WT Mäusen stabil, während in der AKT1/2-KO Gruppe die EF angestiegen und das ESV gesunken sind (Abb. 16). Das EDV zeigte insgesamt keine klaren Unterschiede, weder zwischen den beiden Gruppen, noch vor und nach Insulingabe. Die Zunahme der EF in der AKT1/2-KO Gruppe wurde dementsprechend durch die Verbesserung der systolischen Funktion bewirkt.

Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass die *in vivo* Herzfunktion der AKT1/2-KO Mäuse initial schlechter war im Vergleich zu den WT Mäusen. Außerdem zeigte sich eine Verbesserung der EF und des ESV bei der AKT1/2-KO Gruppe nach Insulingabe, während die Herzfunktion der WT Mäuse keine Veränderungen nach einer Insulingabe zeigte.

3.4.3 Der myokardiale Strain war nach der Behandlung mit Insulin höher in der AKT1/2-KO, aber nicht in der WT Gruppe

Zur genaueren Untersuchung der Wandbewegung und Wandverformung des linken Ventrikels wurden die in 3.4.2 beschriebenen echokardiographischen Daten mithilfe der Auswertesoftware VevoStrain analysiert. Hierbei wurden die B-Mode Aufzeichnungen in der kurzen Achse untersucht und die radialen und zirkumferentiellen Werte basal (BL) und 10 Minuten nach (INS) Insulingabe berechnet.

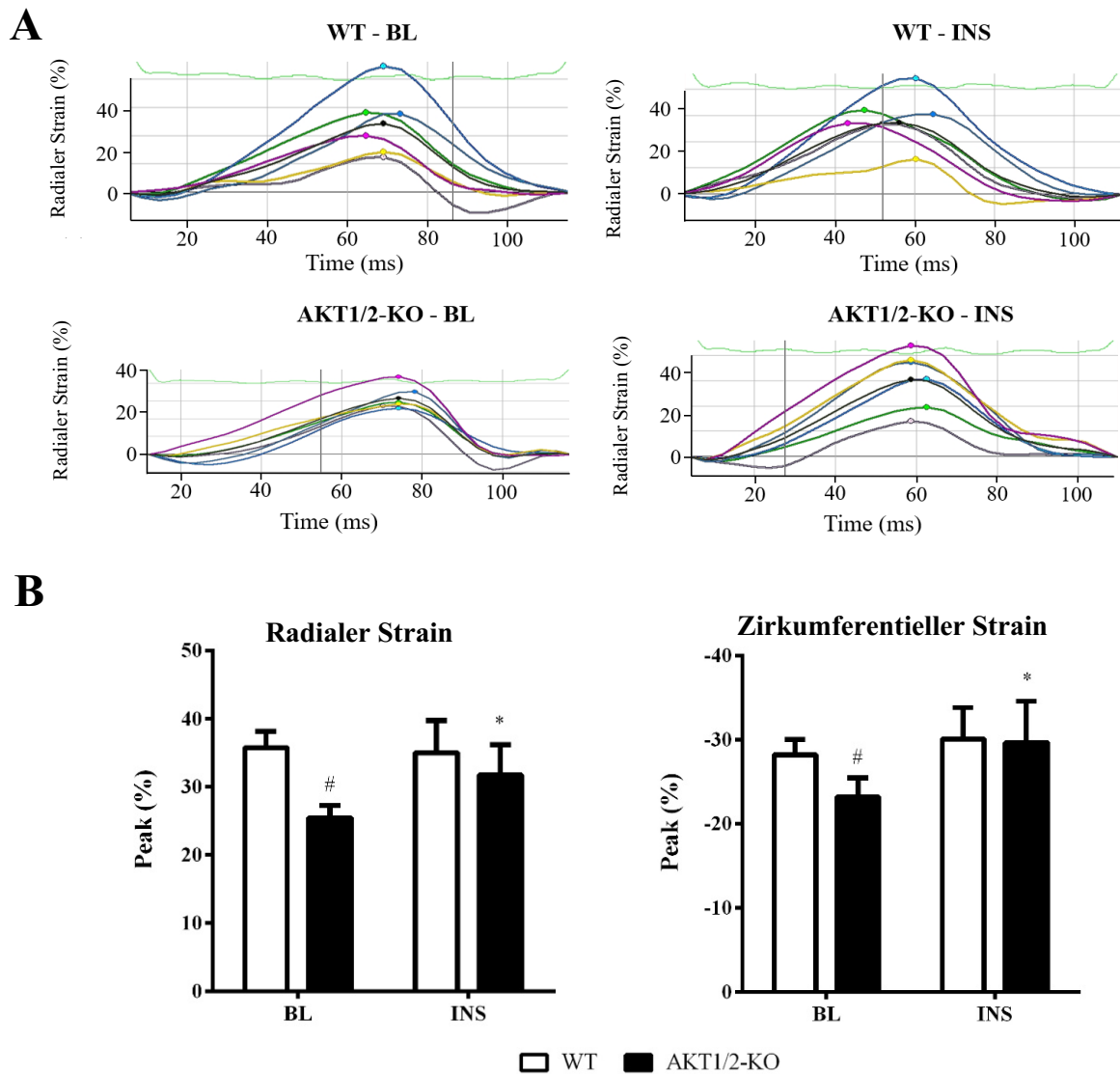


Abb. 17: Strain Analyse.

(A) Darstellung der radialen Strain Werte im Analyse-Programm VevoStrain. Abgebildet sind die Strain Kurven eines Herzzyklus von einem Wildtyp (WT) und einem AKT1/2-KO vor (BL) und 10 Minuten nach (INS) Insulingabe. Die schwarze Kurve repräsentiert den Mittelwert aller Segmente.

(B) Graphische Darstellung der radialen und zirkumferentiellen Strain Analyse. Die Werte wurden vor (BL) und 10 Minuten nach (INS) Insulingabe ermittelt. Die Werte sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung. $n=4-5$; two-way repeated measures ANOVA mit Tukey post-hoc Test. * $p < 0,05$ vs. BL der gleichen Gruppe; # $p < 0,05$ vs. WT zum gleichen Zeitpunkt.

Die Strain Analyse zeigte, dass sowohl der radiale, als auch der zirkumferentielle Strain bereits unter basalen Bedingungen in der AKT1/2-KO Gruppe im Vergleich zur WT Gruppe erniedrigt war (Abb. 17A). Nach der Insulingabe blieb der Strain der WT Gruppe unverändert, während beim AKT1/2-KO der Strain, sowohl in radialer als auch in zirkumferentieller Richtung zugenommen hat (Abb. 17B).

3.5 Molekularbiologische Untersuchungen

3.5.1 Western Blot Analyse der GSK-3 β -Phosphorylierung der AKT1/2-KO Herzen

Die Ergebnisse der funktionellen Untersuchungen, also der isoliert perfundierten Herzen und der *in vivo* Echokardiographie zeigten eine basal eingeschränkte Herzfunktion, sowie eine Zunahme der Kontraktilität nach Insulingabe der AKT1/2-KO Gruppe. Die WT Gruppe zeigte keinen Unterschied nach Insulingabe. Wir haben übergreifend zu den einzelnen Fragestellungen erste Untersuchungen zu den möglicherweise beteiligten Signalwegen mittels Western Blot Analysen durchgeführt. Im Detail wurden Proteine und Substrate des PI3K-Signalweges, sowie Proteine, welche an der Regulation der kardialen Kontraktilität verantwortlich sind, analysiert.

Zuerst untersuchten wir die durch AKT regulierte Glykogensynthase-Kinase 3 β (GSK-3 β) und den Einfluss der Abwesenheit von AKT1 und AKT2 auf den Phosphorylierungszustand der GSK-3 β nach Insulinstimulation. GSK-3 phosphoryliert und aktiviert die Glykogensynthase und spielt somit in der Glykogensynthese eine Rolle. AKT kann GSK-3 β phosphorylieren und inaktivieren. Dadurch können weitere Signalwege aktiviert werden, indem sie nicht mehr durch GSK-3 β inhibiert sind. Die mittels Western Blot untersuchten Herzventrikel-Lysate stammten aus isoliert perfundierten WT und AKT1/2-KO Herzen, die entweder Krebs-Henseleit-Puffer (WT-) oder 6 nM Insulin (WT+, AKT1/2-KO+) für 10 min erhalten haben (Abb. 18A). Um den Phosphorylierungsgrad zu ermitteln wurden die Phospho-Signale mit den Gesamt-GSK-3 β -Signalen verglichen (Abb. 18B).

