

**Untersuchungen zur insulinabhängigen
kardialen Glucoseaufnahme:
Regulation der GLUT4-Umverteilung**

Inaugural-Dissertation

zur

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

vorgelegt von

Olaf Dransfeld

aus Moers

2001

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

Internetlink: <http://www.ulb.uni-duesseldorf.de/diss/mathnat/2001/dransfeld.html>

Referent: Prof. Dr. Jürgen Eckel

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Frank Wunderlich

Tag der mündlichen Prüfung: 04.07.2001

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	1
II.	Materialien und Methoden	12
	I. Materialien	12
2.1	Chemikalien	12
2.2	Radioisotope	13
2.3	Antikörper	13
	II. Methoden	16
2.4	Gentechnische Methoden	16
2.4.1	Transformation und Plasmidamplifikation in E.coli-Bakterien	16
2.4.2	Reinigung von Plasmid-DNA	16
2.4.3	Plasmididentifikation durch Restriktion und Gelelektrophorese	17
2.5	Kultivierung kardialer H9K6-Myoblasten und Klonselktion	18
2.6	Etablierung einer geeigneten Transfektionstechnik	19
2.7	Isolierung adulter ventrikulärer Kardiomyozyten	19
2.8	Kultivierung isolierter Kardiomyozyten	21
2.9	Aufschluß und subzelluläre Fraktionierung des Ventrikelgewebes	21
2.10	Solubilisierung kardialer Zellen	22
2.11	Immunopräzipitation von IRS-1 und IRS-2	23
2.12	Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen	23
2.13	Proteinbestimmung	24
2.13.1	nach Bio-Rad	24
2.13.2	nach Pierce	24
2.14	Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen	25
2.15	Transfer der Proteine auf Membranen	25
2.16	Färbetechniken	26
2.16.1	Coomassie-Blau –Technik	26
2.16.2	Indian Ink –Technik	27
2.16.3	Ponceau S –Technik	27
2.17	Immunodetektion	27
2.17.1	mit ¹²⁵ I-Protein A	27
2.17.2	mit verstärkter Chemilumineszenz	28
2.18	Strippen von Blotmembranen	28

2.19	Immunfluoreszenzfärbung kultivierter Kardiomyozyten	29
2.20	Konfokale Lasermikroskopie	29
2.21	Messung des 2-Deoxyglucose Transportes	30
2.22	Messung des 3-O-Methylglucose Transportes	30
2.23	Extraktion von Phospholipiden	31
2.24	Bestimmung des 12(S)-HETE-Gehaltes	32
2.25	Berechnung und Statistik	32
III.	Ergebnisse	33
3.1	Regulation der subzellulären Verteilung von GLUT4 durch die Ras-homologe GTPase Rab4A	33
3.1.1	Charakterisierung einer insulin sensitiven Herzmuskel-Zelllinie mit stabiler GLUT4-Überexpression	33
3.1.2	Etablierung einer adäquaten Transfektionstechnik an H9K6-Myoblasten	37
3.1.3	Einfluß von Rab4A auf die insulinregulierte Glucoseaufnahme und GLUT4-Umverteilung in H9K6-Myoblasten	41
3.2	Regulation der subzellulären Verteilung von GLUT4 durch Metaboliten der 12-Lipoxygenase	47
3.2.1	Einfluß des F-Actincytoskelettes auf die Regulation der kardialen insulininduzierten GLUT4-Umverteilung	47
3.2.2	Charakterisierung der kardialen 12-LO und ihr Einfluß auf die Organisation des F-Actincytoskelettes	50
3.2.3	Einfluß von Metaboliten der kardialen 12-LO auf die Regulation der basalen und insulinregulierten Glucoseaufnahme	55
3.2.4	Einfluß von Metaboliten der kardialen 12-LO auf die Regulation der insulinabhängigen GLUT4-Umverteilung	61

IV. Diskussion	63
3.3 Charakterisierung neonataler kardialer H9K6-Myoblasten mit stabiler GLUT4-Expression	63
3.4 Bedeutung von Rab4A für die Regulation der kardialen Glucoseaufnahme	64
3.5 Die Regulation des GLUT4-Vesikel-Trafficking durch Rab-GTPasen	68
3.6 Bedeutung von Rab-GTPasen für die insulinvermittelte Reorganisation des Actinnetzwerkes	69
3.7 Bedeutung des Actinnetzwerkes für die GLUT4-Translokation	70
3.8 Bedeutung von Metaboliten der 12-Lipoxygenase für die Organisation von Actinfilamenten	72
3.9 Bedeutung der 12-Lipoxygenasereaktion für die Regulation der kardialen Glucoseaufnahme	75
V. Zusammenfassung	79
VI. Literatur	81
VII. Anhang	114
7.1 Verwendete Abkürzungen	114
7.2 Verzeichnis der Abbildungen	116

I. Einleitung

In Säugetieren wird die Koordination von Stoffwechselprozessen verschiedener Organe und Gewebe durch zwei unterschiedliche Systeme gewährleistet. Einerseits steht das neuronale System zur Verfügung, welches durch Auslösung elektrochemischer Signale entlang der Nervenbahnen seine Wirkung auf die peripheren Organe und Gewebe vermittelt. Andererseits wird die Homöostase vieler Stoffwechselfaktoren durch chemische Mediatoren, die Hormone, aufrechterhalten. Entweder erreichen diese ihre Zielgewebe durch die Blutbahn entfernt vom Bildungsort (endokrine Sekretion), oder sie entfalten eine lokale Wirkung in dem Bildungsort eng benachbarten oder identischen Geweben (parakrine Sekretion). Nach ihrer chemischen Struktur werden Hormone in vier Klassen unterteilt. Die zellpermeablen Steroidhormone und die Aminosäurederivate stellen zwei eigenständige Hormonklassen dar. Eine dritte Klasse parakrin wirkender hormoneller Mediatoren geht von der Arachidonsäure aus, sie wurde erst in jüngerer Zeit entdeckt. Die durch Aktivierung der Phospholipase A₂ aus Membranlipiden gebildete Arachidonsäure wird zum einen über den Cyclooxygenaseweg zu Thromboxanen und Prostaglandinen aufgespalten, zum anderen werden über den Lipoxigenaseweg die Eicosanoide gebildet, die in Leukotriene und Hydroperoxide aufgeteilt werden. Die vierte Hormonklasse wird von den endokrin wirkenden Peptid- oder Proteohormonen repräsentiert, die zunächst meist als nichtaktiver Vorläufer synthetisiert werden. Dieser wird posttranslational prozessiert und es entsteht durch Abspaltung einer Teilsequenz das eigentlich biologisch wirksame Hormon.

Zu dieser Hormonklasse gehört das 1922 zuerst beschriebene Polypeptidhormon Insulin (5,8 kDa), welches als Präproinsulin von den β -Zellen des Pancreas gebildet wird (Banting et al., 1922). Insulin wird durch parasymphatische Stimulation oder als Antwort auf eine Erhöhung des Blutzuckerspiegels vom Pancreas ins Blut sezerniert und spielt dort eine zentrale Schlüsselrolle als anaboler Gegenspieler der katabolen Hormone Adrenalin und Glucagon. Es hemmt die hepatische Gluconeogenese und fördert in der Leber und im Skelett- und Herzmuskel die Glykogensynthese, weiterhin induziert es eine in Abhängigkeit vom Gewebetyp 10 bis 20fache Steigerung der Glucoseaufnahme im Muskel- und Fettgewebe. Die hieraus resultierende rasche Erniedrigung des Blutglucosespiegels stellt eine der entscheidenden kurzzeitigen

Insulinwirkungen dar, wodurch dieses Hormon eine zentrale Stellung in der Regulation der Homöostase des Glucosetoffwechsels einnimmt.

Der Glucosetransport durch die Plasmamembran stellt unter normalen physiologischen Bedingungen den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der zellulären Glucosenutzung dar (Ziel et al., 1988; Furler et al., 1991) und wird dadurch zu einem wichtigen Angriffspunkt der Regulation des Glucosetoffwechsels (Morgan et al., 1961; Clausen, 1975). Dieser initiale Transportvorgang durch die für Saccharide undurchlässige Plasmamembran wird in Säugetieren von einer Gruppe strukturell verwandter Proteine mit einer Masse von 43 bis 50 kDa koordiniert. Diese Glucosetransporter (GLUT's) sind mithilfe von 12 Transmembranhelices in der Plasmamembran verankert und ermöglichen so der Glucose mittels erleichterter Diffusion den Eintritt ins Cytoplasma (Gould & Bell, 1990; Gould & Holman, 1993). In dieser Hinsicht unterscheiden sie sich von den im Dünndarm und der Niere vorkommenden Na^+ -abhängigen Glucosetransportern (SGLT1 & SGLT2), welche aktiv gegen den Gradienten Glucose und Na^+ unter Energieverbrauch cotransportieren (Wright et al., 1994; Lee et al., 1994; Yoshida, 1995). Bisher sind von der erstgenannten GLUT-Familie sieben verschiedene Isoformen (GLUT1 - GLUT7) funktionell charakterisiert worden (Gould & Bell, 1990; Gould & Holman, 1993; Zierler, 1999). Sie weisen eine hohe Sequenzhomologie auf, unterscheiden sich jedoch in ihrer Substratspezifität und dem gewebespezifischen Expressionsmuster. Erst vor kurzer Zeit wurden zwei weitere Isoformen dieser Glucosetransporter-Familie identifiziert. Die GLUT8-Sequenz weist 29% Homologie mit der Sequenz von GLUT1 auf (Doege et al., 2000 A), die GLUT9-Sequenz deckt sich mit 38% der Sequenz von GLUT1 (Phay et al., 2000; Doege et al., 2000 B). Die genaue Funktion dieser ebenfalls gewebespezifisch exprimierten Isoformen und ihre Bedeutung für die Regulation des Hexosetoffwechsels der Säugetiere bleibt aber noch genauer zu charakterisieren.

Das Fettgewebe sowie der Herz- und Skelettmuskel werden als die wichtigsten insulinsensitiven Gewebe angesehen (DeFronzo et al., 1981; Martin et al., 1999; Foster & Klip, 2000). Obschon auch GLUT5 neueren Arbeiten zufolge im Skelettmuskel gefunden wurde (Hundal et al., 1998), wirkt diese Transporterisoform dort hauptsächlich als hochaffiner Fructosetransporter und hat eine viel niedrigere

Kapazität für den Transport von Glucose (Goodyear & Kahn, 1998). Der derzeitige, in zahlreichen Untersuchungen belegte Wissensstand besagt hingegen, daß hier der Glucosetransport hauptsächlich durch die Isoformen GLUT1 und GLUT4 vermittelt wird. Die ubiquitär exprimierte Isoform GLUT1 ist schon im basalen Zustand verstärkt in der Plasmamembran lokalisiert, ihr wird als Funktion die Aufrechterhaltung der zellulären Grundversorgung mit Glucose zugeschrieben (Gould & Bell, 1990; Mueckler, 1994). Sie unterliegt keiner ausgeprägten intrazellulären Umverteilung als Antwort auf einen Insulinstimulus (Goodyear et al., 1991). Im Gegensatz hierzu konnte gezeigt werden, daß die insulininduzierte Steigerung der Glucoseaufnahme im Skelettmuskel und Fettgewebe hauptsächlich durch die Translokation der Isoform GLUT4 (James et al., 1988) von intrazellulären mikrosomalen Vesikelpools zur Plasmamembran vermittelt wird (Martin et al., 1999; Zorzano et al., 1998; Zorzano et al., 1997; Rea & James, 1997). Dieser Prozess wurde ebenfalls detailliert in kardialen Gewebe beschrieben (Eckel et al., 2000; Fischer et al., 1997). Im Verlauf des Exozytoseprozesses kann der Transporter zwar auch einen sogenannten Recycling Pathway ¹ durchlaufen (Robinson et al., 1992), der Hauptanteil der Insulinwirkung wird jedoch der Erhöhung der Exozytoserate von GLUT4 zugeschrieben (Robinson et al., 1992; Slot et al., 1991; Satoh et al., 1993). Neuere Studien, die sich mit der molekularen Regulation des GLUT4-Vesikel-Trafficking ² befassen, beschreiben eine differentielle Regulation der verschiedenen GLUT4-haltigen Kompartimente, welche offenbar durch divergente Signalmechanismen kontrolliert werden (Hashiramoto et al., 2000; Fletcher et al., 1999; Millar et al., 1999; Marsh et al., 1995). Die genauen Mechanismen, welche an der Regulation des GLUT4-Trafficking partizipieren, sind jedoch zur Zeit noch unklar.

Die Kenntnisse über die Mechanismen, welche ausgehend von der Hormonbindung auf zellulärer Ebene letztendlich zur Steigerung der Glucoseaufnahmerate führen, haben sich in den letzten Jahren entscheidend vertieft (Foster & Klip, 2000; Elmendorf & Pessin, 1999; Rea & James, 1997; Kandror & Pilch, 1996; Holman &

¹ Der Begriff Recycling Pathway steht für die endozytotische Rückführung von GLUT4 in einen endosomalen Vesikelpool, der für erneute Insulinstimulierung zur Verfügung steht. Im Deutschen existiert hierfür kein adäquater treffender Begriff.

² Der Begriff Trafficking steht für zielgerichtete Vesikeltranslokationsvorgänge, dies umfasst Exo- und Endozytosevorgänge, sowie intrazelluläre Membrantransportprozesse. Da im Deutschen kein treffender Begriff existiert, wird der englische Ausdruck verwendet.

Kasuga, 1997; White & Kahn, 1994). Die Insulinwirkung wird initiiert durch das Andocken des Hormons an hochaffine Bindungsstellen der extrazellulären α -Untereinheiten des Insulinrezeptors, welcher als ein $\alpha_2\beta_2$ -Heterodimer vorliegt (Siehe Abb.1). Durch der Bildung des Hormon-Rezeptor-Komplexes werden stereochemische Umlagerungen innerhalb des Rezeptors ausgelöst, dies führt intrazellulär zu Autophosphorylierungen der Tyrosinkinase-Domänen seiner zwei β -Untereinheiten. Die katalytisch aktiven Tyrosinkinasen phosphorylieren ihrerseits eine Reihe nachgeschalteter Proteine, von welchen bislang die Familie der Insulinrezeptorsubstrate (IRS-1 bis IRS-4), die Shc-Protein-Isoformen, Mitglieder der SIRP-Familie, Gab-1 und APS identifiziert werden konnten. Aminoterminal besitzen die IRS-Isoformen eine Pleckstrin-homologe (PH-) Domäne, weiterhin eine Phosphotyrosin-bindende (PTH-) Domäne sowie Prolin- und Serin/Threoninreiche Regionen. Zahlreiche Tyrosinreste dienen außerdem als SH2-Bindungsstellen nachgeschalteter Proteine. Der aktivierte Insulinrezeptor interagiert mit IRS über seine PTB-Domäne, was zur Phosphorylierung von Tyrosinresten innerhalb des IRS-Moleküles führt.

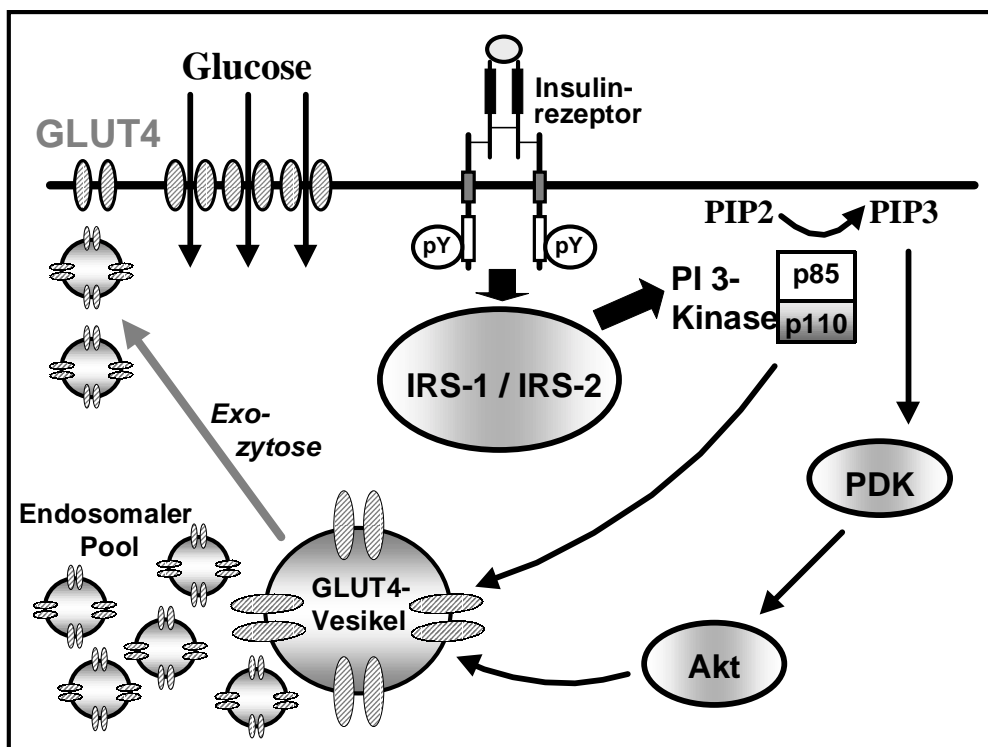


Abb. 1: Insulinsignaltransduktion und Glucoseaufnahme, modifiziert nach (Ryder et al., 2001), (Baumann & Saltiel, 2001) und (White, 1997).

Zahlreiche Untersuchungen konnten belegen, daß die Aktivierung von Isoformen der PI 3-Kinase-Familie essentiell ist für die Weiterleitung des Insulinsignals (Eckel et al., 2000; Shepherd et al., 1998; Backer et al., 1992). Diese den IRS-Isoformen nachgeschalteten Proteine bestehen aus einer katalytischen p110-Untereinheit und einer regulatorischen p85-Untereinheit. Innerhalb der regulatorischen Untereinheit liegende SH2-Domänen gehen eine Bindung mit dem tyrosinphosphorylierten Motiv des IRS-Proteins ein, was die Aktivierung der katalytischen Untereinheit zur Folge hat. Das physiologisch bedeutendste Substrat dieses Enzyms ist das Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat, das durch die p110-Aktivität zu Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphat umgesetzt wird (Vollenweider et al., 1999; Alessi & Downes, 1998). Von den Untereinheiten der PI 3-Kinase-Familie wurden bislang je drei gewebespezifisch exprimierte Klassen (p110 α , - β , - γ , bzw. p85 α , - β , - γ) beschrieben (Alessi & Downes, 1998; Shepherd et al., 1998). Jüngere Studien zeigen, daß vermutlich die p110 β eine prominente Rolle in der Weiterleitung des Insulinsignals zur Steigerung des Glucosetransportes spielt (Ozanne et al., 1997; Wang et al., 1998 A & B). Studien unserer Arbeitsgruppe an kardialem Gewebe belegen, daß die p85 α -Untereinheit die PI 3-Kinase-Aktivität zu den GLUT4-Vesikeln rekrutiert, wohingegen p85 β den Hauptregulator der via IRS-1 und IRS-2 medierten PI 3-Kinase-Aktivierung repräsentiert (Kessler et al., 2001). Die Mechanismen, welche auf der Ebene der PI 3-Kinase zur Diversifizierung des Insulinsignales und somit zu den bekannten unterschiedlichen Wirkungen des Hormons führen, werden jedoch bislang kontrovers diskutiert und bedürfen weiterhin eingehender Aufklärung. Verschiedene innerhalb der Insulinwirkung der PI 3-Kinase nachgeschaltete Effektorproteine, die ebenfalls durch Phosphorylierung aktiviert werden, konnten bislang identifiziert werden (Alessi & Downes, 1998; Kellerer et al., 1999). Hierbei handelt es sich zum einen um die Serin-Threonin-Kinase Akt (auch Proteinkinase B) (Wang et al., 1999), um die Isoformen PDK1 und PDK2 der PDK-Familie (Phospholipid-abhängige Kinase) (Kellerer et al., 1999), und um die atypischen Isoformen der PKC-Familie (Proteinkinase C) PKC α und PKC β . Zumal es auch Hinweise auf eine von der PI 3-Kinase unabhängige GLUT4-Translokation mit einhergehender Aktivierung der Akt gibt (Wang et al., 2000), ist die funktionelle Bedeutung der Aktivierung der genannten Kinasen zur Zeit noch unklar und deren Auswirkungen im Zusammenhang mit der insulininduzierten GLUT4-Translokation werden bislang in der Literatur unterschiedlich bewertet (Standaert et al., 1997;

Alessi & Downes, 1998; Kellerer et al., 1999). Neuere Untersuchungen weisen aber darauf hin, daß nicht nur die insulinstimulierte Aktivierung der PI 3-Kinase, sondern auch ihre Rekrutierung vom Cytosol zu mikrosomalen Membranfraktionen ein entscheidendes Ereignis für die Stimulation der Glucoseaufnahme darstellen könnte (Shepherd et al., 1998).

Interessanterweise konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, daß Insulin eine Assoziation von Komplexen der PI 3-Kinase mit IRS-1 an Elemente des Actin-cytoskelettes induziert (Clark et al., 1998). In Säugetieren sind bislang drei Isoformen (α -, β -, γ -Actin) dieser ubiquitär vorkommenden Proteinfamilie beschrieben worden (Cristopher & Carpenter, 2000). Es ist bekannt, daß das Actincytoskelett eine Schlüsselrolle in der Regulation vieler exo- und endozytischer Vesikel-Transportprozesse und des Membran-Trafficking ausübt (Valentijn et al., 1999; Qualmann et al., 2000; Rogers & Gelfand, 2000). Der Aufbau und die Dynamik der Actinfilamente wird hierbei offenbar entscheidend über ihre Polymerisation und Depolymerisation beeinflusst (Borisy & Svitkina, 2000; Cooper & Schafer, 2000; Chen et al., 2000). Neuere Untersuchungen (Wang et al., 1998 A) zeigen, daß Actinfilamente an der insulininduzierten Umverteilung der PI 3-Kinase zu GLUT4-haltigen Kompartimenten (Eckel et al., 2000) und damit an der Steigerung der Glucoseaufnahme partizipieren. Weiterhin wurde eine direkte Colokalisation von GLUT4 mit Actinfilamenten nach Insulinstimulation nachgewiesen (Vollenweider et al., 1999; Kao et al., 1999; Asahi et al., 1999). Außerdem fand man eine insulininduzierte Colokalisation von Actinfilamenten mit GLUT4 und auch der PI 3-Kinase (Khayat et al., 2000). Obwohl es auch Hinweise auf eine Beteiligung der Mikrotubuli an der insulinregulierten GLUT4-Translokation gibt (Wang et al., 1996; Fletcher et al., 2000; Guilherme et al., 2000), gilt es mittlerweile als akzeptiert, daß ein intaktes Actincytoskelett eine essentielle Rolle für den insulinstimulierten Anstieg der Glucoseaufnahme spielt. Zahlreiche Untersuchungen mit Inhibitoren des Actincytoskelettes bestätigen, daß eine Zerstörung oder Umorganisation des Actinnetzwerkes die GLUT4-Translokation und damit die Steigerung der Glucoseaufnahme als Reaktion auf den Insulinstimulus komplett blockiert (Tsakiridis et al., 1999; Tsakiridis et al., 1994; Omata et al., 2000). Die Modulierung der Organisation der Actinfilamente in Reaktion auf den Insulinstimulus und durch exogene Faktoren wird zur Zeit jedoch kontrovers diskutiert und ist Gegenstand aktueller

Untersuchungen (Tsakiridis et al., 1997; Zorzano et al., 1998; Martin et al., 1999; Foster & Klip, 2000).

Neuere Arbeiten belegen in diesem Zusammenhang klar eine Beteiligung sogenannter Hydroeicosatetraenoide (HETE's), Metaboliten der Lipoxygenase-reaktion, an der Regulation des Actinnetzwerkes. Es konnte gezeigt werden, daß diese eingangs genannten Eicosanoide selektive Liganden von Actinfibrillen darstellen (Kang et al., 1999; Kang & Vanderhoek, 1998). Andere Arbeitsgruppen belegten, daß 12(S)-HETE, ein Produkt der 12-LO-Isoform, eine PKC-abhängige Phosphorylierung von Actinfibrillen auslöst. Dies hat zum einen eine Erhöhung des zellulären Actingehaltes, zum anderen eine Steigerung der Polymerisationsrate von Actin zur Folge (Rice et al., 1998; Tang et al., 1994; Tang et al., 1993 A & B). Lipoxygenasen bilden eine in Säugetieren weitverzweigt vorkommende Enzymfamilie. Sie bilden Lipidperoxide, indem sie in mehrfach ungesättigte Fettsäuren, wie Arachidonsäure oder Linolsäure, stereospezifisch molekularen Sauerstoff einbauen (Funk, 1996). Multiple LO-Isoformen (wie 5-, 12-, oder 15-LO) wurden bislang in verschiedenen Geweben von Säugetieren identifiziert (Freire-Moar et al., 1995; Brash, 1999), aber die biologische Funktion und physiologische Bedeutung der meisten Isoformen bleibt bislang noch unklar (Funk, 1996; Brash, 1999; Kuhn & Thiele, 1999). Die Gruppe von Sasson zeigte in diesem Zusammenhang, daß die Lipoxygenasereaktion an der Regulation der vaskulären Glucoseaufnahme beteiligt ist (Sasson et al., 1999). Im Herzmuskel wurde vor kurzer Zeit die 12-LO Isoform identifiziert und charakterisiert (Freire-Moar et al., 1995) und ihr Metabolit 12(S)-HETE wurde in Untersuchungen an Kardiomyozyten als das hauptsächlich vorherrschende Produkt der Lipoxygenasereaktion charakterisiert (Breitbart et al., 1996). Das Vorkommen dieser LO-Isoform wurde weiterhin in unterschiedlichen Geweben von Ratte, Maus und Mensch beschrieben (Yamamoto et al., 1999; Yamamoto et al., 1997 A & B). Obwohl gezeigt wurde, daß 12(S)-HETE eine wichtige Rolle für kardioprotektive Effekte im Kontext der ischämischen Präkonditionierung spielt (Kuzuya et al., 1993; Murphy et al., 1995; Chen et al., 1999), wurde eine potentielle Beteiligung dieses Eicosanoids an der Regulation der Organisation des Actinnetzwerkes bisher nicht untersucht.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher zunächst, die Bedeutung des Actinnetzwerkes der ventrikulären Kardiomyozyten für die insulininduzierte Steigerung der Glucosaufnahme zu charakterisieren. Weiterhin sollte eine potentielle Beteiligung des Lipoxygenasestoffwechsels an der Reorganisation des Actincytoskelettes unter besonderer Berücksichtigung des Metaboliten der 12-LO-Isoform untersucht werden. Zum anderen sollte ein möglicher Einfluß dieser Faktoren auf das insulinregulierte Trafficking von GLUT4 bestimmt werden.