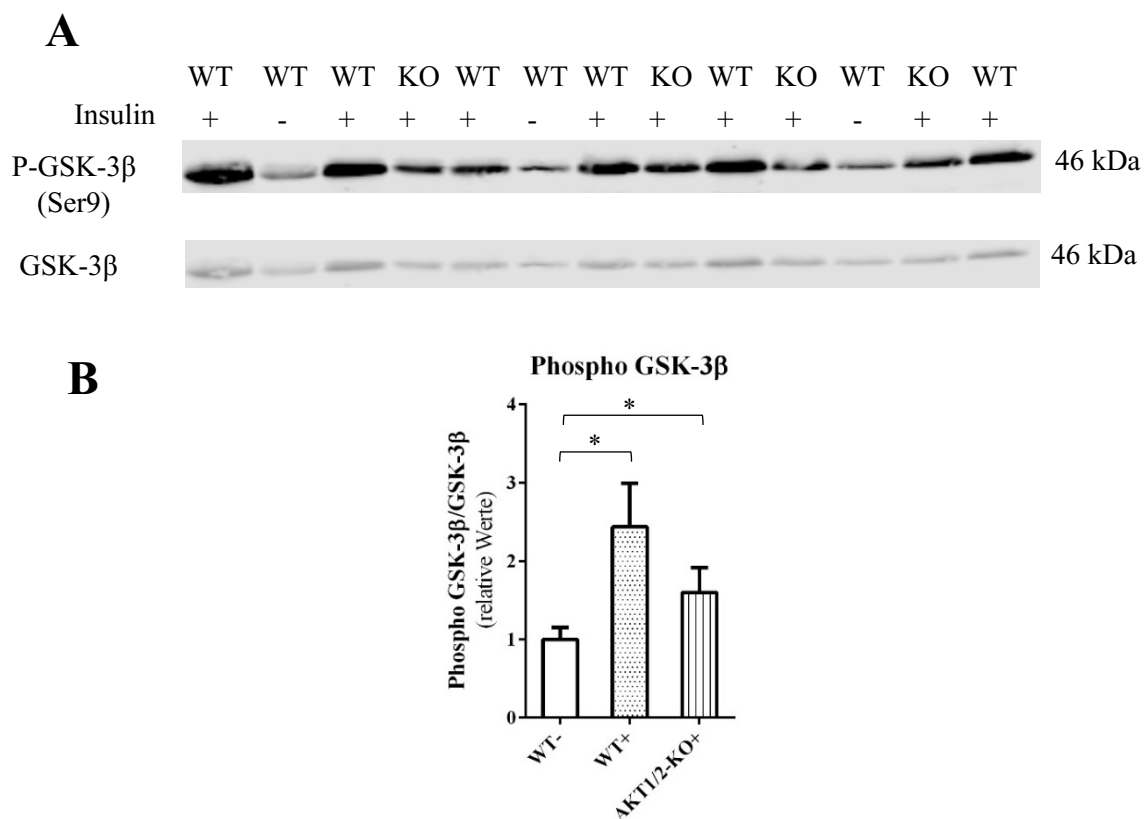


Abb. 18: Die Verabreichung von 6 nM Insulin führte zu einer gesteigerten GSK-3 β -Phosphorylierung in den Wildtyp Herzen. Die mittels Western Blot Analyse untersuchten Herzventrikel-Lysate stammten aus den isoliert perfundierten Herzversuchen und wurden entweder 10 min lang mit 6 nM Insulin (WT+, AKT1/2-KO+) behandelt oder erhielten Krebs-Henseleit-Puffer (WT-). (A) Immunfluoreszenz-Aufnahmen von Western Blots. (B) Zusammenfassende normierte Darstellung der ermittelten Signalstärken. Die Signalstärke der phosphorylierten GSK-3 β wurde mit GSK-3 β ins Verhältnis gesetzt. Die Werte sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung. $n = 3-6$, one-way ANOVA mit Tukey post-hoc Test, * $p < 0,05$ vs. WT-.

Die Analyse zeigte eine Zunahme der Phosphorylierung von GSK-3 β durch die Insulingabe in den WT+ Proben. In den Herzen mit Verlust von AKT1/2 konnten wir ebenfalls eine Zunahme durch Insulingabe feststellen, jedoch tendenziell niedriger als bei WT+ (Abb. 18B).

Die Beeinträchtigung des AKT-Signalweges durch das Fehlen von AKT1/2 führte zu einer tendenziell eingeschränkten Phosphorylierung der GSK-3 β durch Insulingabe im Vergleich zur Kontrolle.

3.5.2 Untersuchung des MAP-Kinase-Weges

Im Folgenden haben wir die Auswirkungen der Abwesenheit von AKT1 und AKT2 unter zusätzlicher Insulingabe auf den Phosphorylierungsgrad der ERK1/2 untersucht. Die ERK1/2 kann ebenfalls durch Insulin aktiviert werden, jedoch getrennt von PI3K/AKT-Signalweg.

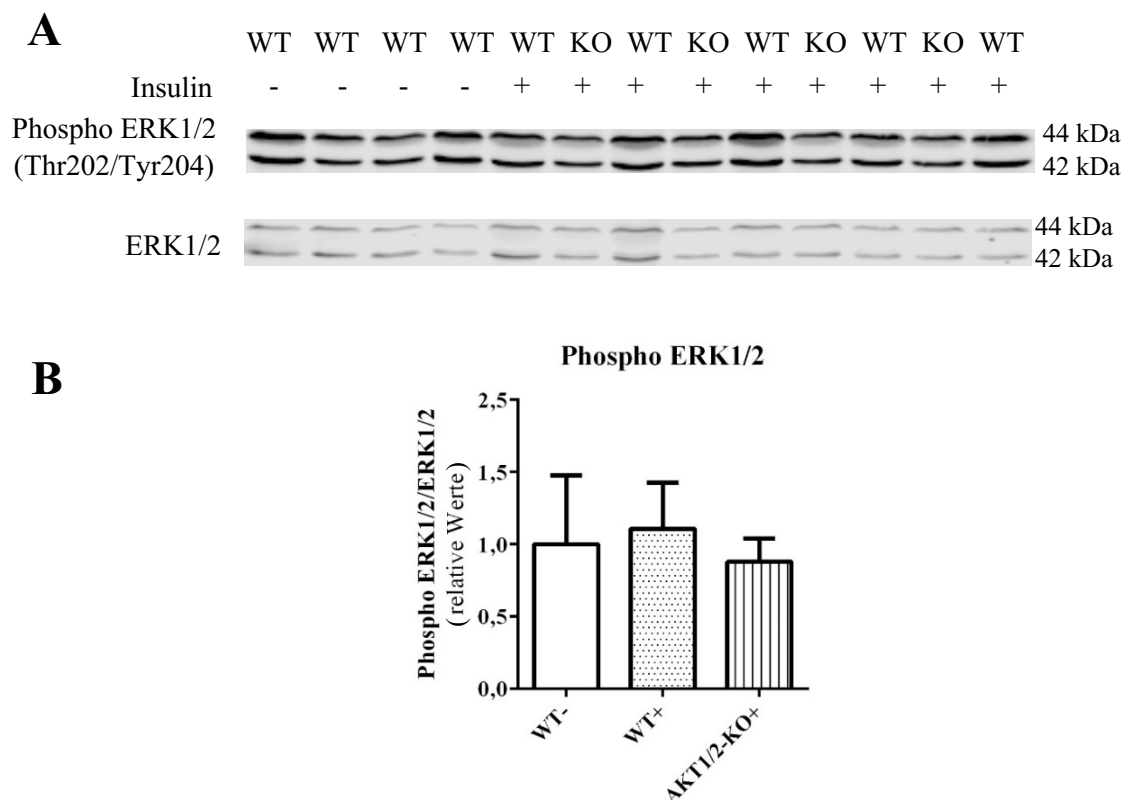


Abb. 19: Der Phosphorylierungsgrad von ERK1/2 wurde nicht durch die Verabreichung von Insulin beeinflusst. Die mittels Western Blot Analyse untersuchten Herzventrikel-Lysate stammten aus den isoliert perfundierten Herzversuchen und wurden entweder 10 min lang mit 6 nM Insulin (WT+, AKT1/2-KO+) behandelt oder erhielten Krebs-Henseleit-Puffer (WT-). (A) Immunfluoreszenz-Aufnahmen von Western Blots. (B) Zusammenfassende normierte Darstellung der ermittelten Signalstärken. Die Signalstärke der phosphorylierten ERK1/2 (Phospho ERK1/2) wurde mit ERK1/2 ins Verhältnis gesetzt. Die Werte sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung. $n=4-5$, one-way ANOVA mit Tukey post-hoc Test.

Der Phosphorylierungsgrad der ERK1/2 war in allen Gruppen gleich, unabhängig ob AKT1/2 vorhanden war oder ob Insulin verabreicht wurde (Abb. 19B).

In diesen Versuchen konnten wir zeigen, dass Insulin keine Auswirkung auf den Phosphorylierungsgrad von ERK1/2 hatte und auch, dass das Fehlen von AKT1/2 den Phosphorylierungsgrad nicht verändert hat.

3.5.3 Das Fehlen von AKT1/2 in den Herzen beeinflusste die PKA-Expression nicht

Zur weiteren Abklärung der vorher gezeigten basal eingeschränkten kardialen Funktion der AKT1/2-KO Herzen überprüften wir die Expression der Proteinkinase A (PKA). Die PKA phosphoryliert viele verschiedene Zielproteine, die eine wichtige Rolle in der Regulation der kardialen Kontraktilität und der kardiomyozytären Kalziumhomöostase spielen. Als Zielprotein für die Western Blot Analyse eignete sich die katalytische Untereinheit der PKA (PKA α cat), die bei der Aktivierung von PKA freigesetzt wird. Die Herzventrikel-Lysate stammten aus isoliert perfundierten Herzversuchen, es wurde ausschließlich Krebs-Henseleit-Puffer verabreicht (Abb. 20A).

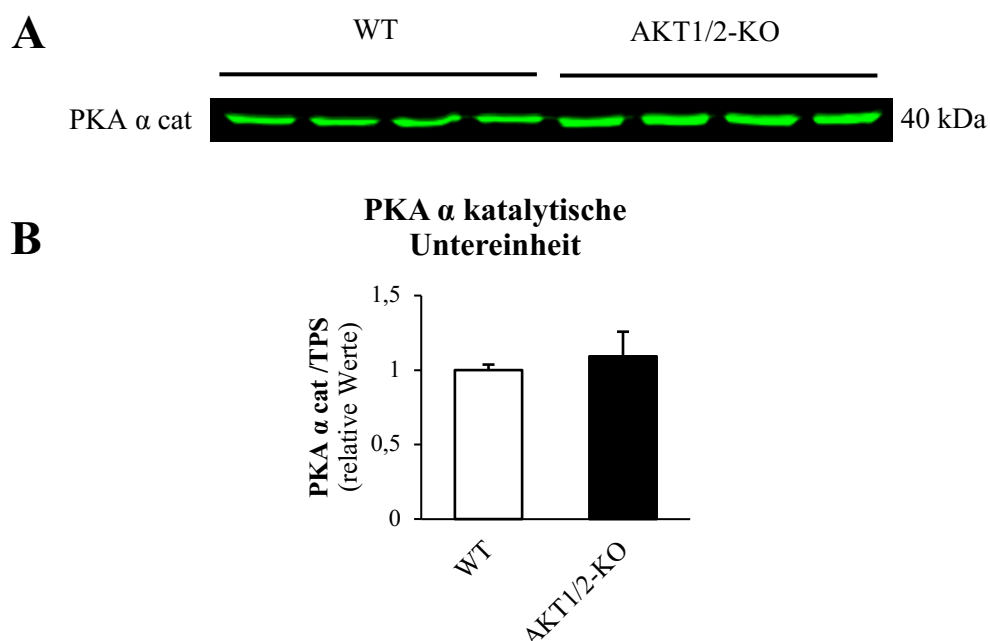


Abb. 20: In der Expression der PKA gab es keine Unterschiede zwischen AKT1/2-KO und WT.