Obwohl die exakten Mechanismen, die zur insulinregulierten Umverteilung des GLUT4 führen, noch unklar sind, gilt es als gesichert, daß GTP-bindende Proteine an diesem Prozess beteiligt sind. So wurde gezeigt, daß GTP- γ S die Translokation von GLUT4 zur Plasmamembran in permeabilisierten Adipozyten stimuliert (Baldini et al., 1991). Unsere Arbeitsgruppe (Uphues et al., 1994) wies im Einklang mit anderen Untersuchungen an Adipozyten (Cormont et al., 1991) das Vorkommen kleiner GTP-bindender Proteine in GLUT4-enhaltenden Vesikeln aus kardialem Gewebe nach. Desweiteren wurde kürzlich demonstriert, daß GTP- γ S die exozytotische Fusion von GLUT4-Vesikeln stimuliert, während die Endozytoserate des Transporters durch das Nukleotid gehemmt wird (Shibata et al., 1995).

In Säugetierzellen ist die Rab-Familie Ras-homologer GTPasen an der Regulation des intrazellulären Vesikel-Trafficking und der Membranfusion beteiligt (Ferrara & Cushman, 1999; Gonzalez & Scheller, 1999; Chavrier & Goud, 1999; Kandror & Pilch, 1996; Novick & Brennwald, 1993; Goud & McCaffrey, 1991). Bei diesem Prozess ist der Wechsel des Guaninnukleotidstatus der GTPasen zwischen der inaktiven GDP-Form und der aktiven GTP-Form offenbar von entscheidender Bedeutung, er wird durch assoziierte Proteine wie GAP, GDI und GEF reguliert (Shisheva et al., 1997; Bortoluzzi et al., 1996; Bourne et al., 1990; Hall, 1990). Mitglieder der Rab-Familie wurden in verschiedenen Geweben in unterschiedlichen Kompartimenten innerhalb exo- und endozytotischer Transportprozesse identifiziert (Rodman & Wandinger-Ness, 2000; Jahn & Sudhof, 1999, Mohrmann & van der Sluijs, 1999), was auf spezialisierte Transportfunktionen der verschiedenen Rab-Proteine hinweist (Martinez & Goud, 1998; Zerial & Stenmark, 1993). In diesem Zusammenhang werden sie als wichtige Regulatoren der insulinregulierten GLUT4-Translokation angesehen. So wurde für Rab3-Isoformen eine Beteiligung an

exozytotischen Vesikeltransportprozessen in verschiedenen sekretorischen Geweben dokumentiert (Darchen & Goud, 2000; Martelli et al., 1995; Baldini et al., 1995).

Desweiteren wurde in Untersuchungen an Adipozyten gezeigt, daß die Isoform Rab4 mit GLUT4-Vesikeln assoziiert ist und durch Insulin von den Vesikeln ins Cytosol umverteilt wird (Cormont et al., 1993). Dieselbe Arbeitsgruppe zeigte, daß die Rab4-Überexpression eine Abnahme von GLUT4 an der Zelloberfläche auslöst (Aledo et al., 1995; Cormont et al., 1996 A). Übereinstimmende Beobachtungen wurden auch am Skelettmuskel gemacht (Sherman et al., 1996). Dies läßt den Schluß zu, daß Rab4 an der intrazellulären Sequestrierung und der Biogenese von GLUT4-Speicherkompartimenten beteiligt ist. Übereinstimmend dazu führte die Coexpression von Rab4 und GLUT4 in Oozyten zu einer verstärkten Retention von GLUT4 innerhalb dieser Zellen (Mora et al., 1997). Andere Studien ließen jedoch auch vermuten, daß Rab4 eine Komponente des Exozytoseprozesses von GLUT4 darstellt. Diese Studien an Adipozyten, in die Rab4-Antikörper, Rab4-Mutanten, oder carboxyterminale Rab4-Peptide eingeführt wurden, konnten eine Störung der insulininduzierten GLUT4-Tanslokation belegen (Shibata et al., 1996; Vollenweider et al., 1997). Kürzlich wurde eine direkte funktionelle Interaktion von Rab4 mit Syntaxin 4 nachgewiesen, welches an dem Andocken von Vesikeln an Membranen beteiligt ist (Li et al., 2001).

Neuere Studien weisen diesbezüglich klar auf einen funktionellen Zusammenhang zwischen Vertretern der Rab-GTPasen und dem Actincytoskelett hin (Schimmöller et al., 1998; Aroeti et al., 1998; Takai et al., 2001). So wurde gezeigt, daß die Überexpression von Rab3 an einer Reorganisation des F-Actincytoskelettes beteiligt ist (Sunshine et al., 2000). Einer anderen Studie zufolge korreliert das Andocken exozytotischer Vesikel an Actinfilamente mit der gleichzeitigen Dissoziation von Rab3 (Valentijn et al., 1999). Weiterhin wurde in Rab4-haltigen endosomalen hepatischen Vesikelpools eine Anreicherung von Elementen des Cytoskelettes wie Actin und Tubulin nachgewiesen (Pol et al., 1997). Es konnte immunhistochemisch eine Colokalisation von Rab4 mit dem Actinnetzwerk exokriner Gewebe nachgewiesen werden (Valentijn et al., 1997). An Adipozyten wurde schließlich eine direkte Beteiligung von Rab4 an der insulininduzierten Umorganisation der Actinfilamente

gezeigt (Vollenweider et al., 1997). Die genannten Befunde weisen auf eine neue Rolle dieser Rab-GTPasen in der Modulation des Actinnetzwerkes hin. Im Herzmuskel wurden bereits mehrere GTPasen der Rab-Familie nachgewiesen (Doucet et al., 1992).

Frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten die Beteiligung dreier Rab-GTPasen an der Regulation des GLUT4-Vesikeltransportes. Zum einen zeigte sich, daß die Isoform Rab3C insulinabhängig zur Plasmamembran transloziert wird (Uphues et al., 1995 B). Desweiteren wurde in GLUT4-haltigen Vesikeln neben der Isoform Rab4A eine weitere GTPase mit der Masse 24 kDa nachgewiesen, welche insulinabhängig zur Plasmamembran umverteilt wird. Sie wurde kürzlich von unserer Arbeitsgruppe als Rab11 identifiziert (Uphues et al., 1994; Uphues et al., 1995 A; Kessler et al., 2000). Auf der Grundlage der vorliegenden Informationen war ein weiteres Ziel dieser Arbeit daher, die GTPasen Rab4A und Rab3C in kardialen Myoblasten mit stabiler GLUT4-Expression transient zu exprimieren. Basierend auf diesem Zellmodell sollte somit eine potentielle Beteiligung dieser Rab-GTPasen an der insulinabhängigen GLUT4-Umverteilung und am insulinregulierten Glucosetransport isoliert untersucht werden.

Zusammengefaßt wird es somit als das zentrale Ziel der vorliegenden Arbeit angesehen, einen möglichen Einfluß verschiedener Faktoren auf das insulinregulierte Trafficking von GLUT4 mit besonderer Hinsicht auf seine Translokation und die daraus resultierende Steigerung der kardialen Glucosaufnahme zu untersuchen (Siehe Abb.2).

Im ersten Teil dieser Arbeit soll in einem kardialen Zellmodell mittels transienter Expression eine mögliche Beteiligung der GTPasen Rab4A oder Rab3C an der insulinabhängigen GLUT4-Umverteilung und am insulinregulierten Glucosetransport isoliert untersucht werden.

Ziel des zweiten Teiles der vorliegenden Arbeit ist es zunächst, die Bedeutung des Actinnetzwerkes der ventrikulären Kardiomyozyten für die insulininduzierte Steigerung der Glucosaufnahme zu charakterisieren. Weiterhin soll eine potentielle Beteiligung des Lipoxigenasestoffwechsels an der Reorganisation des Actincytoskelettes unter besonderer Berücksichtigung des Metaboliten der 12-LO-Isoform, und darüber hinaus ein möglicher Einfluß dieser Faktoren auf das insulinregulierte Trafficking von GLUT4 untersucht werden.

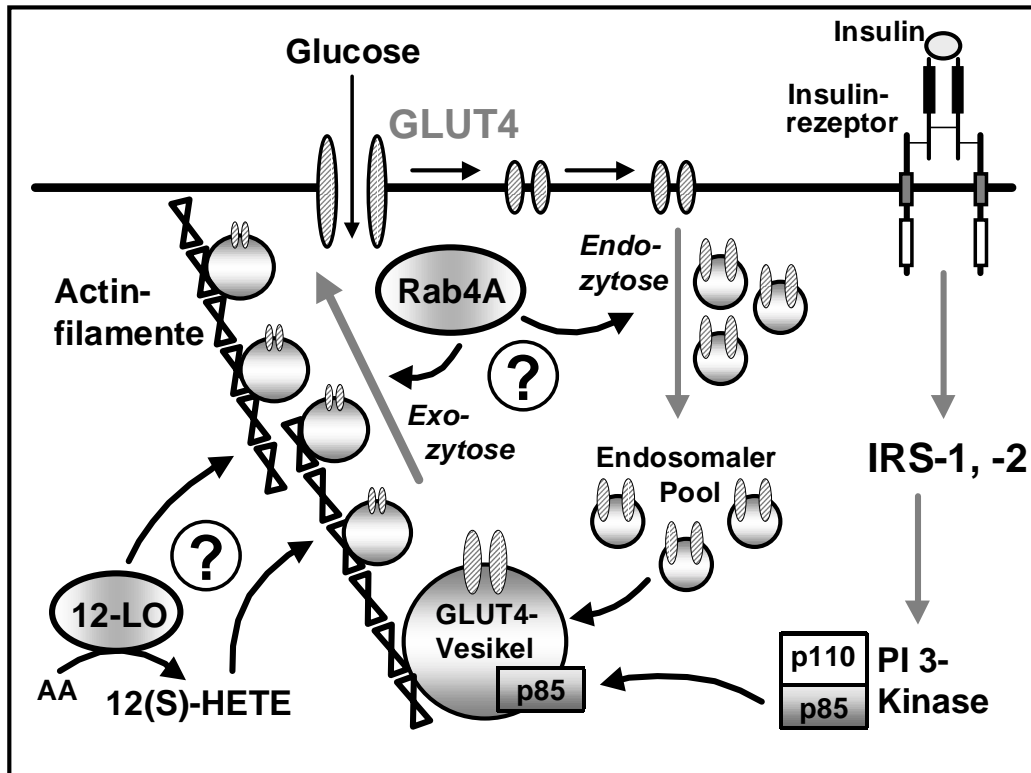


Abb. 2: Schematische Darstellung zur Regulation des GLUT4-Trafficking: Zentrale Zielsetzungen. modifiziert nach (Ryder et al., 2001), (Baumann & Saltiel, 2001) und (White, 1997).

II. Materialien

2.1 Chemikalien

Acrylamid	Amersham Pharmacia, Freiburg
N, N'-Methylenbisacrylamid	
Laminin (Maus)	Collaborative Biomedical Products, MA, USA
Bacto-Agar	Becton Dickinson, NJ, USA
Hefe-Extrakt	
Trypton	
DMEM-Medium	Life Technologies, Karlsruhe
FCS	
Geneticin (G418-Sulfat)	
Ham' s F12-Medium	
Nichtessentielle Aminosäuren	
Penicillin/Streptomycin	
Trypsin/ EDTA	
TEMED	LKB, Bromma, Schweden
Milchpulver	Neuform, Fink GmbH, Herrenberg
BSA, reinst	Behring, Marburg
BSA, Fraction V	Boehringer, Mannheim
APS	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ampicillin	
Cytochalasin B	
Cytochalasin D	
D (+) Saccharose (reinst)	
DTT	
EDTA	
EGTA	
Ethidiumbromid	
Ficoll	
HEPES	
Insulin (Hog Pancreas)	
Natriumazid	

Petroleumbenzin
PMSF
SDS
Tris
Tween 20

Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien von den oben genannten Firmen in p.a. Qualität bezogen.

2.2 Radioisotope

^{125}I -Protein A		Amersham, Braunschweig
spez. Aktivität	2000 Ci/mmol	
L-[^{14}C] -Glucose		Amersham, Braunschweig
spez. Aktivität	55 mCi/mmol	
2-Desoxy-D-[^{14}C] -Glucose		Amersham, Braunschweig
spez. Aktivität	55 mCi/mmol	
Methyl-D-[^{14}C] -Glucose		Amersham, Braunschweig
spez. Aktivität	55 mCi/mmol	

2.3 Antikörper

Anti-GLUT4	Calbiochem, Bad Soden polyklonales Kaninchen-Peptid- serum, gerichtet gegen Sequenz des C-Terminus von GLUT4 (James et al., 1989)
Anti-GLUT1	polyklonales Kaninchen-Antiserum, wurde freundlicherweise zur Verfü- gung gestellt von Prof. Sasson (Sasson et al., 1997)

Anti-Rab3C	polyklonales Kaninchen-Peptidserum, bindet am C-Terminus von Rab3C (Ratte) (Su et al., 1994)
Anti-Rab4A	Polyklonales Kaninchen-Peptidserum, Bindungsstelle: gereinigtes, rekombinantes Protein von Dr. Goud (Paris) aus Ratte
Anti-IRS-1 (Immunopräzipitation)	Polyklonales Kaninchen-Antiserum, gerichtet gegen einen rekombinanten Proteinabschnitt (AS 581-857) des IRS-1 der Ratte (Ouwens et al., 1994)
Anti-IRS-1 (Immunodetektion)	Polyklonales Kaninchen-Antiserum, gerichtet gegen einen rekombinanten (CYASINFQKQPEDRQ), C-terminalen Proteinabschnitt des IRS-1 der Ratte, (Lamphere & Lienhard, 1992), (UBI, Lake Placid, NY, USA)
Anti-IRS-2 (Immunopräzipitation)	Polyklonales Kaninchen-Antiserum, gerichtet gegen einen rekombinanten Proteinabschnitt (AS 324-1003) des IRS-2 der Ratte (Telting et al., 2001)
Anti-IRS-2 (Immunodetektion)	Polyklonales Kaninchen-Antiserum, gerichtet gegen einen rekombinanten C-terminalen Proteinabschnitt (AS 976-1094) des IRS-2 der Maus, (UBI, Lake Placid, NY, USA), (Sun et al., 1995)
Anti-p85 ^{PAN}	Polyklonales Kaninchen Anti-Ratte IgG, gegen ein GST-Fusionsprotein der ges. p85-Untereinheit des IRS-1 gerichtet, (Skolnik et al., 1991) (UBI, Lake Placid, NY, USA)
Anti-Phospho-Tyrosin	Anti-Phosphotyrosin (pY) - RC20 IgG, HRPO-gekoppelt, gerichtet gegen rekombinantes Peptid, (Fixman et al., 1996), (Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA)

Anti-12-LO	Polyklonales Kaninchen-Antiserum, gerichtet gegen einen rekombinanten Proteinabschnitt der Platelet-Isoform der 12-Lipoxygenase des Menschen (Cayman Chemical, MI, USA), (Yoshimoto et al., 1990)
Anti-Phospho-Akt	Polyklonales Kaninchen-Antiserum, gerichtet gegen ein KLH-gekoppeltes synthetisches Phospho-Thr308-Peptid (UBI, Lake Placid, NY, USA), (Burgering & Coffey, 1995)
Anti-Akt	Polyklonales Kaninchen-Antiserum, gerichtet gegen ein KLH-gekoppeltes synthetisches Peptid (AS 466-479) der Maus (UBI, Lake Placid, NY, USA), (Burgering & Coffey, 1995)

II. Methoden

2.4 Gentechnische Methoden

2.4.1 Transformation und Plasmid-Amplifikation in E.coli-Bakterien

Hierzu wurden zunächst 100 µl chemisch kompetente E.coli-Bakterien des Stammes DH5α schonend auf Eis aufgetaut (Hanahan, 1983). Diese wurden mit 50 µl TCM-Puffer (10 mM Tris; 10 mM MgCl₂; 10 mM CaCl₂; pH 7,5) und 1 ng reiner Plasmid-DNA gemischt. Nach Inkubation auf Eis für 30 min wurden die Bakterien für 90 sec einem Hitzeschock bei genau 42° C ausgesetzt, was zur verstärkten Aufnahme der DNA führt, und für 2 min auf Eis abgekühlt. Die transformierten Bakterien wurden in 1 ml LB-Medium (1% (w/v) Trypton; 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt; 1% (w/v) NaCl; pH 7,4) verdünnt und für 1 h bei RT inkubiert. In diesem Zeitraum regenerieren sich die Bakterien und synthetisierten die von pCMV kodierte, zur Resistenz notwendige β-Lactamase. Sie wurden anschließend für 1 min bei 12.000 x g abzentrifugiert, 700 µl des Überstandes wurden verworfen. Das Bakterien-Pellet wurde in den verbleibenden 450 µl resuspendiert, zur Antibiotika-Selektion wurden je 200 µl Suspension auf einer LB-Agar-Platte (1,5% (w/v) Bacto-Agar; DIFCO, Detroit, MI, USA) mit 100 µg/ml Ampicillin ausgestrichen und für 16 h im Brutschrank (37° C, 5% CO₂) inkubiert. Es wurde zunächst ein definierter Klon von der LB/Amp⁺-Platte selektiert, in 5 ml Ampicillin-haltiges LB-Medium überführt und für ca. 9 h bis zur Sättigung bei 37° C und 220 upm inkubiert. Diese Vorkultur wurde 1:100 verdünnt und über Nacht für 16 h unter obigen Bedingungen bis zu einer Zelldichte von 1x10⁹ Zellen/ml amplifiziert, was einer OD₆₀₀/ml von 1,0 - 1,5 entsprach.

2.4.2 Reinigung der Plasmid-DNA

Um eine hohe Transfektionsrate zu erzielen, erfolgte die Reinigung der Plasmid-DNA mit Hilfe des Plasmid Midi Kit 50 (Qiagen, Hilden), dessen möglicher Reinheitsgrad mit dem einer Cäsiumchlorid-Dichtegradienten-Zentrifugation gut vergleichbar ist. Hiermit konnten 400-800 µg reine DNA pro Säule isoliert werden. Zur Isolation der synthetisierten Plasmid-DNA wurde die Bakterien-Suspension zunächst bei 4° C und 6.000 x g für 15 min abzentrifugiert, der klare Medium-Überstand wurde verworfen.

Das Pellet wurde gleichmäßig in 10 ml P1-Puffer (50 mM Tris/HCl; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A; pH 8,0) resuspendiert, zur alkalischen Lyse wurden die Bakterien mit 10 ml P2-Puffer (200 mM NaOH; 1% (w/v) SDS) gemischt, kurz resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Zur Neutralisierung und Fällung der genomischen DNA wurde das Lysat mit eiskaltem P3-Puffer (3 M K-acetat; pH 5,5) vermischt und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden für 30 min bei 4° C und 30.000 x g die unlöslichen Zellbestandteile abzentrifugiert. Der Überstand (Vollhomogenat) wurde filtriert und das Filtrat über eine mit QBT-Puffer (750 mM NaCl; 50 mM MOPS; 15% (v/v) Ethanol; pH 7,0) äquilibrierte Qiagen-100-Säule gegeben. Die hydrophile Matrix dieser Anionen-Austauscher-Säule bindet spezifisch negativ geladene, niedermolekulare DNA-Moleküle, deren Masse nicht in der Größenordnung genomischer DNA liegt. Andere Zellbestandteile, besonders RNA und Proteine, können nicht gebunden werden und durchlaufen die Säule. Die Säule wurde nun 2 x mit je 30 ml QC-Puffer (1 M NaCl; 50 mM MOPS; 15% (v/v) Ethanol; pH 7,0) gewaschen, schließlich wurde die Plasmid-DNA mit 15 ml QF-Puffer (1,25 M NaCl; 50 mM Tris/HCl; 15% (v/v) Ethanol; pH 8,5) eluiert. Zur Präzipitation der DNA wurde das Eluat mit 10,5 ml Isopropanol bei RT gemischt und für 30 min bei 4° C und 15.000 x g abzentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und erneut abzentrifugiert. Nach Dekantierung des Überstandes wurde die an der Luft getrocknete DNA in 200 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0) gelöst und bei -20° C gelagert.

2.4.3 Plasmididentifikation durch Restriktion und Gelelektrophorese

Zur Bestimmung der Konzentration, Qualität und Reinheit der Plasmid-DNA wurde ihre Extinktion über einen Wellenlängenbereich von 200-340 nm gemessen und der Quotient $OD^{260nm}/_{280nm}$ berechnet. Ein Wert von 1,8 bis 2,0 zeigt reine, kontaminationsfreie DNA an. Die doppelsträngige Plasmid-DNA ließ sich gezielt spalten mit Hilfe von Restriktionsenzymen, welche spezifische Sequenzen der Plasmid-DNA erkennen und an definierten Stellen schneiden. Hier wurde der Expressionsvektor pCMV mit EcoRI (Boehringer, Mannheim) geschnitten, für welches 2 Schnittstellen vorkommen. Dazu wurden 0,2 - 1,0 µg DNA und 1-2 Units EcoRI pro µg DNA gemischt. Dieser Reaktionsansatz inkubierte für 1 h in H-Puffer (0,5 M Tris/HCl; 100

mM MgCl₂; 1 mM NaCl; 10 mM DTE; pH 7,5; Boehringer, Mannheim) bei 37° C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 mM EDTA (pH 8,0) gestoppt. Die Plasmid-Fragmente wurden mit 6x-DNA-Ladungspuffer (0,25% (w/v) Bromphenolblau; 0,25% (w/v) Xylen Cyanol FF; 15% (v/v) in H₂O) gemischt und in einem 0,8%igen Agarosegel mit TBE (90 mM Tris; 90 mM Borat; 2 mM EDTA; pH 8,0) als Gel- und Elektrophoresepuffer aufgetrennt. Die DNA wurde mit 0,5 µg/ml Laufpuffer Ethidiumbromid markiert. Die gelelektrophoretische Auftrennung der Fragmente erfolgte bei 70 V und 45 mA (Gelkammer-Typ GNA 100).

2.5 Kultivierung kardialer H9K6-Myoblasten und Klonselktion

Als Zellsystem dienten aus embryonalem Rattenherzmuskelgewebe (*Rattus norvegicus*) gewonnene adhärenente H9c2-Myoblasten (American Type Culture Collection, CRL-1446; Manassas, MA, USA), die in Kultur bei Konfluenz zu multinukleären Myotuben fusionieren. Zur Herstellung von H9c2-Zellen mit stabiler GLUT4-Überexpression wurde GLUT4-cDNA in den Expressionsvektor pCMV subkloniert, welcher einen SV40-Replikationsursprung, einen Cytomegalievirus-Promotor und eine Polyadenylierungsstelle besitzt (Schürmann et al., 1992). Die H9c2-Myoblasten wurden ausgesät und nach der Calciumphosphat-Methode (Graham & van der Eb, 1973) mit pCMV-GLUT4 transfiziert, wie zuvor näher beschrieben (Dransfeld et al., 2000). Stabile Transfektanden wurden in DMEM-Medium (5,5 mM Glucose; 10% (v/v) FCS; 1% (v/v) NEAA; 100µg/ml Streptomycin; 100 U/ml Penicillin; Gibco, Berlin) mit 0,8 mg/ml Geneticin (G418; Gibco, Berlin) nach 35 Tagen selektiert und Klone mit stabiler GLUT4-Überexpression per Immunoblot-Analyse ausgewählt. Einer der erhaltenen Subklone mit moderater GLUT4-Überexpression, desweiteren H9K6 genannt, wurde für nachfolgende Untersuchungen weiterverwendet. Die H9K6-Myoblasten wurden anschließend in DMEM-Medium mit 0,6 mg/ml G418 kultiviert. Zur Subkultivierung kontinuierlicher Passagen (<15) wurden ca. 7 Tage nach Aussat 60 - 70% konfluente Myoblasten bei 37° C abgelöst (0,25% (v/v) Trypsin; 0,03% (w/v) EDTA; Gibco, Berlin), pelletiert, gezählt (Fuchs-Rosenthal-Zählkammer) und 1:5 bis 1:10 verdünnt in 175 cm²-Flaschen ausgesät. Die Myoblasten wurden nun in DMEM-Medium mit 0,6 mg/ml G418 kultiviert, das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt.

2.6 Etablierung einer effizienten Methode zur transienten Transfektion

Um den Einfluß der neueren Transfektionsreagenzien Cellfectin, Lipofectin (Boehringer, Mannheim) und SuperFect (Qiagen, Hilden) auf die Transfektionsrate im Vergleich zur Calciumphosphat-Technik zu messen, wurden zu diesem Zweck H9K6-Myoblasten ($\approx 200.000/9,6 \text{ cm}^2$) maximal bis zu 24 h nach Aussaat bei 60 – 70% Konfluenz transfiziert, weiterhin wurden sie 3 - 4 h vor Transfektionsbeginn in FCS-freiem DMEM-Medium (Siehe 2.2) inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des Plasmid Maxi Kits (Qiagen, Hilden) isoliert und gereinigt, wie in 2.1.2 näher beschrieben. 5-10 μg pro Kulturschale des Vektors pEGFP-C1 (Clontech, Heidelberg) wurden mit den verschiedenen Carrier-Reagenzien komplexiert und den Angaben der Hersteller entsprechend auf die mit PBS-Puffer (167 mM NaCl; 16,3 mM Na_2HPO_4 ; 1,7 mM NaH_2PO_4 ; pH 7.4) vorgewaschenen Zellen transferiert. Das DMEM-Komplett-Medium (Siehe 2.2) wurde anschließend alle 24 h gewechselt und 36 – 48 h nach Transfektion wurde nach Fluoreszenz-Anregung der Anteil EGFP exprimierender, grün-fluoreszierender Zellen an der Gesamtzellzahl im Lichtmikroskop durch Auszählen der Zellen bestimmt.