Die mittels Western Blot Analyse untersuchten Herzventrikel-Lysate stammten aus den isoliert perfundierten Herzversuchen und erhielten 10 min lang Krebs-Henseleit-Puffer (WT, AKT1/2-KO).

(A) Immunfluoreszenz-Aufnahmen von Western Blots. (B) Zusammenfassende normierte Darstellung der ermittelten Signalstärken. Die Signalstärke der katalytischen Untereinheit der PKA (PKA α cat) wurde im Verhältnis zum *Total Protein Stain* (TPS) in den Proben gezeigt. Die Werte sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung; $n=4$, ungepaarter t-test.

Die Proteinexpression der PKA α cat zeigte keinen Unterschied zwischen den Wildtyp und AKT1/2-KO Herzen (Abb. 20B). Somit können wir die zugrunde liegenden Unterschiede in der Herzfunktion zum Anfang der Versuche nicht auf die PKA-Expression zurückführen.

3.5.4 Western Blot Analysen der Troponin I-Phosphorylierung

In der vorher beschriebenen Untersuchung konnten wir keinen Unterschied in der Proteinexpression der PKA finden, deswegen haben wir im nächsten Schritt die PKA-Aktivität indirekt überprüft, indem die PKA-vermittelte Phosphorylierung der Zielproteine analysiert wurde. Dazu gehört unter anderem das kardiale Troponin I, welches Teil des Troponin-Komplexes des Kardiomyozyten ist und an der Kontraktion beteiligt ist. Die mittels Western Blot untersuchten Herzventrikel-Lysate stammten aus isoliert perfundierten WT und AKT1/2-KO Herzen, die entweder Krebs-Henseleit-Puffer (WT-, AKT1/2-KO-) oder 6 nM Insulin (WT+, KO+) für 10 min erhalten haben. Um den Phosphorylierungsgrad zu ermitteln wurden die Phospho-Signale mit den Gesamt-Troponin I Signalen verglichen.

Die Untersuchung der Gesamtexpression von Troponin I zeigte keinen Unterschied zwischen den AKT1/2-KO und WT Herzen (Abb. 21B). Unter basalen Bedingungen ergab sich kein signifikanter Unterschied beim Phosphorylierungsgrad von Troponin I zwischen den beiden Gruppen (Abb. 21B).

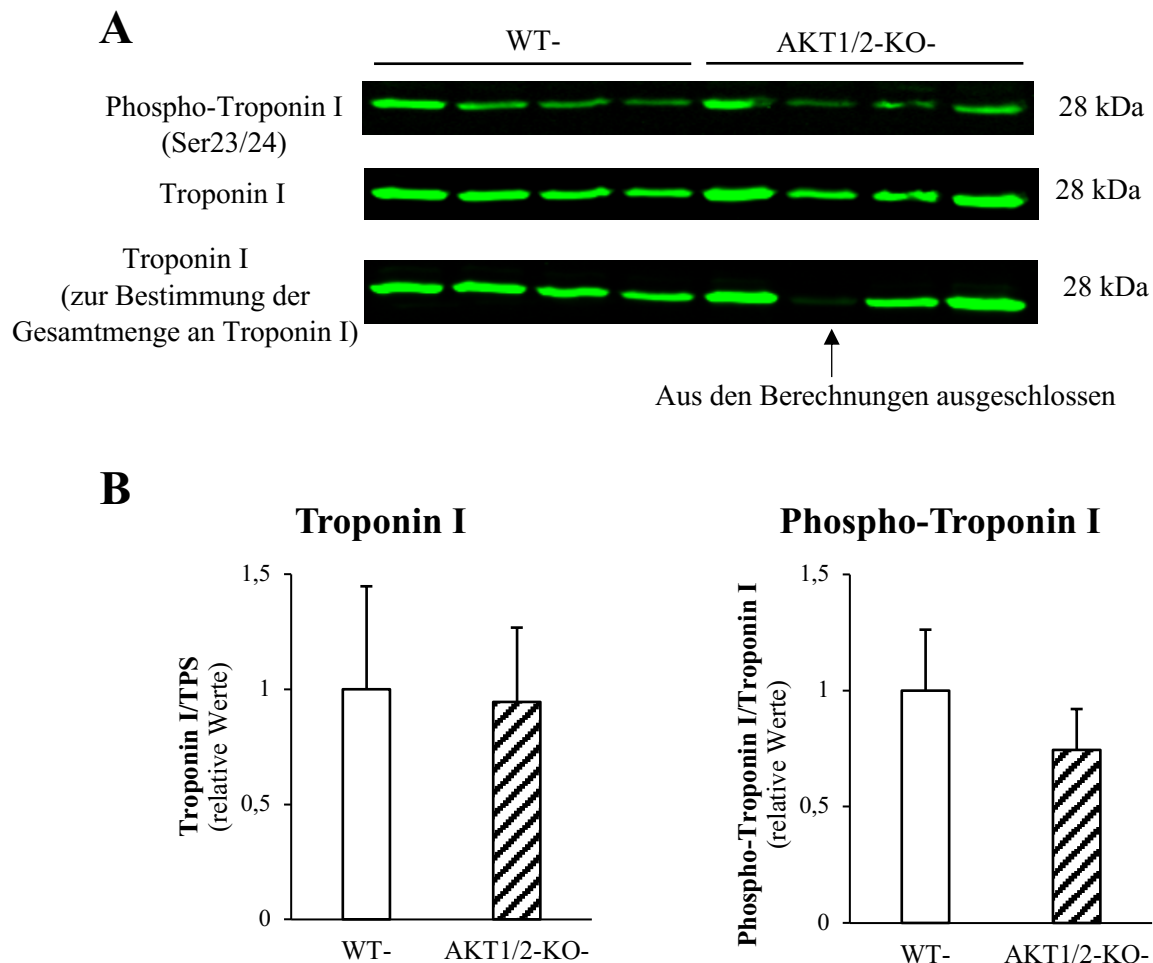


Abb. 21: Western Blot Analysen von basalem Troponin I. Die auf Troponin I und Phospho-Troponin I untersuchten Herzventrikel-Lysate stammten aus den isoliert perfundierten Herzversuchen und wurden 10 min lang mit Krebs-Henseleit-Puffer (WT-, AKT1/2-KO-) behandelt. (A) Western Blot Aufnahme von WT- und AKT1/2-KO-. (B) Zusammenfassende normierte Darstellung der ermittelten Signalstärken von Troponin I zum *Total Protein Stain* (TPS). Die Signalstärke des phosphorylierten Troponin I (Phospho-Troponin I) wurde zur Signalstärke des Troponin I normiert.

Die Werte sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung. $n = 3-4$, ungepaarter t-test.

Um eine Aussage über den Einfluss von Insulin auf die Herzfunktion zu treffen, wurde zusätzlich der Phosphorylierungsgrad von Troponin I der beiden Genotyp-Gruppen nach Insulinstimulierung verglichen (Abb. 22B). Hierbei ließen sich vergleichbare Werte der beiden Gruppen messen.

Zusammenfassend lässt sich keine eindeutige Veränderung des Phosphorylierungsgrades von Troponin I weder durch Insulin noch durch das Fehlen von AKT1/2 feststellen.

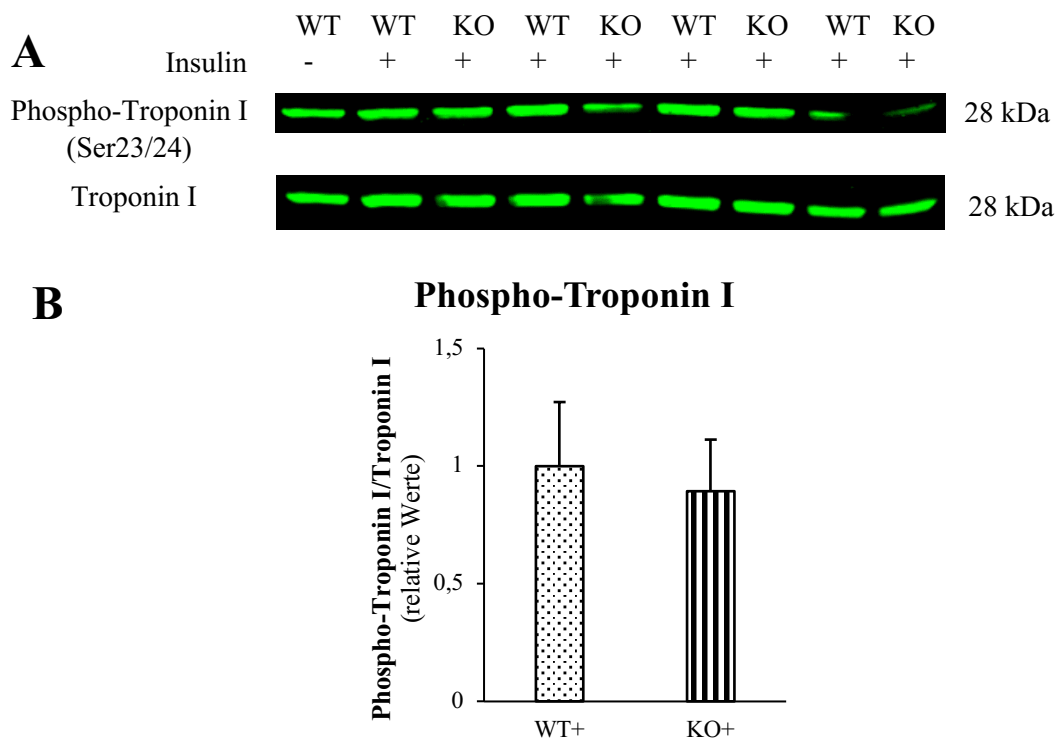


Abb. 22: Western Blot Analysen von Troponin I nach Insulinbehandlung. Die auf Troponin I und Phospho-Troponin I untersuchten Herzventrikel-Lysate stammten aus den isoliert perfundierten Herzversuchen und wurden entweder 10 min lang mit 6 nM Insulin (WT+, KO+) behandelt oder erhielten Krebs-Henseleit-Puffer (WT-, AKT1/2-KO-). (A) Western Blot Aufnahme von WT+ und AKT1/2-KO+. (B) Zusammenfassende normierte Darstellung der ermittelten Signalstärken. Die Signalstärke des phosphorylierten Troponin I (Phospho-Troponin I) wurde zur Signalstärke des Troponin I normiert. Die Werte sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung, $n=4$, ungepaarter t-test.