2.7 Isolierung adulter ventrikulärer Kardiomyozyten

Zur Präparation wurden männliche Wistarratten (Harlan Winkelmann, Borcheln) mit einem Gewicht von 260 bis 320 g verwendet. Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Futter. Kalzium-tolerante Kardiomyozyten wurden unter Verwendung einer retrograden *in situ* Perfusion des Herzens mit Kollagenase-Puffer isoliert (modifizierte Langendorffperfusion, Eckel et al., 1983; Eckel, 1989). Zu diesem Zweck wurden die Ratten zunächst einem Ätherrausch ausgesetzt und dann durch intraperitoneale Injektion von 16% (w/v) Pentobarbital (Merial, Hallbergmoos) (100 mg/ kg Körpergewicht) narkotisiert. Nach erfolgter Betäubung wurde durch einen Anschnitt der Trachea eine künstliche Beatmung gelegt. Nach Injektion von Liquimin (250 I.E.) in die Vena femoralis erfolgte die Öffnung des Situs und die Freilegung der Aorta. In die Aorta wurde eine Kanüle eingeführt und so das Herz in der ersten Perfusionsphase durch ein nominell kalziumfreies, Carbogen-begastetes Vorperfusionsmedium (Krebs-Ringer Bikarbonat-Puffer; 35 mM NaCl; 4,8 mM KCl;

1,2 mM KH_2PO_4 ; 16 mM Na_2HPO_4 ; 25 mM NaHCO_3 ; 134 mM Saccharose; 20 mM Glucose; 10 mM HEPES; pH 7,4) blutfrei gespült. Das vollständige Durchspülen des Herzens wurde durch das Anschneiden der Aorta pulmonalis und den Verschluss der Ligaturen gewährleistet. Nach 5 bis 10 min wurde eine zweite Perfusionsphase gestartet, in der die enzymatische Andauung des Bindegewebes mit Kollagenase-Puffer (Krebs-Ringer Bikarbonat-Puffer mit 0,5% (w/v) BSA; 0,15% (w/v) Hyaluronidase; 0,1% (w/v) Collagenase; pH 7,4) erfolgte. Bei einer Durchflußrate von etwa 1 ml/min wurde nach 6 min eine Kalziumchloridlösung (final 20 μM) hinzugefügt und die Perfusion nach weiteren 25 bis 40 min beendet. Das nun weiche Herz wurde herausgeschnitten und der Ventrikel vorsichtig mechanisch zerkleinert. Nach einer Inkubation von 5 bis 10 min in einem offenen, silikonisierten Erlenmeyerkolben erfolgte die weitere Aufarbeitung der Kardiozyten in einem O_2 -gesättigten HEPES-Puffer (130 mM NaCl; 4,7 mM KCl; 1,2 mM KH_2PO_4 ; 5 mM Glucose; 2% (w/v) BSA; 25 mM HEPES; pH 7,4) bei 37° C unter Rundschüttelung (150 upm). Die Passage der Zellsuspension durch ein Sieb (Porengröße 700 μm) ermöglichte die Abtrennung von Bindegewebspartikeln. Es erfolgte eine Zentrifugation der Zellen für 4 min bei 25 x g und die anschließende Sedimentation in HEPES-Puffer. Um Zellaggregate zu vereinzeln, wurden die Kardiozyten für 7 min mit Trypsin (0,59 U/min) inkubiert und die Proteolyse anschließend durch Zugabe von Trypsininhibitor (2,4 U/ml) gestoppt. Die Zellen wurden durch Gaze (Porengröße 300 μm) filtriert und erneut bei 25 x g zentrifugiert. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Sedimentationseigenschaften konnten schließlich die abgestorbenen Kardiozyten von den vitalen Muskelzellen durch 3 Waschschriffe mit HEPES-Puffer abgetrennt werden. Dabei sedimentierten die stäbchenförmigen, vitalen Myozyten schneller als die abgerundeten, toten Zellen, deren kontraktile Apparat abgebaut oder zerstört war. Nach ca 20 min wurden die finalen Konzentrationen von Magnesium und Kalzium auf 1 mM eingestellt. Die Zellzahl und Vitalität (prozentualer Anteil der stäbchenförmigen Zellen an der Gesamtzellzahl) wurde unter Verwendung einer Fuchs-Rosenthal Zählkammer lichtmikroskopisch bestimmt. Pro Herz konnten 4 bis 7 Millionen Kardiomyozyten mit einer Vitalität von 90 bis 95% isoliert werden. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Herzmuskelzellen abschließend für 1 h bei 37° C im Rundschüttler inkubiert.

2.8 Kultivierung isolierter Kardiomyozyten

Zur Kultivierung der Kardiomyozyten wurden die Kulturschalen mindestens 20 min vor Aussaat zunächst mit Laminin aus der Maus (Becton Dickinson, Heidelberg), vorbeschichtet ($\approx 2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Zur weiteren Aufreinigung wurden nun tote Kardiomyozyten aufgrund ihrer unterschiedlichen Sedimentationseigenschaften von den vitalen Muskelzellen in HEPES-Puffer abgetrennt und der tote Zellen enthaltende Überstand wurde vorsichtig abgenommen. Nachfolgend wurden die Zellen 1 x mit 37° C warmem *Anwachsmedium* (25,3 mM Glucose; 4% (v/v) FCS; 17,3 pM Insulin; 2% (v/v) Penicillin/Streptomycin; 0,5 mM L-Glutamin; 10 mM HEPES; in 1:1 DMEM/Ham' s F12) gewaschen, für 5 min bei RT und 25 x g pelletiert und der Überstand verworfen. Die gereinigten Kardiomyozyten wurden nun gleichmäßig in einem entsprechenden Volumen *Anwachsmedium* resuspendiert und direkt auf die Laminin-vorbeschichteten Kulturschalen verteilt. Anschließend wurden die Zellen für 3 h in *Anwachsmedium* im Brutschrank (37° C, 5% CO₂) inkubiert. Das Medium wurde abgesaugt, abgelöste Zellen wurden dabei mit verworfen und die Zellen wurden für 16 h in *Kulturmedium I* (17,5 mM Glucose; FCS-frei; 17,3 pM Insulin; 2% (v/v) Penicillin/Streptomycin; 0,5 mM L-Glutamin; 10 mM HEPES; in 1:1 DMEM/Ham' s F12) inkubiert. Erneut wurde das Medium gewechselt, die Zellen wurden abschließend zur Vorbereitung auf anschließende Messungen für 3 h in *Kulturmedium II* (7,8 mM Glucose; FCS-frei; Insulin-frei; 2% (v/v) Penicillin/Streptomycin; 0,5 mM L-Glutamin; 10 mM HEPES; 17,3 pM Insulin; in 1:1 DMEM/Ham' s F12) inkubiert.

2.9 Präparation, Aufschluß und subzelluläre Fraktionierung des Ventrikulgewebes der Ratte

Männliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht zwischen 260 und 320 g wurden, wie unter 2.7 beschrieben, narkotisiert und zur Präparation vorbereitet. Das Herz wurde entnommen und in eine Petrischale mit eiskaltem, isotonen Aufschlußpuffer (0,1 mM PMSF; 2,6 mM DTT; 0,25 mM Saccharose; 10 mM Tris/HCl; pH 7,4) überführt. Mit diesem Puffer wurde das Herz mittels einer Perfusionskanüle retrograd blutfrei gespült. Nach Entfernung der Vorhöfe und anhängender Gefäße wurde das

Ventrikelgewebe entweder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert, oder direkt auf Eis wie folgt aufgeschlossen und subzellulär fraktioniert.

Die subzelluläre Fraktionierung erfolgte in Anlehnung an eine in unserer Arbeitsgruppe etablierte Methode (Uphues et al., 1994). Zunächst wurde das Ventrikelgewebe in hypotonem Aufschlußpuffer für 20 min aufgetaut und dann mit Hilfe eines Ultraturrax (IKA-Werke, Neu-Isenburg) 6 x 10 sec mechanisch zerkleinert. Zwischen den einzelnen Turrax-Behandlungen wurden Pausen von je 20 sec eingeschoben, um das Gewebe nicht zu erwärmen. Die endgültige Homogenisation erfolgte schließlich in einem Glas-Teflon-Homogenisator und in einem Glashomogenisator mit Schliffglaspistill (Braun, Melsungen). Der Aufschluß des Gewebehomogenats wurde im Mikroskop überprüft. Durch Zugabe einer 1,43 M Saccharoselösung wurde das Vollhomogenat isotoniert und für 10 min bei $3000 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in einer Ultrazentrifuge (Beckman) unter Verwendung eines Ti70-Festwinkelrotors bei $200.000 \times g$ für 90 min zentrifugiert, um das Cytosol (Überstand) von der Rohmembranfraktion (Pellet) zu trennen. Die Rohmembranfraktion wurde in isotonem Aufschlußpuffer resuspendiert (Eppendorf-Homogenisator). Die Fraktionen wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

2.10 Solubilisierung kardialer Zellen

Zur Solubilisierung wurden adhärente kardiale Zellen zuerst 2 x mit eiskaltem PBS gewaschen, dann mit einem Schaber abgekratzt und gesammelt. Pellets vorbehandelter Zellen wurden von -70°C aufgetaut und weiterverwendet. 1-3 Millionen Zellen wurden anschließend in 1 ml modifiziertem RIPA-Puffer resuspendiert (150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1% (v/v) NP-40; 0,25% (w/v) Na-deoxycholat; 1 mM PMSF; 1 mM Na_3VO_4 ; 1 mM NaF; Protease-Inhibitor Complete™-Tabletten (Boehringer, Mannheim); 50 mM Tris/HCl; pH 7,4). Zur fortschreitenden Solubilisierung wurden die Lysate für 2 h bei 6°C im Überkopfschüttler inkubiert. Zur Abtrennung unlöslicher Zellbestandteile folgte eine Zentrifugation bei 4°C und $14.000 \times g$ für 10 min, das Pellet wurde verworfen. Der klare Überstand wurde zur weiteren Verwendung aliquotiert und bei -70°C gelagert.

2.11 Immunopräzipitation von IRS-1 und IRS-2

Je 1 Million behandelte oder unbehandelte Kardiomyozyten wurden in 1,5 ml eiskaltem RIPA-Puffer resuspendiert und für 2 h bei 6° C im Überkopfschüttler solubilisiert (Siehe 2.10). Unlösliche Zellbestandteile wurden anschließend durch Zentrifugation für 15 min bei 14.000 x g und 4° C als Pellet abgetrennt. Der Überstand mit den cytosolischen und solubilisierten Proteinen wurde abgenommen und mit PBS (167 mM NaCl; 16,3 mM Na₂HPO₄; 1,7 mM NaH₂PO₄; pH 7,4) auf eine Proteinkonzentration von 1 mg/ml eingestellt. Es folgte eine Vorreinigung dieser Proteine mit einer Mischung aus 10 µl Protein A-Trisacrylamidpartikeln und 10 µl Protein G-Agarosepartikeln für 1 h im Überkopfschüttler bei 6° C, um unspezifische, an die Partikel bindende Proteine aus dem Lysat zu entfernen. Anschließend wurden die Protein A- und G-Partikel durch eine Zentrifugation für 1 min bei 5.000 x g wieder abgetrennt und verworfen. Parallel zur Lysis und Vorreinigung erfolgte das Vorkoppeln des Antikörpers. Zu diesem Zweck wurden pro Ansatz 5 µl Antiserum gegen IRS-1 oder IRS-2 mit 10 µl Protein A-Partikeln und 10 µl Protein G-Partikeln für 2 h in 500 µl RIPA bei 6° C im Überkopfschüttler inkubiert. Die nichtkovalent vorgekoppelten Antikörper-Partikel wurden 1 x mit PBS gewaschen und schließlich für mindestens 16 h mit den vorgereinigten Lysaten bei 6° C im Überkopfschüttler inkubiert. Abschließend wurden die Immunopräzipitate 3 x 10 min mit PBS gewaschen und für die SDS-PAGE vorbereitet.

2.12 Biotinylierung von Zelloberflächen-Proteinen

Diese Methode zur Markierung und Isolierung von Zelloberflächen-Proteinen wurde übernommen von der Arbeitsgruppe von Prof. Sasson (Sasson et al., 1997) und modifiziert (Dransfeld et al., 2000). Hierzu wurden mindestens 1 Million behandelte oder unbehandelte Zellen in Petrischalen zunächst 3 x mit eiskaltem PBS (167 mM NaCl; 16,3 mM Na₂HPO₄; 1,7 mM NaH₂PO₄; pH 7,4) gewaschen und dann für 30 min bei 6° C mit 0,5 mg Sulfo-NHS-LC-Biotin pro ml PBS (Pierce, Rockford, IL, USA) auf dem Taumelmischer inkubiert. Der Biotinylierungsvorgang wurde gestoppt durch 3 Waschschrte mit einer eiskalten Lösung von 15 mM Glycin in PBS. Die Zellen wurden anschließend in je 1 ml RIPA-Puffer solubilisiert und die Lysate gesammelt

wie in 2.10 beschrieben. Zur Streptavidin-Biotin-Präzipitation wurden die Biotin-markierten Lysate (1 mg/ml) mit je 50 μ l Streptavidin-Agarose-Partikeln (1-2 mg Streptavidin/ml Gel) versetzt, das Gemisch wurde für 16 h bei 6° C im Überkopfschüttler inkubiert und die Streptavidin-Agarose-Partikel wurden für 10 min bei 6° C und 5.000 x g abzentrifugiert. Das Pellet wurde nun 3 x mit eiskaltem Waschpuffer (150 mM NaCl; 10 mM Tris; 2 μ g/ml Aprotinin; 2 μ g/ml Proteaseinhibitor-Cocktail; pH 7,0) behandelt. Schließlich wurde das gewaschene Pellet in Harnstoff-Puffer (8,0 M Harnstoff; 2% (v/v) SDS; 100 mM Tris; pH 6,8) resuspendiert, für 30 min bei 37° C im Thermoblock inkubiert und anschließend sedimentiert. Der Überstand wurde mit 2 x Laemmli-Puffer versetzt und bei -70° C eingefroren. Der Proteingehalt in den Lysaten wurde nach dem BCA-Protein-Assay (Pierce, Rockford, IL, USA) (siehe 2.13) bestimmt.

2.13 Proteinbestimmung

2.13.1 nach Bio-Rad

Die Proteinbestimmung der Proben wurde mit Hilfe eines auf der Methode von Bradford (Bradford, 1976) beruhenden Bio-Rad-Proteintestes (Bio-Rad, München) durchgeführt. Sowohl die Membranproben als auch eine Standard-Proteinlösung (1 mg/ml) aus Rinderserumalbumin (reinst, Behring) wurden für 1 h in 1 N NaOH bei 60° C im Thermoblock inkubiert, mit 2 N HCl neutralisiert und mit 0,2 ml Bio-Rad-Reagenz versetzt und gemischt. Handelte es sich um lösliche Proteine, so wurden die Proben und der Standard in H₂O dest. aufgenommen. Nach einer Inkubationszeit von ca. 10 min konnte die Extinktion bei $\lambda=595$ nm gemessen und die daraus resultierende Proteinkonzentration berechnet werden.

2.13.2 nach Pierce

Die Proteinbestimmung von biotinylierten Proben wurde alternativ mit Hilfe eines auf der Methode von Lowry (Lowry et al., 1951) beruhenden, modifizierten BCA-Protein-Assay (Pierce, Rockford, IL, USA) durchgeführt. Durch Anwesenheit von Proteinen reduzierte Kupfer-Ionen gehen hier mit Bicinchoninat (BCA) violett-gefärbte Komplexe ein. Hierzu wurden je 50 μ l der Lysate und einer Standard-Proteinlösung

(1 mg/ml) aus Rinderserumalbumin (reinst, Behring) mit je 1 ml BCA-Reagenz versetzt und für 30 min bei 60° C im Thermoblock inkubiert. Die violette proteinhaltige Lösung wurde kurz auf Eis abgekühlt und in Küvetten überführt. Anschließend wurde die Extinktion bei $\lambda=562$ nm gemessen und die daraus resultierende Proteinkonzentration berechnet.

2.14 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung der Proteine wurden 0,5 mm dicke, diskontinuierliche, foliengebundene SDS-Polyacrylamid-Gele (ExcelGel SDS Gradient 8-18%, Amersham Pharmacia) oder 0,5 mm dicke, foliengebundene (GelBond PAGfilm, Amersham Pharmacia) 7 bis 10%ige Gele verwendet. Als Puffer dienten Excel-Pufferstreifen (*Anode*: 0,3 M Tris/Acetat; 0,4% (w/v) SDS; pH 6,4. *Kathode*: 0,08 M Tris; 0,8 M Tricin; 0,4% (w/v) SDS; pH 7,1) von Amersham Pharmacia. Die Proben wurden mit modifiziertem 2 x Laemmli-Probenpuffer (20% (v/v) Glycerin; 4% (w/v) SDS; 0,01% (w/v) Bromphenolblau; 5% (v/v) β -Mercaptoethanol; 125 mM Tris; pH 6,8) versetzt und für 10 min bei 95° C im Thermoblock denaturiert (Laemmli, 1970). Die Proben wurden kurz auf Eis abgekühlt und abzentrifugiert, dann wurde die Elektrophorese in einer Horizontal-Elektrophoresekammer (LKB 2117 Multiphor II, Amersham Pharmacia, Freiburg) bei einer konstanten Temperatur von 15° C, einer konstanten Stromstärke von 50 mA und einer variablen Spannung bis maximal 600 V durchgeführt. Als Molekulargewichtsmarker wurde eine Standard-Proteinmischung verwendet (*Niedermolekularer (LMW)-Marker*: Phosphorylase b aus Kaninchenmuskel, 94 kDa; Rinderserumalbumin, 67 kDa; Ovalbumin, 43 kDa; Carboanhydrase aus Rindererythrozyten, 30 kDa; Trypsininhibitor aus Sojabohnen, 20,1 kDa; α -Lactalbumin aus Rindermilch, 14,4 kDa; Amersham Pharmacia).

2.15 Transfer der Proteine auf Membranen

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine in einer Semidry-Blot-Apparatur mit Graphitelektroden (NovaBlot, Amersham Pharmacia) auf PVDF-Membranen (Immobilon P, Porengröße 0,45 μm ; Sigma, Deisenhofen) transferiert. Zu diesem Zweck wurden 6 Filterpapiere (Mukoll) auf Gelgröße zurechtgeschnitten, in Anodenlösung I (300 mM Tris; 20% (v/v) Methanol) getränkt und auf die Anodenplatte gelegt. Drei weitere Filterpapiere wurden in Anodenlösung II (25 mM Tris; 20% (v/v) Methanol) gewässert und auf den ersten sechs plziert. Das Gel wurde für 5 min in Anodenlösung II äquilibriert, dann wurde die Trägerfolie mit Hilfe eines speziellen Film-Removers (Amersham Pharmacia) abgetrennt. Die in Anodenlösung II äquilibrierte Blotmembran wurde auf das Gel gelgt und das ganze Paket wurde kopfüber auf die getränkten Filterpapiere gebracht. Nachdem die Folie entfernt worden war, wurden 9 weitere Filterpapiere in der Kathodenlösung (40 mM 6-Aminohexansäure; 0,01% (w/v) SDS; 20% (v/v) Methanol) getränkt und auf das Gel gelegt: Nach der Entfernung von Luftblasen wurde das Paket mit der Kathoden-Graphitplatte abgedeckt.

2.16 Färbetechniken

2.16.1 Coomassie Blue-Färbung

Die Färbung der Gele erfolgte bei 50° C in einer Edelstahl-Färbewanne, in der das Gel mit Trägerfolie kopfüber auf einem Gittereinsatz plziert wurde. Die Inkubation erfolgte unter Rühren eines Magnetkerns für 8 min in 2 l einer 10%igen Essigsäure, in der eine PhastGel-Blue-Tablette (0,02% (w/v) Coomassie R-350) gelöst war. Anschließend wurde der unspezifische Hintergrund in 10%iger Essigsäure für 2 h bei RT wieder entfärbt und das Gel schließlich für 30 min in einer 8,7%igen Glycerinlösung präserviert.

2.16.2 Indian-Ink-Technik

Nach Beendigung des Proteintransfers wurden die Membranabschnitte mit den Markerproteinen für 5 min in 0,2 M NaOH inkubiert und für 4 x 10 min mit TBST-Puffer (0,1% (v/v) Tween-20) gewaschen. Danach folgte eine Inkubation für 30 bis 60 min mit Indian-Ink-Färbelösung (0,1% (v/v) TBST; 0,1% (v/v) 'Pelikano'-Tinte; 1% (v/v) Essigsäure). Zum Schluß wurden die Membranen 2 x 2 min mit H₂O dest. gewaschen und an der Luft getrocknet.

2.16.3 Ponceau S-Technik

Nach Beendigung des Proteintransfers wurden die Membranabschnitte mit den Markerproteinen für 10 min in H₂O dest. gewaschen und anschließend für 10 bis 15 min in Ponceau S-Färbelösung (0,1% (w/v) Ponceau S in 3% (v/v) Trichloressigsäure) inkubiert. Dann wurden die Membranen 1 x kurz und 1 x 10 min in H₂O dest. gewaschen und an der Luft getrocknet.

2.17 Immunodetektion

2.17.1 Detektion mit ¹²⁵I-Protein A

Zunächst wurden die Blotmembranen für 90 min in TBST-Puffer (137 mM NaCl; 20 mM Tris/HCl; 0,1% (v/v) Tween-20; pH 7,5) mit 5% (w/v) Magermilchpulver inkubiert und anschließend für 10 min mit TBST gewaschen. Es folgte eine Inkubation der Membran mit den spezifischen Antikörpern in einer Antikörperlösung (5% (w/v) Magermilchpulver; 0,02% (w/v) NaN₃; in TBST) für 16 h bei 6° C auf einem Taumelmischer. Daraufhin wurden die Membranen 2 x 2 min und 4 x 10 min mit TBST gewaschen. Im Anschluß erfolgte eine Inkubation für 2 h mit ¹²⁵I-Protein A (0,3 µCi/ml) in TBST mit 5% (w/v) Magermilchpulver bei RT. Schließlich wurden die Blotmembranen solange mit TBST gewaschen, bis die Radioaktivität des Waschwassers unter 200 cpm/ml lag. Die Membranen wurden getrocknet, autoradiographiert und die Signale wurden mit Hilfe des FUJIX BAS 100 BiImage

Systems visualisiert und mit der zugehörigen Analysesoftware (Raytest, Staubenhardt) quantifiziert.

2.17.2 Detektion mit verstärkter Chemilumineszenz (ECL)

Nach dem Proteintransfer wurden die PVDF-Membranen für 1 h in TBST-Puffer mit 5% (w/v) Magermilchpulver bei RT inkubiert zur Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen. Danach erfolgte, wie in 2.17.1 beschrieben, für 16 h bei 6° C eine Inkubation der Membran mit einer spezifischen Antikörperlösung. Die Membranen wurden 2 x kurz und 6 x 10 min mit TBST gewaschen und anschließend mit der entsprechenden Verdünnung des sekundären Antikörpers für 1 h bei RT in TBST-Puffer mit 5% (w/v) Magermilchpulver (Ziege anti-Kaninchen, Ziege anti-Schaf, oder Ziege anti-Maus; Promega, Madison, USA) inkubiert. Dann wurde erneut 2 x kurz und 6 x 10 min mit TBST gewaschen und die Membranen schließlich für ca. 5 min in einer Mischung von SuperSignal[®]-Peroxid-Substratlösung und SuperSignal[®]-Luminol-Verstärkerlösung im Volumenverhältnis 1:1 (Pierce, Rockford, IL, USA) inkubiert. Mit Hilfe eines LUMI-Imagers und der LUMI-Analyst-Software (Boehringer, Mannheim) wurden die Signale analysiert und quantifiziert.

2.18 Strippen von Blotmembranen

Bei Blotmembranen, die bereits mit Hilfe des ECL-Systems detektiert waren, wurden unter Verwendung des ‘ ‘ Western Blot Recycling Kit‘ ‘ (Biotrend, Köln) sowohl der primäre Antikörper als auch das Enzym-Konjugat wieder abgetrennt. Zu diesem Zweck wurde die spezielle Antikörper-Strip-Lösung 1:10 mit H₂O dest. verdünnt und die Blotmembran für 15 min bei RT in dieser Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Membranen für mindestens 2 x 5 min mit TBST mit 5% (w/v) Magermilchpulver gewaschen und einer weiteren Inkubation mit dem ECL-System (2.14.2) unterzogen.

2.19 Immunfluoreszenzfärbung kultivierter Kardiomyozyten

Die Zellen wurden zunächst auf sterilisierten Glasdeckblättchen in Kulturschalen ausgesät. Am Tag der Fluoreszenzanfärbung wurden dann behandelte und unbehandelte Zellen 2 x mit PBS gewaschen. Zur Fixierung der Zellen erfolgte eine Inkubation bei RT für 10 min mit 4% (w/v) frischem Paraformaldehyd in PBS. Nach 2 erneuten Waschschritten mit PBS erfolgte zur Permeabilisierung der Zellmembranen eine Inkubation für 10 min bei RT mit 0,1 (v/v) % Triton X-100 in PBS. Es wurde wieder 2 x mit PBS gewaschen, zur Blockierung unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen wurden die Zellen für 1 h bei RT mit 1% (w/v) BSA in PBS inkubiert, es schloß sich ein PBS-Waschschritt an. Zur Fluoreszenzanfärbung wurde nun entweder der spezifische Antikörper, oder ein Fluoreszenz-markiertes Färbereagenz in PBS verdünnt zu den Zellen gegeben und diese für 16 h bei 6° C lichtgeschützt inkubiert. Zur Entfernung überschüssiger Liganden wurde nun 2 x mit PBS gewaschen, anschließend wurde der in PBS verdünnte, Fluoreszenz-gekoppelte 2. Antikörper zu den Zellen gegeben und diese für 2 h bei RT lichtgeschützt inkubiert. Es erfolgten abschließend 2 PBS-Waschschritte, die Deckblättchen wurden kurz getrocknet und mit Fluoreszenz-geeignetem Medium (DAKO) auf einem Objektträger eingedeckt. Das Fixpräparat wurde schließlich getrocknet und bei 4° C bis zur Analyse lichtfrei gelagert.

2.20 Konfokale Lasermikroskopie

Fixpräparate immunfluoreszenzgefärbter Kardiomyozyten auf Objektträgern wurden mit Hilfe des Leica TCS-NT konfokalen Laser-Scanning Systems mit einem Argon-Krypton-Laser an einem inversen Leica DM IRB-Mikroskop analysiert. Die Bilder wurden durch Exzitation auf 2 Kanälen der Wellenlängen 530 ± 10 nm (grün) und > 590 nm (rot) erhalten. Es wurden nur Präparate verglichen, die in allen Parametern gleich behandelt wurden, wie Lasereinstellung, Filtereinstellung, Linsen, Spannung des Photomultipliers, Anzahl der akkumulierten Scanvorgänge, Formatgröße und Zoom-Einstellung, Scan-Geschwindigkeit und Z-Schritt-Größe. Die Bilder wurden kodiert, um Bevorzugungen während der Bildauswahl zu vermeiden. Bilder von ganzen Zellen wurden mit Hilfe der ' ' Projektion' ' -Funktion der Leica-Software erstellt,

während Zellschnitte mit Hilfe der ‘ ‘ Section‘ ‘ -Funktion berechnet wurden. Die einzelnen Bilder wurden schließlich zur weiteren Analyse als Tiff-Datei gespeichert.