3.5.5 Die Untersuchung der Herzen aus den *in vivo* Versuchen ergab keine Unterschiede bezüglich der Phospholamban-Phosphorylierung

Die folgenden Analysen der Phospholamban-Phosphorylierung wurden mit der Unterstützung von Prof. Dr. med. Joachim Schmitt und Dr. rer. nat. Florian Funk vom Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf angefertigt.

Neben Troponin I ist Phospholamban (PLN) ein weiteres Zielprotein der PKA. Die Phosphorylierung von PLN führt zur Aufhebung der ursprünglichen Hemmung der SERCA2a, wodurch der zytoplasmatische Kalziumspiegel schneller sinkt und ein positiv lusitroper Effekt hervorgerufen wird. Die mittels Western Blot Analyse untersuchten Herzventrikel-Lysate stammten von den Tieren der Serie mit den echokardiographischen Untersuchungen und wurden auf die PLN-Phosphorylierung überprüft. Hierbei wurden zwei Phosphorylierungsstellen des PLN-Monomers, Serin 16 und Threonin 17 analysiert.

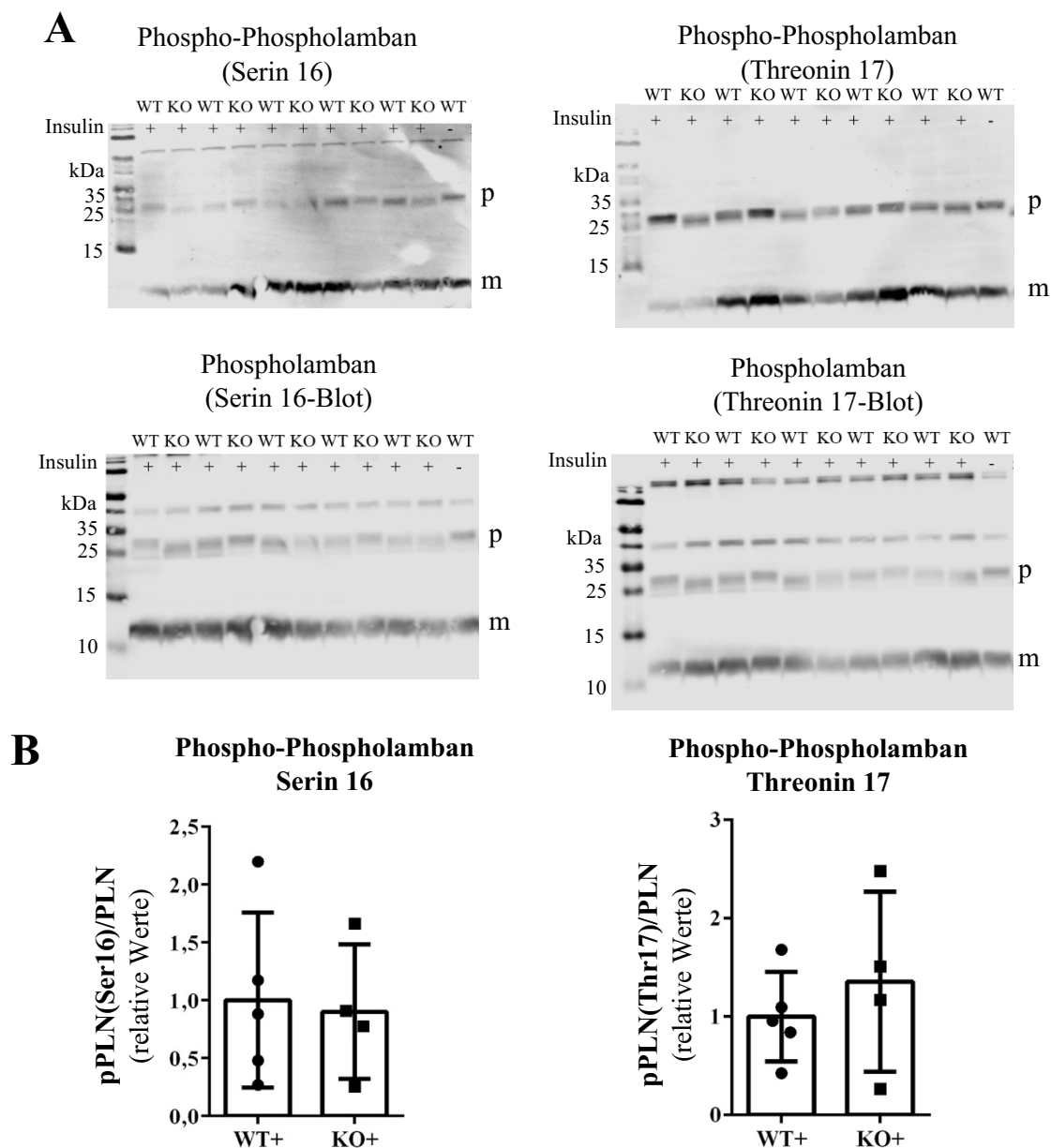


Abb. 23: Die Phospholamban-Phosphorylierung 10 Minuten nach Insulin zeigte vergleichbare Werte bei Wildtyp und AKT1/2-KO. Die mittels Western Blot Analyse untersuchten Herzventrikel-Lysate (WT+, KO+) stammten aus den echokardiographischen Untersuchungen und wurden 10 Minuten nach intraperitonealer Insulingabe (0,1 µg/g Körpergewicht) entnommen. Als Referenz für die Pentamere (p) und Monomere (m) wurde ein rasch entnommenes Herz benutzt (WT-).

(A) Western Blot Aufnahme des Phospho-Phospholambans (Serin 16; pPLN(Ser16)), des Phospho-Phospholambans (Threonin 17; pPLN(Thr17)), des Phospholambans des Serin 16 Blots, des Phospholambans des Threonin 17 Blots. (B) Zusammenfassende normierte Darstellung der ermittelten Signalstärken. Die Signalstärke des phosphorylierten Phospholamban-Monomers (pPLN(Ser16) und pPLN(Thr17)) wurde mit der Signalstärke des Phospholamban-Monomers (PLN) ins Verhältnis gesetzt. Die Werte sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung, außerdem sind die Einzelwerte als Punkte dargestellt, n= 4-5, ungepaarter t-test.

Am Ende der *in vivo* Versuche entnommene Herzen zeigten keinen signifikanten Unterschied in der Phosphorylierung des Phospholamban-Monomers zwischen Wildtyp und AKT1/2-KO (Abb. 23B).

3.5.6 Die Untersuchung des Phosphorylierungsgrades von Phospholamban in den isoliert perfundierten Herzen

Um die Ursache der unterschiedlichen Herzfunktion der beiden Genotypgruppen, WT und AKT1/2-KO, weiter aufzuklären haben wir Western Blot Analysen der Phospholamban-Phosphorylierung an Herzen aus den Langendorff-Versuchen durchgeführt. Im Folgenden erfolgte die Analyse des Phosphorylierungsgrades des Phospholamban-Monomers an den Stellen Serin 16 und Threonin 17 nach der Verabreichung von Insulin.

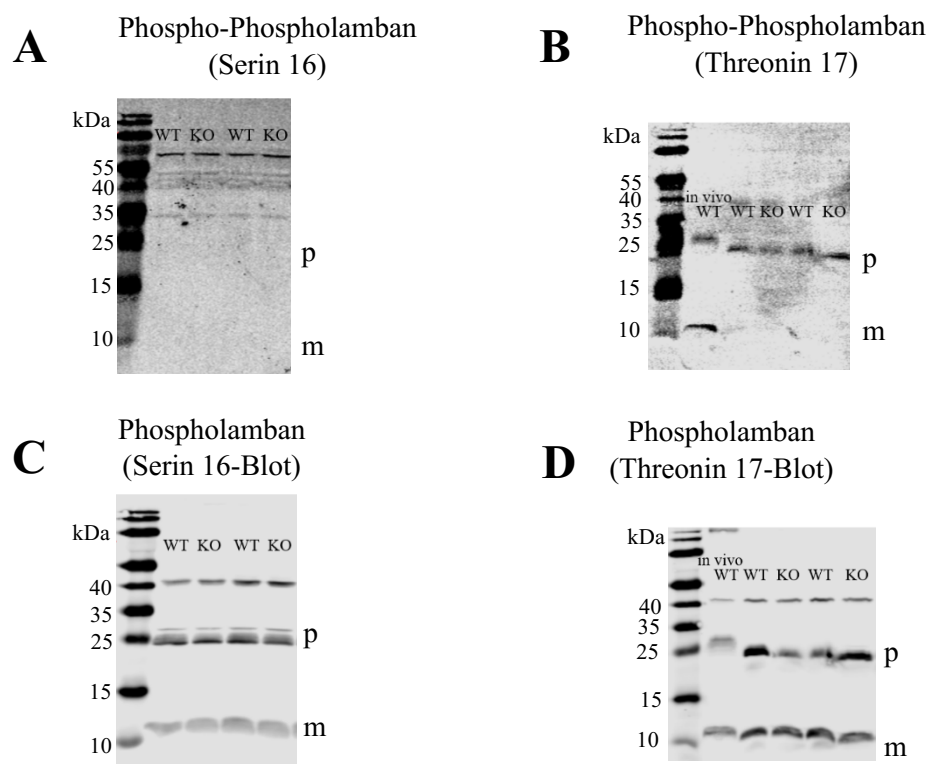


Abb. 24: Western Blot Analyse der isoliert perfundierten Herzen. (A) Western Blot Aufnahme des Phospho-Phospholambans (Serin 16). (B) Western Blot Aufnahme des Phospho-Phospholambans (Threonin 17). (C) Western Blot Aufnahme des Phospholambans des Serin 16 Blots. (D) Western Blot Aufnahme des Phospholambans des Threonin 17 Blots. Die analysierten Herzventrikel-Lysate stammten aus den isoliert perfundierten Herzexperimenten, alle erhielten 10 min lang 6 nM Insulin (WT, KO). Die erste Probe in B und D (in vivo WT) war ein rasch entnommenes Wildtyp-Herz als Referenz-Bande für die Pentamere (p) und Monomere (m).

Die Signalstärke des Phospholambans konnte in den isoliert perfundierten Herzen detektiert werden (Abb. 24C, D), die Phosphorylierung war jedoch so gering, dass die verwendete Methode

nicht sensitiv genug war, um die Signale darzustellen und Unterschiede festzustellen (Abb. 24A, B). Um hierbei mögliche Fehlerquellen bei der Detektion des Phospho-Signals zu eliminieren, wurde ein rasch entnommenes Herz ohne weitere Behandlung (in vivo WT) als Referenzprobe benutzt (Abb. 24B). In dieser Probe konnten wir die Phospho-Signale detektieren (Abb. 24B, D). Es ist uns nicht gelungen in den isoliert perfundierten Herzen nach Insulingabe die Phosphorylierung von PLN-Monomeren darzustellen.

Die ausschließlich mit Insulin behandelten Herzen zeigten keine sichtbare Phosphorylierung von Phospholamban-Monomeren in den Western Blot Analysen.

4 Diskussion

Das übergeordnete Ziel der vorliegenden Dissertation bestand in einem Erkenntnisgewinn über einen Einfluss von Insulin beziehungsweise einer Aktivierung des Insulinrezeptorsignalweges auf die kardiale Kontraktilität. Ein besonderer Fokus lag hierbei auf der Bedeutung der Serin/Threonin-Kinase AKT.

Zusammengefasst zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass Insulin

1. sowohl im isolierten Herzen als auch *in vivo* keinen Effekt auf die Kontraktilität von Herzen wildtypischer Mäuse hat,
2. die reduzierte Kontraktilität in Herzen von Mäusen mit kombinierter Deletion der AKT-Isoformen AKT1 und AKT2 verbessert, wobei keine eindeutige Isoformspezifität nachgewiesen werden konnte, sowie
3. den positiv inotropen Effekt einer pharmakologischen β_1 -Rezeptorstimulation nicht beeinflusst.

4.1 Die Auswirkung von Insulin bei AKT-Verlust auf die kardiale Kontraktilität

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle des insulinvermittelten PI3K/AKT-Signalweges in der Regulation der kardialen Kontraktilität zu untersuchen. Unsere Ergebnisse an isolierten Herzen wildtypischer Mäuse ergaben insgesamt keinen Hinweis auf einen Einfluss einer Insulinapplikation auf die kardiale Kontraktilität. Diese Schlussfolgerung, dass Insulin die kardiale Kontraktilität nicht beeinflusst, stellt das Ergebnis einer Gesamtbetrachtung der Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen dar; auch unter Berücksichtigung eines beschriebenen leichten Anstiegs des linksventrikulären entwickelten Drucks nach Insulinapplikation der Herzen der wildtypischen Mäuse im Rahmen der ersten experimentellen Serie. Da erstens bei diesen Herzen weder eine Veränderung der maximalen noch der minimalen Druckänderungsgeschwindigkeit ($dp/dt_{\max}$ und $dp/dt_{\min}$) nachweisbar war, zweitens in der folgenden, unabhängigen experimentellen Serie ein solcher Effekt in den Herzen der wildtypischen Mäuse nicht nachweisbar war, und drittens auch unter *in vivo* Bedingungen kein Effekt einer Insulingabe auf die kardiale Funktion erkennbar war, ergeben sich aus den vorliegenden Daten keine Hinweise auf eine Beeinflussung der kardialen Kontraktilität durch Insulin. Darüber hinaus scheint dieses Ergebnis nicht die Folge einer ineffektiven Insulinrezeptoraktivierung durch eine zu niedrige Insulinkonzentration zu sein, da die molekularbiologischen Untersuchungen eine Wirksamkeit der eingesetzten Insulinkonzentration sowohl am Langendorff-Herzen als auch im *in vivo* Versuch nachweisen konnten. Dieses Ergebnis, dass Insulin keinen Effekt auf die kardiale Funktion hat, steht im Einklang zu Ergebnissen von Fu *et al.*, welche zeigen konnten, dass die Sarkomerlängenverkürzung elektrisch stimulierter isolierter Kardiomyozyten adulter Mäuse zwischen den Gruppen mit und ohne Insulin vergleichbar war [43].

Demgegenüber zeigte sich aber interessanterweise in der vorliegenden Arbeit, dass Insulin in dem Fall einen steigernden Effekt auf die kardiale Kontraktilität hat, in welchem die Insulinapplikation in Herzen von Mäusen mit Kardiomyozyten-spezifischer kombinierter Deletion der AKT-Isoformen AKT1 und AKT2 erfolgte. Dieses Ergebnis erscheint auf den ersten Blick überraschend, da AKT ein zentraler Bestandteil des Insulin-regulierten PI3K/AKT-Signalweges ist, und somit eher eine Abschwächung bzw. Aufhebung eines Insulineffektes als Folge einer AKT-Deletion zu erwarten wäre. Dennoch ist auffällig, dass dieser Befund sich nicht auf die Ergebnisse einer einzelnen experimentellen Serie oder die Verwendung eines einzelnen Versuchsmodells beschränkt, sondern zum einen im isoliert perfundierten Herzen in der zweiten experimentellen Serie bestätigt werden konnte, und zudem im *in vivo* Versuch nachweisbar war. Die Ursache für die beschriebene Steigerung der Kontraktilität bzw. der Normalisierung der reduzierten basalen Kontraktilität konnte im Rahmen der vorliegenden Dissertation nicht aufgeklärt werden und ist somit weiterhin unklar. Die molekularbiologischen Untersuchungen potenziell beteiligter Signalwege sowie von Regulatoren der kardialen Kontraktilität ergaben keine Hinweise auf die zu Grunde liegenden Mechanismen. Die Ergebnisse der Langendorff-Versuche an Herzen mit entweder kardiomyozytärer AKT1-Deletion oder kardiomyozytärer AKT2-Deletion deuten allerdings darauf hin, dass es sich nicht um einen AKT-isoformspezifischen Effekt handelt.

Von Interesse für das Verständnis der Mechanismen der Insulinwirkung auf die kardiale Pumpfunktion ist außerdem, dass Insulin nicht nur in den *in vivo*-Untersuchungen zu einer Normalisierung bzw. Verbesserung der reduzierten Funktion der AKT1/2-KO Herzen führte, sondern auch im isoliert perfundierten Herzen. Dies deutet darauf hin, dass es sich um eine direkte Insulinwirkung auf das Herz handelt, und nicht um einen indirekten Effekt über eine Beeinflussung systemischer Faktoren.

Die insulinvermittelte Funktionsverbesserung der AKT1/2-KO Herzen könnte auf eine kompensatorische Aktivierung AKT-unabhängiger Signalwege wie zum Beispiel des ERK/MAPK-Signalweges und / oder auf eine veränderte Kalziumhomöostase hindeuten. Die Wirkung von Insulin wurde bereits vielfach untersucht, hauptsächlich in Organen mit einer hohen Dichte an Insulinrezeptoren, wie Fettgewebe, Leber und Skelettmuskulatur. In der Herzmuskulatur hat Insulin auch wichtige regulatorische Funktionen. Neben der Förderung der Glukoseaufnahme reguliert Insulin den Energiestoffwechsel, indem es die Glykolyse steigert und die Beta-Oxidation von Fettsäuren hemmt [56]. Außerdem besitzt Insulin eine anti-apoptotische Wirkung und schützt somit die Zellintegrität [57]. Störungen der Insulinwirkung, wie bei Insulinresistenz oder Diabetes mellitus, können erhebliche negative Auswirkungen auf die Herzfunktion haben [58]. Ob und auf welcher Ebene Insulin in der Regulation der kardialen Kontraktilität eine Rolle spielt, ist jedoch noch nicht ausreichend geklärt.

In der Literatur sind eine Reihe von Hinweisen auf eine funktionell relevante Interaktion von AKT und kardialer Kontraktilität beschrieben. So konnten in Phosphoproteomanalysen von isolierten

AKT1/2-KO HL-1 Kardiomyozyten mehrere Phosphorylierungsstellen identifiziert werden, die eine Verbindung vom PI3K/AKT-Signalweg zur Erregungs-Kontraktions-Kopplung unterstützen [46]. Zu diesen Phosphoproteinen gehören unter anderem der L-Typ-Kalziumkanal, der Ryanodin-Rezeptor, und Phospholamban [46]. In isolierten HL-1 Kardiomyozyten konnte zudem gezeigt werden, dass der PI3K/AKT-vermittelte Signalweg notwendig für eine normale Kalziumhomöostase ist [59]. Eine weitere Arbeitsgruppe lieferte Hinweise darauf, dass eine Aktivierung der AKT zu einer Zunahme des Kalziumeinstroms über die L-Typ-Kalziumkanäle führt, welche wiederum die Freisetzung von Kalzium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum bewirkt und in einer Steigerung der kardialen Kontraktilität resultiert [60].