2.21 Messung des 2-Deoxyglucose Transportes

Die adhärennten Zellen wurden zunächst in 6-Well-Kulturschalen für 2,5 h in DMEM-Komplettmedium (5,5 mM Glucose; FCS-frei) im Brutschrank (37° C; 5% CQ) inkubiert und zur Entfernung der in Mediumresten verbliebenen Glucose 2 x mit PBS gewaschen. Dann wurde je 1 ml eines Glucose-freien Transport-Puffers (134 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 1,8 mM CaCl₂; 0,8 mM MgSO₄; 20 mM HEPES; pH 7,4) zugegeben und für 30 min im Brutschrank inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2-Deoxy-D-[¹⁴C] glucose (7,3 μM final; 0,4 μCi pro Kulturschale) gestartet und der Hexosetransport wurde für 30 min gemessen. Der Glucosetransport wurde durch dreimaliges Waschen der Zellen mit eiskaltem Cytochalasin B (25 μM in Transport-Puffer) gehemmt. Die gewaschenen, trockenen Zellen wurden nun in je 1 ml 1 N NaOH solubilisiert und die Lysate wurden für 30 min im Trockenschrank bei 70° C hydrolysiert. Je 300 μl Lysat wurden mit 100 μl Essigsäure (100%) neutralisiert, und nach Zugabe von 10 ml Szintillationscocktail Aquasafe 300 Plus (Zinsser, Frankfurt) wurde die aufgenommene Radioaktivität in einem Szintillationszähler (LS 6000 IC, Beckman) ermittelt. Zur Bestimmung der unspezifischen Glucoseaufnahme durch Diffusion wurden Parallelansätze mitgeführt, die L-[¹⁴C] Glucose enthielten. Der spezifische, Carrier-vermittelte Transport ließ sich hierbei durch Subtraktion der ermittelten Werte von der Totalaufnahme berechnen (2-5% der Gesamt-Glucoseaufnahme).

2.22 Messung des 3-O-Methylglucose Transportes

Die Messungen des Transportes von 3-O-Methylglucose wurden in HEPES-Puffer (pH 7,4) in Gegenwart von D-Glucose durchgeführt. Gestartet wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 μl Zellsuspension (ca. 20.000 Zellen) zu 50 μl HEPES-Puffer (Siehe 2.4), welcher das nicht-metabolisierbare Glucose-Strukturanalogon 3-O-[¹⁴C] Methyl-D-glucose (100 μM) enthielt. Zur direkten Hemmung des

Hexosetransportes wurde die Inkubation nach exakt 10 sec durch Zugabe von 900 μ l eiskalter Stopplösung (38 μ M Cytochalasin B; 0,1% (v/v) Ethanol; 154 mM NaCl) beendet. Von der erhaltenen Suspension wurden 2 Aliquoten zu je 300 μ l in vorgekühlte Microfugenröhrchen auf je 100 μ l Silikonöl (AR 200; Dichte 1,04; Wacker, Burghausen) überführt und für 40 sec bei RT und 10.000 x g in einer Microfuge (Beckman, München) zentrifugiert. Die Spitze des Röhrchens mit dem Zellsediment wurde abgetrennt, in ein Zählröhrchen überführt und zur Auflösung mit 1 ml Biolute S-Lösung (Zinsser, Frankfurt) behandelt. Nach Neutralisierung der Lösung mit Essigsäure und Zugabe von 5 ml Szintillationscocktail Aquasafe 300 Plus (Zinsser, Frankfurt) wurde die aufgenommene Radioaktivität in einem Szintillationszähler (LS 6000 IC, Beckman) ermittelt. Zur Bestimmung der unspezifischen Glucoseaufnahme durch Diffusion oder extrazelluläre Kontamination wurden Parallelansätze mitgeführt, die L-[14 C] Glucose enthielten. Der spezifische, Carrier-vermittelte Transport ließ sich hierbei durch Subtraktion der ermittelten Werte von der Totalaufnahme berechnen.

2.23 Extraktion von Phospholipiden

Das Verfahren zur Extraktion von Phospholipiden wurde ausgehend von einer durch Powell beschriebenen Methode modifiziert (Powell, 1987). Hierzu wurden zunächst Kardiomyozyten in Kulturschalen 3 x mit PBS gewaschen und gesammelt, eingefrorene Zellpellets wurden in derselben Weise behandelt. Zum Aufbrechen der Zellen wurde die Zellsuspension anschließend 3 Einfrier- und Auftau-Zyklen in flüssigem Stickstoff unterworfen. Zur Hydrolyse von HETE-Estern und zur Verhinderung nicht-spezifischer Oxidationsvorgänge wurden die Zellen mit 0,8 ml Extraktionspuffer (0,2 mM NaOH; 0,25 mM Propyl-Gallat; in Methanol) gemischt und anschließend für 40 min lichtfrei in Stickstoffatmosphäre bei 4° C inkubiert. Nach Azidifizierung zu pH 3,0 mit 1 N HCl wurden die Zell-Lysate auf eine vorgewaschene (7 ml Methanol und 7 ml H₂O) Octadecyl (ODC)-funktionalisierte Kieselgel-Säule geladen (2,2 g pro Säule). Trachea-Absaug-Sets (UnoPlast, Hundestedt, Dänemark) dienten zum Säulenaufbau. Dann wurden die Phospholipid-Extrakte von der ODC-Säule schnell und unter hohem Stickstoff-Druck (\approx 10 psi) zunächst mit 7 ml 15%igem Ethanol, 7 ml H₂O, dann mit 2 ml Petroleum-Ether gewaschen und schließlich mit 10

ml Ethyl-Acetat eluiert. Das Eluat wurde in 10 ml-Kolben gesammelt und unter einem ständigem Stickstoffstrom getrocknet, bis zur vollständigen Evaporation des Ethyl-Acetats. Die trockenen Phospholipid-Extrakte wurden in 100 μ l Ethyl-Acetat erneut resuspendiert und anschließend für die Bestimmung des 12(S)-HETE-Gehalts sauerstofffrei bei -70° C gelagert.

2.24 Messung des 12(S)-HETE-Gehaltes

Die Bestimmung des 12(S)-HETE-Gehalts der Kardiomyozyten geschah mit Hilfe des 12(S)-HETE ELISA Assays (Perseptive Biosystems, Framingham, MA, USA). Die verschiedenen Proben wurden vorbereitet, wie in 2.23 beschrieben. Der ELISA Assay wurde nach den vom Hersteller beschriebenen Anweisungen durchgeführt. Proben mit unbekanntem 12(S)-HETE-Gehalt oder bekannte Mengen 12(S)-HETE Standard konkurrierten mit einer konstanten Menge 12(S)-HETE, das mit alkalischer-Phosphatase markiert war, um die Bindung an einen Anti-12(S)-HETE-Antikörper (Kaninchen). Ungebundenes Material wurde abgewaschen und die Reaktion gestoppt. Die 12(S)-HETE-Menge konnte nun indirekt durch die Absorption bei $\lambda=405$ nm gemessen werden und wurde nach Korrelation mit einer 12(S)-HETE-Standardkurve berechnet.

2.25 Berechnung und Statistik

Grundsätzlich sind, falls nicht anders angegeben, die Mittelwerte und die Standardabweichung der Mittelwerte (\pm SEM) angegeben. Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit Hilfe des Programms 't-ease' (ISI, Philadelphia, USA), basierend auf dem Students t-Test, für gepaarte und ungepaarte Daten. Als Signifikanzgrenze wurde $p \leq 0,05$ angenommen.

III. Ergebnisse

3.1 Regulation der subzellulären Verteilung des Glucosetransporters GLUT4 durch die Ras-homologe GTPase Rab4A

3.1.1 Charakterisierung einer insulin sensitiven Herzmuskel-Zelllinie mit stabiler GLUT4-Überexpression

Eine bedeutende Rolle in der Regulation des intrazellulären Vesikeltransportes wird der Familie der Rab-GTPasen zugeschrieben, von welchen bisher mehr als 30 verschiedene Isoformen beschrieben wurden (Zerial & Stenmark, 1993; Martinez & Goud, 1998). Im Rattenherzen wurde bereits die Expression mehrerer dieser GTPasen nachgewiesen (Doucet et al., 1992). Grundlage dieser Arbeit waren frühere Untersuchungen aus unserer Arbeitsgruppe zur Beteiligung von Rab-GTPasen an der Regulation des kardialen GLUT4-Vesikeltransportes. Es konnte einerseits gezeigt werden, daß Rab3C insulinabhängig zur Plasmamembran transloziert wird (Uphues et al., 1995 B). Desweiteren wurde in GLUT4-Vesikeln neben Rab4A eine 24 kDa-GTPase isoliert, welche insulinabhängig zur Plasmamembran transloziert wird und später als die Isoform Rab11 identifiziert wurde (Uphues et al., 1994; Uphues et al., 1995 A; Kessler et al., 2000). Um die Beteiligung der Rab-GTPasen Rab4A und Rab3C an der insulinabhängigen GLUT4-Umverteilung und am insulinregulierten Glucosetransport isoliert zu untersuchen, sollten Rab4A oder Rab3C in kardialen Zellen mit stabiler GLUT4-Expression transient exprimiert werden. Frisch isolierte Kardiomyozyten der Ratte weisen eine hohe Rate der GLUT4-Expression auf. Wie jedoch in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, unterliegt das GLUT4-Transkript nach 48 h in Primärkultur einer spezifischen Degradierung, während die GLUT1-Expression auf der mRNA-Ebene stark ansteigt (von Holtey, 1996; Dransfeld et al., 2000). Dieser Umstand schließt die sinnvolle Nutzung der Kardiomyozyten für Langzeitstudien der Insulinwirkung in Primärkultur auf der Ebene der GLUT4-Regulation und des Glucosetransportes aus.

Aus diesem Zusammenhang ergab sich der Ansatz, aus dem kardialen Herzmuskel-Zellsystem H9c2 (Hescheler et al., 1991) Subklone mit stabiler GLUT4-Überexpression herzustellen, um ein Modellsystem für Langzeitstudien zur Regulation der subzellulären Verteilung und Translokation des kardialen GLUT4 zu etablieren. In früheren Studien unserer Arbeitsgruppe wurde die

Insulinansprechbarkeit von H9c2-Myoblasten bereits charakterisiert (Bähr et al., 1997), Das Vorkommen von Elementen der Insulinsignalkaskade (Abas et al., 2000; Chun et al., 2000; Kim et al., 1999; Nishida et al., 1999), sowie der Isoformen GLUT1 und GLUT4 (Yu et al., 2000; Yu et al., 1999; Tsiani et al., 1998; Lu et al., 1997) in differenzierten H9c2-Myotuben ist in zahlreichen Studien belegt worden. Der Transporter GLUT4 und die Rab-GTPasen Rab3 und Rab4 werden in Myoblasten jedoch nur marginal exprimiert. Es wurde daher zunächst GLUT4-cDNA in den Expressionsvektor pCMV subkloniert, und H9c2-Myoblasten wurden mittels der Calciumphosphat-Methode mit pCMV-GLUT4 transfiziert. Stabile Transfektanden wurden nach 35 Tagen in Anwesenheit von G418 selektiert. Desweiteren wurden sechs Klone mit unterschiedlichen Intensitäten der stabilen GLUT4-Überexpression per Immunoblotanalyse ausgewählt. Myoblasten von H9c2-Wildtypzellen und der sechs ausgewählten GLUT4-überexprimierenden Klone wurden für 2,5 h in serumfreiem DMEM-Medium kultiviert, anschließend wurde die basale und insulinstimulierte Glucoseaufnahme gemessen. Die Abbildung 3 (Bild A) zeigt, daß alle 6 ausgewählten Klone eine niedrigere basale Rate der Glucoseaufnahme aufwiesen als H9c2-Wildtypzellen. Weder H9c2-Wildtypzellen, noch die Klone 1 bis 5 zeigten unter diesen Bedingungen eine Ansprechbarkeit auf Insulin. Nur bei Klon 6 bewirkte der Insulinstimulus eine signifikante Steigerung der Glucoseaufnahme um 60 - 70%. Die Abbildung 3 B zeigt einzelne spindelförmige, mononukleäre H9K6-Myoblasten im frühen subkonfluenten Stadium (links) und am Tag 7 bei Konfluenz (rechts). Zur genaueren Charakterisierung von Klon 6, desweiteren als H9K6 bezeichnet, wurden zunächst Myoblasten von H9K6 mit steigenden Insulinkonzentrationen (10 pM – 1 µM) vorbehandelt, und so die Intensität der hormonabhängigen Steigerung der Glucoseaufnahme gemessen. Wie in Bild C gezeigt, findet das initiale Einsetzen der Insulinwirkung erst bei 0,1 – 1 nM statt. Eine halbmaximale Stimulation wird bei 10 nM erreicht, zur maximalen Steigerung des Glucosetransportes von ca 60% kommt es bei 100 nM bis 1 µM.