Eine mögliche Erklärung für die Insulinwirkung, die unabhängig vom klassischen PI3K/AKT-Signalweg beobachtet wurde, liefert die Arbeit von Steinhorn *et al.* [44]. In dieser Arbeit wurde an isolierten Kardiomyozyten gezeigt, dass Insulin über die NADPH-Oxidase-Isoformen NOX2 und NOX4 die Produktion von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) im Herzen stimuliert [44]. In den letzten Jahren wurde deutlich, dass reaktive Sauerstoffspezies (ROS), insbesondere das relativ stabile H_2O_2 , nicht nur als schädliche Nebenprodukte des Zellstoffwechsels anzusehen sind, sondern auch physiologische Signalfunktionen übernehmen können [61]. Im Herzen spielen bei der ROS-Produktion insbesondere die NADPH-Oxidase-Isoformen NOX2 und NOX4 eine zentrale Rolle [62]. Aufgrund der Ergebnisse von Steinhorn *et al.* könnte spekuliert werden, dass eventuell H_2O_2 -abhängige Mechanismen zur kompensatorischen Steigerung der Herzfunktion in den Herzen mit AKT-Deletion beigetragen haben. Allerdings bleibt unklar, über welche H_2O_2 -abhängigen Mechanismen dieser Effekt vermittelt werden sollte, und warum Insulin in Herzen wildtypischer Mäuse keinen Effekt auf die Kontraktilität zeigte.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden an transgenen Mäusen mit Kardiomyozyten-spezifischer AKT-Deletion im adulten Tier durchgeführt, wobei durch die zeitliche und gewebespezifische Kontrolle der Deletionen der Einfluss entwicklungsbedingter und systemischer Nebeneffekte minimiert wurde. Da frühere Untersuchungen an konstitutionellen *Knockout*-Mausmodellen ergeben haben, dass ein globaler Verlust von AKT1 und AKT2 zu einer schwerwiegenden Wachstumsstörung, unter anderem Herztrophie, führt, und kurz nach der Geburt letal ist [29], stellte die Möglichkeit zur zeitlichen Kontrolle der Deletion mit Induktion im adulten Tier eine potenziell geeignete Strategie zur Umgehung dieser Problematik dar. Zudem war durch die zeitliche Nähe zwischen *Knockout*-Induktion und Versuchsdurchführung die Möglichkeit der Ausbildung kompensatorischer Nebeneffekte reduziert. Durch die Gewebespezifität des *Knockouts* sind gefundene Veränderungen auf spezifische Zell- oder Gewebetypen zurückzuführen, was das mechanistische Verständnis einer beobachteten Veränderung deutlich steigern kann. In den transgenen Mäusen, welche in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, erfolgte die AKT-Deletion ausschließlich in Kardiomyozyten. Bei den Überlegungen zu den Mechanismen des Insulineffektes in den AKT-KO Herzen ist somit zumindest theoretisch in Erwägung zu ziehen, dass

der gefundene Insulineffekt dennoch AKT-abhängig über andere kardiale Zellen (Nicht-Kardiomyozyten) im Sinne eines heterozellulären *Crosstalks* vermittelt sein könnte. Fibroblasten gehören im Herzen zu den häufigsten nicht-muskelbildenden Zellen, sie produzieren und erhalten die extrazelluläre Matrix. Weitere Studien liefern erste Hinweise dafür, dass kardiale Fibroblasten auch eine aktive Rolle im Rahmen des elektrophysiologischen *Remodelings* spielen könnten, das mit der Entwicklung kardialer Arrhythmien assoziiert ist [63]. Hierbei wurden die Membranleitfähigkeiten für Ionen im Rahmen einer Myokardschädigung, sowie die Interaktion zwischen Fibroblasten und Kardiomyozyten beobachtet. Es wäre möglich, dass bei den *Knockout* Herzen der Insulineffekt über einen unklaren Mechanismus in zum Beispiel den Fibroblasten verursacht wird, welcher gleichzeitig in den Wildtyp Herzen aufgrund der ungestörten AKT-vermittelten Insulinwirkung nicht auftreten kann, beziehungsweise nicht in einer veränderten kardialen Funktion resultiert.

4.2 Die Rolle von Insulin in der β -Adrenozeptor vermittelten Steigerung der kardialen Kontraktilität

Die Ergebnisse dieser Arbeit ergaben keinen Hinweis auf einen Insulineffekt auf die positiv inotrope Wirkung einer β_1 -Rezeptorstimulation. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den Ergebnissen der Arbeitsgruppe um E. Dale Abel [43, 44]. So konnten Steinhorn *et al.* im Jahre 2017 zeigen, dass eine Insulinapplikation zu einer deutlichen Reduktion der durch Isoproterenol hervorgerufenen Steigerung der Sarkomerlängenverkürzung in isolierten Kardiomyozyten adulter Mäuse führte [44]. Bereits drei Jahre zuvor zeigten zudem Fu *et al.* aus der gleichen Arbeitsgruppe, dass eine Vorbehandlung mit Insulin eine β -adrenerge Stimulation der Kontraktilität im isoliert perfundierten Herzen von Mäusen beeinträchtigte [43]. Der vorgeschlagene Mechanismus beruhte auf einer insulininduzierten Bildung eines Rezeptorkomplexes bestehend aus dem Insulinrezeptor und dem β_2 -Adrenozeptor, welche zu einer verstärkten G_i -Protein-gekoppelten Signalvermittlung anstelle der klassischen G_s -gekoppelten Signalvermittlung führt [43]. Hierdurch kann Insulin die β -adrenerge Reaktion des Herzens hemmen, insbesondere beim Vorliegen eines erhöhten Insulinspiegels, wie zum Beispiel bei Insulinresistenz oder bei Diabetes mellitus Typ 2. Die Ursache der unterschiedlichen Ergebnisse zwischen diesen Untersuchungen und denen der vorliegenden Arbeit ist unklar, insbesondere da sowohl in der Arbeit von Fu *et al.* als auch in dieser Dissertation mit dem Langendorff-Herzen ein vergleichbares Versuchsmodell gewählt wurde. Bei genauerer Betrachtung der beiden Versuchsansätze fallen zwei Aspekte auf, welche einen Erklärungsansatz für die unterschiedlichen Ergebnisse darstellen könnten. Zum einen startete die Applikation von Insulin in der Arbeit von Fu *et al.* bereits 30 Minuten vor Beginn der pharmakologischen β_1 -Rezeptorstimulation, wohingegen in der vorliegenden Arbeit die Insulingabe nur 10 Minuten vor Beginn der pharmakologischen β_1 -Rezeptorstimulation startete. Dieser Unterschied könnte möglicherweise

von Relevanz sein, da Fu *et al.* hinsichtlich des Mechanismus der Interaktion eine dynamische, insulinbedingte Dissoziation von Insulinrezeptor/Adrenorezeptorkomplexen mit der Folge eines verstärkten G_i -*Signallings* als ursächlich für die insulinbedingte Reduktion der β_1 -Rezeptor vermittelten Steigerung der Inotropie annehmen. Vor diesem Hintergrund erscheint es möglich, dass die Rezeptordissoziation eine langsame Kinetik aufweist, so dass eine 10-minütige Insulinapplikation nicht ausreichend ist. Ein weiterer Unterschied zwischen der Arbeit von Fu *et al.* und der vorliegenden Dissertation besteht in den unterschiedlichen funktionellen Parametern wie dem entwickelten Druck, $dP/dt_{\max}$ und $dP/dt_{\min}$, welche bei Fu *et al.* bis zu 40 % niedriger als in der vorliegenden Arbeit liegen, obwohl vergleichbare Puffer- und Perfusionsbedingungen gewählt wurden. Möglicherweise haben diese erheblich unterschiedlichen funktionellen Ausgangsbedingungen einen Einfluss auf den Nachweis von Veränderungen der kardialen kontraktilen Funktion.

Insgesamt lieferten unsere Ergebnisse keine Hinweise darauf, dass Insulin eine hemmende Wirkung auf die positiv inotrope Wirkung einer β_1 -adrenergen Stimulation besitzt.

4.3 Untersuchungen auf molekularbiologischer Ebene

Ergänzend zu den einzelnen Fragestellungen wurden mögliche Signalwege analysiert, die an den beobachteten Effekten beteiligt sein könnten. Hierbei waren Proteine im Fokus, die entweder im PI3K/AKT-Signalweg oder bei der Regulation der kardialen Kontraktilität eine Rolle spielen.

Die kardiale Kontraktilität wird unter anderem durch den β -Adrenorezeptor-Signalweg und durch die PKA und deren Substrate beeinflusst. Insulin vermittelt seine Wirkung überwiegend über den PI3K-Signalweg. Insulin führt außerdem über einen mehrstufigen Prozess zu einer Phosphorylierung von ERK1/2 und reguliert somit die Zellproliferation [21]. Mittels Western Blot Analysen konnten wir keinen relevanten Unterschied in der Phosphorylierung von ERK1/2 zwischen den AKT1/2-KO und den WT Herzen zeigen. Eine kompensatorische Überaktivierung von ERK1/2 bei Verlust von AKT1/2 ist somit nicht eingetreten.

Die kardiale Kontraktilität wird durch β -adrenerge Stimulation physiologisch erhöht, indem die G_s -Protein-gekoppelte Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) und deren Zielproteine die Kalziumhomöostase regulieren. Zu diesen Zielproteinen gehören unter anderem die L-Typ-Kalziumkanäle, die Ryanodin-Rezeptoren, das Troponin C und PLN. Der verstärkte Kalziumeinstrom über die L-Typ-Kalziumkanäle und Phosphorylierung von Ryanodin-Rezeptoren, sowie die verbesserte Kalziumbindung an Troponin C und die beschleunigte Relaxation durch die gesteigerte Rückaufnahme von Kalzium ins sarkoplasmatische Retikulum führen zusammen zu einer stärkeren und effizienteren Herzkontraktion [3].

Interessanterweise konnte eine Arbeitsgruppe mittels Immunofluoreszenz-Mikroskopie eine verringerte PKA-Aktivität in isolierten adulten Kardiomyozyten mit einem gestörtem Insulin-

Signalweg, also in einer diabetischen Stoffwechsellage nachweisen [64]. In der vorliegenden Arbeit zeigte die Gesamt-PKA-Expression jedoch keinen Unterschied zwischen den Gruppen. Anhand der von Reinartz *et al.* durchgeführten Phosphoproteomanalysen gefundenen AKT-vermittelten Phosphorylierungsstellen haben wir das kardiale Troponin I und PLN als wichtige Regulatoren der kardialen Kontraktilität näher untersucht [46]. Die PKA phosphoryliert unter anderem Troponin I (Serin 23/24), wodurch über eine Abnahme der Kalziumsensitivität der Myofilamente ein positiv lusitroper Effekt vermittelt wird [9]. In der vorliegenden Arbeit konnten wir jedoch keinen signifikanten Unterschied im Phosphorylierungsgrad von Troponin I beobachten. Die Western Blot Analysen zeigten unter basalen Bedingungen einen tendenziell niedrigeren Phosphorylierungsgrad von Troponin I in den AKT1/2-KO Proben, der Unterschied zu den WT Proben war jedoch nicht signifikant.

Neben der Kontraktilität der Myofilamente kann auch der kardiomyozytäre Kalziumkreislauf durch die β -adrenerge Stimulation moduliert werden. Hierbei besitzt PLN eine Schlüsselfunktion in der Regulation des kardiomyozytären Kalziumhaushaltes. Die Phosphorylierung von PLN hebt deren inhibitorische Wirkung auf die SERCA2a auf, wodurch ein positiv lusitroper und positiv inotroper Effekt beobachtet wird [8, 65]. In den Proben aus den *in vivo* Untersuchungen konnte kein signifikanter Unterschied im Phosphorylierungsgrad von PLN zwischen den Wildtyp und den AKT1/2-KO Herzen nachgewiesen werden. Im Gegensatz hierzu ist es uns nicht gelungen die Phosphorylierung von PLN in den Proben aus den isoliert perfundierten Herzen zu detektieren. Am ehesten war die Phosphorylierung so gering, dass die von uns verwendete Methode nicht sensitiv genug war, um diese nachweisen zu können.

In einer Übersichtsarbeit beschrieben Sussman *et al.*, dass eine Überexpression von AKT1 zu einem erhöhten Kalziumeinstrom, sowie einer gesteigerten SERCA2a-Aktivität führen kann [66]. In einem experimentellen Modell für Kardiomyopathie, bei dem die AKT1-Aktivität reduziert war, zeigte sich eine herabgesetzte Phosphorylierung von SERCA2a, des Natrium-Kalzium-Austauschers sowie von PLN [67]. Eine weitere Studie demonstrierte, dass aktiviertes AKT PLN an Threonin 17 phosphoryliert, und somit verantwortlich für die Steigerung der Kontraktilität ist, ohne Stimulation der Hypertrophie [68]. Hierbei schlagen die Autoren einen Mechanismus vor, bei welchem aktiviertes AKT ins sarkoplasmatische Retikulum transloziert, danach PLN an Threonin 17 phosphoryliert und somit die Inhibierung von SERCA2a aufhebt [68]. Diese sei wiederum verantwortlich für einen gesteigerten Kalziumkreislauf und führt zu einer Erhöhung der kardialen Kontraktilität. Eine andere Arbeitsgruppe präsentierte an isolierten Kardiomyozyten, dass infolge einer erhöhten Adenylylcyclase VI-Aktivität aktiviertes AKT PLN an Serin 16 phosphoryliert, ohne Aktivierung des β -Adrenozeptors oder der PKA [69].

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Western Blot Analysen lieferten keine eindeutigen Hinweise als Erklärung für die Diskrepanz der funktionellen Ergebnisse zwischen AKT1/2-KO und Wildtyp Herzen. Die Literaturrecherche deutete auf eine Interaktion des PI3K/AKT-Signalweges mit

den Proteinen des Kalziumhaushaltes hin. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Ursache der funktionellen Unterschiede zu erforschen, hierbei wären Essays für Kinaseaktivität oder Versuche an isolierten Kardiomyozyten mit Messung des Kalziumtransienten und der Proteine, die in der Kalziumhomöostase eine wichtige Rolle spielen, einige mögliche Ansätze.

Die molekularen Mechanismen, die den *Crosstalk* zwischen den zwei Signalwegen: PI3K/AKT-Signalweg und β -Adrenozeptor-Signalweg ermöglichen, bleiben unvollständig verstanden. In Folgeprojekten muss nun geklärt werden, welche Signalwege und Proteine für den genannten Effekt verantwortlich sind.

4.4 Schlussfolgerung

Insulin allein beeinflusst die kardiale Funktion und die β -adrenerg-vermittelte Kontraktilitätssteigerung nicht. Der kardiomyozytäre Verlust von AKT1 und AKT2 beeinträchtigt die Herzfunktion. Darüber hinaus verbessert Insulin die Herzfunktion bei AKT1/2-KO und AKT1-KO und AKT2-KO Mäusen, was auf eine regulatorische Rolle von Insulin in der kardialen Kontraktilität über eine durch den Verlust von AKT oder gar AKT-unabhängig vermittelte Signalübertragung hindeutet. Die Ursache für diese Veränderungen konnte im Rahmen der vorliegenden Dissertation nicht aufgeklärt werden.

Insgesamt bieten unsere und die publizierten Befunde einen Hinweis auf alternative Insulin-Signalwege, die insbesondere bei pathologischen Zuständen wie AKT-Defizienz eine kompensatorische Rolle einnehmen könnten. Diese Erkenntnisse könnten insbesondere für das Verständnis insulinabhängiger kardialer Mechanismen bei Diabetes mellitus und Herzinsuffizienz von klinischer Relevanz sein.

Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Gödecke, A., J. Schrader, and M. Kelm, *Elektrophysiologische Grundlagen*, in *Physiologie*, H.-C. Pape, A. Kurtz, and S. Silbernagl, Editors. 2023, Thieme.
2. Gödecke, A., J. Schrader, and M. Kelm, *Elektromechanische Kopplung*, in *Physiologie*, H.-C. Pape, A. Kurtz, and S. Silbernagl, Editors. 2023, Thieme.
3. Bers, D.M., *Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes*. Annu Rev Physiol, 2008. **70**: p. 23-49.
4. Mattiazzi, A., et al., *Role of phospholamban phosphorylation on Thr17 in cardiac physiological and pathological conditions*. Cardiovasc Res, 2005. **68**(3): p. 366-75.
5. Thomas, D.D., et al., *Direct spectroscopic detection of molecular dynamics and interactions of the calcium pump and phospholamban*. Ann N Y Acad Sci, 1998. **853**: p. 186-94.
6. Gödecke, A., J. Schrader, and M. Kelm, *Das Herz*, in *Physiologie*, H.-C. Pape, A. Kurtz, and S. Silbernagl, Editors. 2023, Thieme.
7. Bockus, L.B. and K.M. Humphries, *cAMP-dependent Protein Kinase (PKA) Signaling Is Impaired in the Diabetic Heart*. J Biol Chem, 2015. **290**(49): p. 29250-8.
8. Kranias, E.G. and R.J. Hajjar, *Modulation of cardiac contractility by the phospholamban/SERCA2a regulatome*. Circ Res, 2012. **110**(12): p. 1646-60.
9. Kentish, J.C., et al., *Phosphorylation of troponin I by protein kinase A accelerates relaxation and crossbridge cycle kinetics in mouse ventricular muscle*. Circ Res, 2001. **88**(10): p. 1059-65.
10. Salazar, N.C., J. Chen, and H.A. Rockman, *Cardiac GPCRs: GPCR signaling in healthy and failing hearts*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1768**(4): p. 1006-18.
11. Mangmool, S., et al., *beta-Adrenergic Receptor and Insulin Resistance in the Heart*. Biomol Ther (Seoul), 2017. **25**(1): p. 44-56.
12. Alessi, D.R., et al., *Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha*. Curr Biol, 1997. **7**(4): p. 261-9.
13. Sarbassov, D.D., et al., *Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex*. Science, 2005. **307**(5712): p. 1098-101.
14. Stambolic, V., et al., *Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN*. Cell, 1998. **95**(1): p. 29-39.
15. Cazzolli, R., et al., *A role for protein phosphatase 2A-like activity, but not atypical protein kinase Czeta, in the inhibition of protein kinase B/Akt and glycogen synthesis by palmitate*. Diabetes, 2001. **50**(10): p. 2210-8.
16. Gao, T., F. Furnari, and A.C. Newton, *PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth*. Mol Cell, 2005. **18**(1): p. 13-24.
17. Abel, E.D., *Glucose transport in the heart*. Front Biosci, 2004. **9**: p. 201-15.
18. Cross, D.A., et al., *Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B*. Nature, 1995. **378**(6559): p. 785-9.
19. Embi, N., D.B. Rylatt, and P. Cohen, *Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase*. Eur J Biochem, 1980. **107**(2): p. 519-27.
20. Grimes, C.A. and R.S. Jope, *The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling*. Prog Neurobiol, 2001. **65**(4): p. 391-426.
21. Boulton, T.G., et al., *ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF*. Cell, 1991. **65**(4): p. 663-75.
22. Jones, P.F., et al., *Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(10): p. 4171-5.
23. Coffey, P.J. and J.R. Woodgett, *Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families*. Eur J Biochem, 1991. **201**(2): p. 475-81.

24. Bellacosa, A., et al., *A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region*. Science, 1991. **254**(5029): p. 274-7.
25. Chen, W.S., et al., *Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene*. Genes Dev, 2001. **15**(17): p. 2203-8.
26. Cho, H., et al., *Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta)*. Science, 2001. **292**(5522): p. 1728-31.
27. Tschopp, O., et al., *Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis*. Development, 2005. **132**(13): p. 2943-54.
28. Easton, R.M., et al., *Role for Akt3/protein kinase Bgamma in attainment of normal brain size*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(5): p. 1869-78.
29. Peng, X.D., et al., *Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2*. Genes Dev, 2003. **17**(11): p. 1352-65.
30. DeBosch, B., et al., *Akt1 is required for physiological cardiac growth*. Circulation, 2006. **113**(17): p. 2097-104.
31. DeBosch, B., et al., *Akt2 regulates cardiac metabolism and cardiomyocyte survival*. J Biol Chem, 2006. **281**(43): p. 32841-51.
32. Brownsey, R.W., A.N. Boone, and M.F. Allard, *Actions of insulin on the mammalian heart: metabolism, pathology and biochemical mechanisms*. Cardiovasc Res, 1997. **34**(1): p. 3-24.
33. Cade, W.T., *Diabetes-related microvascular and macrovascular diseases in the physical therapy setting*. Phys Ther, 2008. **88**(11): p. 1322-35.
34. Falcao-Pires, I. and A.F. Leite-Moreira, *Diabetic cardiomyopathy: understanding the molecular and cellular basis to progress in diagnosis and treatment*. Heart Fail Rev, 2012. **17**(3): p. 325-44.
35. Yu, C.M., et al., *Progression of systolic abnormalities in patients with "isolated" diastolic heart failure and diastolic dysfunction*. Circulation, 2002. **105**(10): p. 1195-201.
36. Shimizu, M., et al., *Collagen remodelling in myocardia of patients with diabetes*. J Clin Pathol, 1993. **46**(1): p. 32-6.
37. Devereux, R.B., et al., *Impact of diabetes on cardiac structure and function: the strong heart study*. Circulation, 2000. **101**(19): p. 2271-6.
38. Duerr, R.L., et al., *Insulin-like growth factor-1 enhances ventricular hypertrophy and function during the onset of experimental cardiac failure*. J Clin Invest, 1995. **95**(2): p. 619-27.
39. Huynh, K., et al., *Cardiac-specific IGF-1 receptor transgenic expression protects against cardiac fibrosis and diastolic dysfunction in a mouse model of diabetic cardiomyopathy*. Diabetes, 2010. **59**(6): p. 1512-20.
40. Ritchie, R.H., et al., *Enhanced phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) activity prevents diabetes-induced cardiomyopathy and superoxide generation in a mouse model of diabetes*. Diabetologia, 2012. **55**(12): p. 3369-81.
41. Ginsberg, H.N., *Insulin resistance and cardiovascular disease*. J Clin Invest, 2000. **106**(4): p. 453-8.
42. Nichols, G.A., et al., *The incidence of congestive heart failure in type 2 diabetes: an update*. Diabetes Care, 2004. **27**(8): p. 1879-84.
43. Fu, Q., et al., *Insulin inhibits cardiac contractility by inducing a Gi-biased beta2-adrenergic signaling in hearts*. Diabetes, 2014. **63**(8): p. 2676-89.
44. Steinhorn, B., et al., *Insulin-dependent metabolic and inotropic responses in the heart are modulated by hydrogen peroxide from NADPH-oxidase isoforms NOX2 and NOX4*. Free Radic Biol Med, 2017. **113**: p. 16-25.
45. Aroor, A.R., C.H. Mandavia, and J.R. Sowers, *Insulin resistance and heart failure: molecular mechanisms*. Heart Fail Clin, 2012. **8**(4): p. 609-17.
46. Reinartz, M., et al., *AKT1 and AKT2 induce distinct phosphorylation patterns in HL-1 cardiac myocytes*. J Proteome Res, 2014. **13**(10): p. 4232-45.

47. Raupach, A., *Isoform-spezifische Funktionen der Proteinkinase Akt in Kardiomyozyten (Dissertation)*, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2011. urn:nbn:de:hbz:061-20110120-115532-9: p. 35-40.
48. Sternberg, N. and D. Hamilton, *Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites*. J Mol Biol, 1981. **150**(4): p. 467-86.
49. Hoess, R.H., M. Ziese, and N. Sternberg, *P1 site-specific recombination: nucleotide sequence of the recombining sites*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(11): p. 3398-402.
50. Minamino, T., et al., *Inducible gene targeting in postnatal myocardium by cardiac-specific expression of a hormone-activated Cre fusion protein*. Circ Res, 2001. **88**(6): p. 587-92.
51. Littlewood, T.D., et al., *A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins*. Nucleic Acids Res, 1995. **23**(10): p. 1686-90.
52. Sohal, D.S., et al., *Temporally regulated and tissue-specific gene manipulations in the adult and embryonic heart using a tamoxifen-inducible Cre protein*. Circ Res, 2001. **89**(1): p. 20-5.
53. Bell, R.M., M.M. Mocanu, and D.M. Yellon, *Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion*. J Mol Cell Cardiol, 2011. **50**(6): p. 940-50.
54. Bauer, M., et al., *Echocardiographic speckle-tracking based strain imaging for rapid cardiovascular phenotyping in mice*. Circ Res, 2011. **108**(8): p. 908-16.
55. Blessberger, H. and T. Binder, *NON-invasive imaging: Two dimensional speckle tracking echocardiography: basic principles*. Heart, 2010. **96**(9): p. 716-22.
56. Bertrand, L., et al., *Insulin signalling in the heart*. Cardiovasc Res, 2008. **79**(2): p. 238-48.
57. Manning, B.D. and L.C. Cantley, *AKT/PKB signaling: navigating downstream*. Cell, 2007. **129**(7): p. 1261-74.
58. Jia, G., V.G. DeMarco, and J.R. Sowers, *Insulin resistance and hyperinsulinaemia in diabetic cardiomyopathy*. Nat Rev Endocrinol, 2016. **12**(3): p. 144-53.
59. Graves, B.M., et al., *Phosphoinositide-3-kinase/akt - dependent signaling is required for maintenance of [Ca(2+)](i), I(Ca), and Ca(2+) transients in HL-1 cardiomyocytes*. J Biomed Sci, 2012. **19**(1): p. 59.
60. Catalucci, D. and G. Condorelli, *Effects of Akt on cardiac myocytes: location counts*. Circ Res, 2006. **99**(4): p. 339-41.
61. Sies, H., *Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress*. Redox Biol, 2017. **11**: p. 613-619.
62. Kuroda, J. and J. Sadoshima, *NADPH oxidase and cardiac failure*. J Cardiovasc Transl Res, 2010. **3**(4): p. 314-20.
63. Vasquez, C., N. Benamer, and G.E. Morley, *The cardiac fibroblast: functional and electrophysiological considerations in healthy and diseased hearts*. J Cardiovasc Pharmacol, 2011. **57**(4): p. 380-8.
64. Eyster, C.A., et al., *Diabetes induced decreases in PKA signaling in cardiomyocytes: The role of insulin*. PLoS One, 2020. **15**(8): p. e0231806.
65. Hagemann, D. and R.P. Xiao, *Dual site phospholamban phosphorylation and its physiological relevance in the heart*. Trends Cardiovasc Med, 2002. **12**(2): p. 51-6.
66. Sussman, M.A., et al., *Myocardial AKT: the omnipresent nexus*. Physiol Rev, 2011. **91**(3): p. 1023-70.
67. Duan, J., et al., *Impaired cardiac function and IGF-I response in myocytes from calmodulin-diabetic mice: role of Akt and RhoA*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003. **284**(2): p. E366-76.
68. Catalucci, D., et al., *Akt increases sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ cycling by direct phosphorylation of phospholamban at Thr17*. J Biol Chem, 2009. **284**(41): p. 28180-28187.
69. Gao, M.H., et al., *Adenylyl cyclase type VI increases Akt activity and phospholamban phosphorylation in cardiac myocytes*. J Biol Chem, 2008. **283**(48): p. 33527-35.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. rer. nat. Axel Gödecke für die Möglichkeit, meine Dissertation in seinem Institut anfertigen zu dürfen und für sein entgegengebrachtes Vertrauen, stets konstruktive Kritik und intensive Förderung.

Herrn Prof. Dr. Dr. med. André Heinen, meinem Doktorvater, danke ich herzlich für die engagierte Betreuung und Begleitung meiner Arbeit an diesem Thema. Seine Geduld und seine Vision, ebenso wie sein Mentorship haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Darüber hinaus möchte ich mich beim ganzen Team des Instituts für Herz- und Kreislaufphysiologie bedanken. Ich danke insbesondere Julia Albrecht, Dr. rer. nat. Stefanie Gödecke, Susanne Küsters und Dr. rer. nat. Rianne Nederlof für die große Unterstützung bei der Planung und Durchführung von Experimenten, die freundliche Zusammenarbeit, die Hilfsbereitschaft und die gute Arbeitsatmosphäre.

Insbesondere möchte ich mich bei Herr Prof. Dr. med. Joachim Schmitt, meinem Co-Betreuer, und Dr. rer. nat. Florian Funk vom Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf für die tatkräftige Hilfe bei der Planung und Durchführung von weiteren Experimenten ausdrücklich bedanken.

Mein Dank gilt zudem dem Internationalen Graduiertenkolleg IRTG1902, in dessen Rahmen ich als Mitglied interdisziplinären Austausch, wertvolle Unterstützung und weiterführende Anregungen für meine Arbeit erfahren durfte. Danke an Dr. Sandra Berger und Janett Schindler für die großartige Organisation und die freundliche Zusammenarbeit.

Mein tief empfundener Dank gilt schließlich meiner Familie und meinen Freunden für ihre stetige Unterstützung, ihr Verständnis und ihren Rückhalt während der gesamten Promotionszeit.