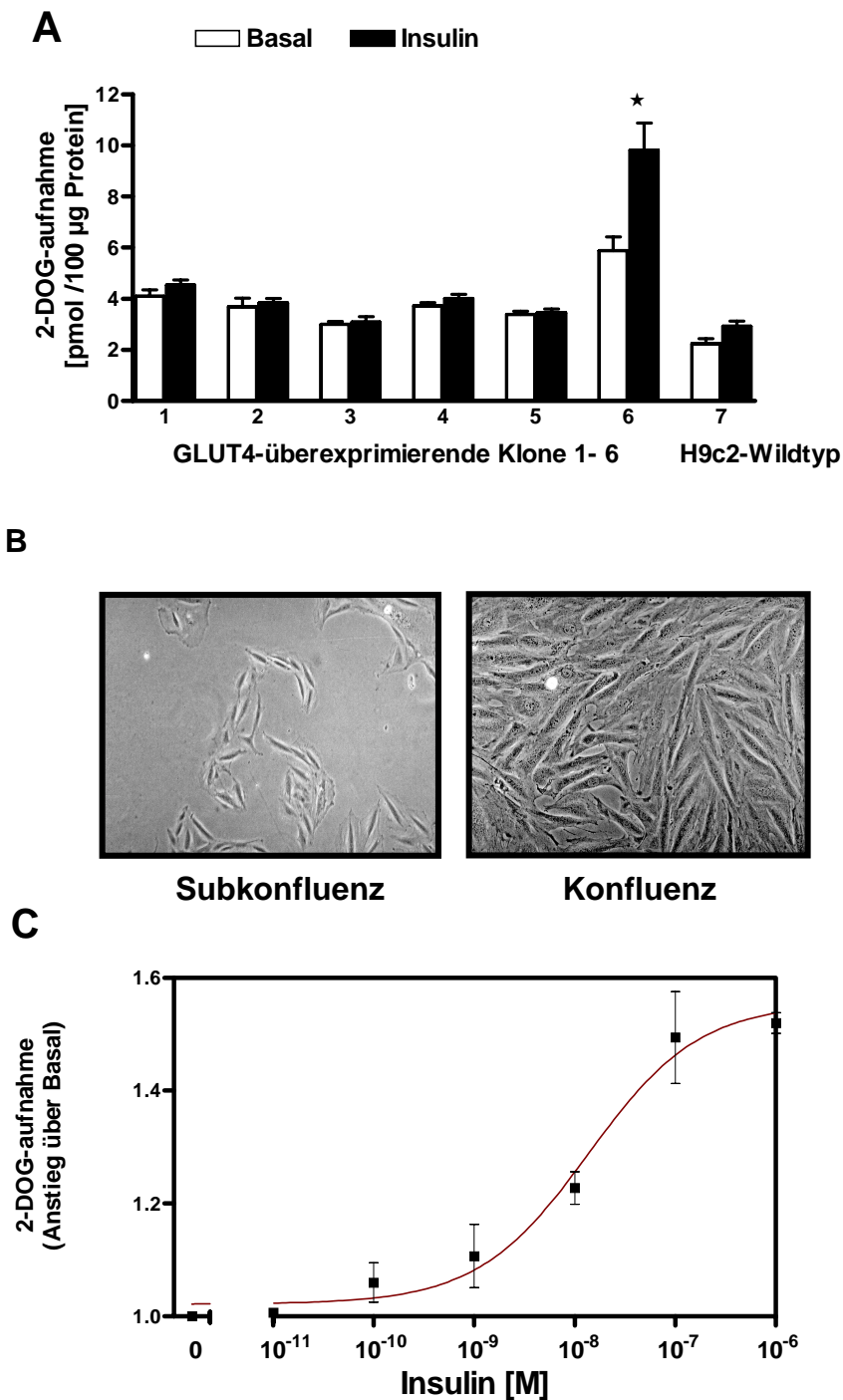


Abb. 3: Charakterisierung der Insulinwirkung auf die Glucoseaufnahme in kardialen H9c2-Myoblasten

Myoblasten von H9c2-Wildtypzellen und 6 GLUT4-exprimierender Klone wurden für 2,5 h in serumfreiem Medium inkubiert, anschließend wurde die basale und insulin-stimulierte (45 min; 1 µM) Glucoseaufnahme durch Zugabe von 2-Deoxy-D- $[^{14}\text{C}]$ glucose (0,2 µCi pro Well) für 30 min gemessen (Bild A). Unter denselben Bedingungen wurde der Klon H9K6 (Bild B; links: subkonfluent, rechts: konfluent) mit der größten Insulinsensitivität für 45 min mit steigenden Insulindosen (10 pM – 1 µM) behandelt, anschließend wurde die Glucoseaufnahme durch Zugabe von 2-Deoxy-D- $[^{14}\text{C}]$ glucose (0,2 µCi pro Well) für 30 min gemessen (Bild C).

Zur weiteren Charakterisierung von H9K6 wurde die Expression der im Herzmuskel vorherrschenden Glucosetransporter-Isoformen GLUT1 und GLUT4 untersucht. Die Regulation der Expression des insulinabhängigen GLUT4 und des für die Aufrechterhaltung der basalen Transportrate zuständigen GLUT1 wurde zuvor in unserer Arbeitsgruppe anhand von Northern Blot-Analysen näher beschrieben (von Holtey, 1996). Die GLUT4-Expression in H9K6 auf mRNA-Ebene wurde mit Hilfe GLUT4-spezifischer Primer mittels PCR bestätigt (Dransfeld et al., 2000).

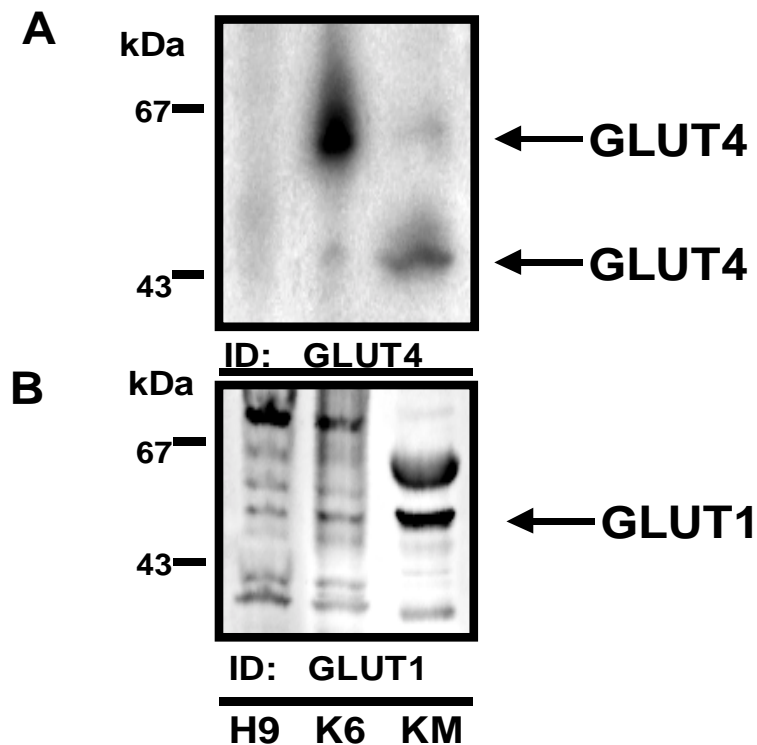


Abb. 4: Charakterisierung der Expression der Glucosetransporter-Isoformen in kardialen Muskelzellen der Ratte

Rohmembranfraktionen (15 µg Protein/ Spur) adulter Kardiomyozyten (KM), H9K6-Myoblasten (K6), oder H9c2-Wildtyp-Zellen (H9) wurden per SDS-PAGE (8 – 18%) aufgetrennt, auf PVDF-Membranen überführt und mit Antiseren gegen GLUT4 (Bild A) oder GLUT1 (Bild B) immunodetektiert. Dargestellt sind repräsentative Autoradiogramme von drei separaten Experimenten.

Die Western Blot-Analyse der kardialen GLUT-Expression ist in Abbildung 4 dargestellt. In Rohmembranfraktionen adulter Kardiomyozyten (Bild A) wurde GLUT4 bei einer Masse von ca 43 kDa gefunden, während in H9c2-Wildtyp-Myoblasten keine GLUT4-Expression beobachtet werden konnte. Im Gegensatz dazu resultierte in H9K6 die stabile Transfektion in einer markanten GLUT4-Überexpression, detektierbar bei einer Masse von 50 – 60 kDa. In allen kardialen Zellen wurde GLUT1 bei einer Masse von knapp unter 50 kDa detektiert, verglichen mit adulten Kardiomyozyten wird in H9c2-Wildtyp-Zellen und H9K6 diese Glucosetransporter-Isoform schwächer exprimiert (Bild B).

3.1.2 Etablierung einer adäquaten Transfektionstechnik in H9K6-Myoblasten

Die Effizienz einer transienten Transfektion hängt unter anderem ab von der Struktur, Konfiguration, Größe und Reinheit der DNA (Weber et al., 1995; Parente & Chew, 1998). Um die zur transienten Transfektion benötigte DNA zu erhalten, wurde das in E.coli amplifizierte Plasmid pCMV isoliert und mittels einer patentierten Anionen-Austauscher-Säule gereinigt (Siehe 2.4.1-2). Zur Bestimmung der Konzentration und Qualität der Plasmid-DNA wurde die Extinktion über einen Wellenlängenbereich von 200-340 nm gemessen (Abb. 5 A). Es wurde nur DNA mit einem Extinktionsquotienten ($E_{260\text{nm}}/E_{280\text{nm}}$) von mindestens 1,8 für die Transfektionen weiterverwendet, dieser gibt reine, RNA - und Proteinfreie DNA an. Anschließend wurde der Vektor pCMV mit EcoRI geschnitten (Siehe 2.4.3), für welches 2 Schnittstellen vorkommen (Bild B). Die EcoRI-Fragmente wurden in einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt, wie in Abbildung 5 C dargestellt. Bei allen drei Restriktionsansätzen konnte das unveränderliche Fragment A bei einer Größe von 3,54 kb gefunden werden. Wie erwartet war das Fragment B aufgrund der gegebenen Größenunterschiede der verschiedenen Rab-cDNA's bei verschiedenen Größen zu sehen, für pCMV bei 1,26 kb, für pCMV-rab3C bei 1,93 kb und für pCMV-rab4A bei 2,64 kb.

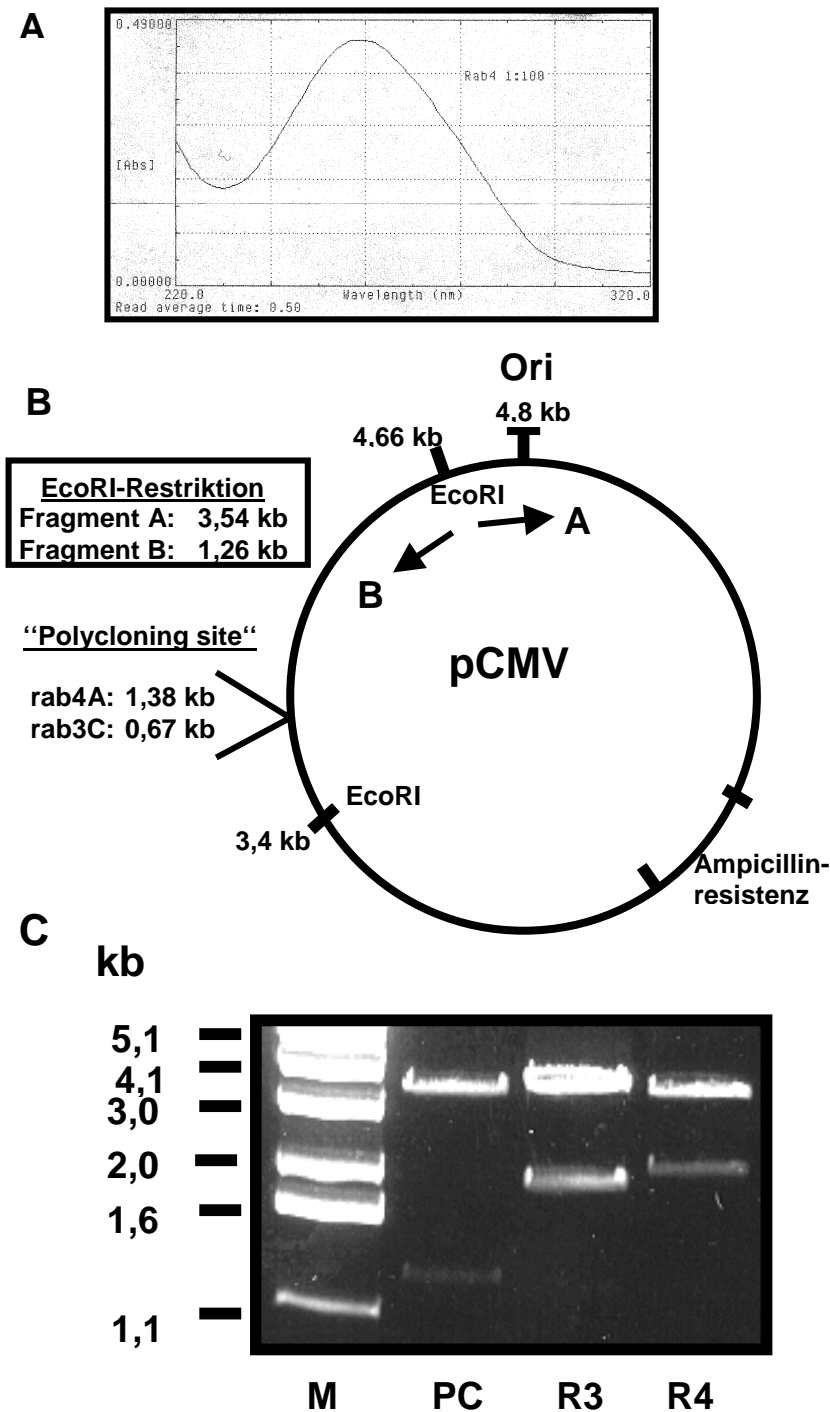


Abb. 5: Identifizierung des Vektors pCMV und Darstellung seiner Reinheit

Die Plasmide pCMV (PC), pCMV-rab4A (R4) und pCMV-rab3C (R3) (Bild B) wurden in *E. coli* amplifiziert und mit alkalischer Lyse isoliert. Der Reinheitsgrad der per Anionen-Austauscher-Säule gereinigten Plasmide wurde durch die Extinktion (200 – 320 nm) bestimmt (Bild A). Nach Restriktion mit EcoRI wurden die Fragmente mit einem 1-kb-Marker (M) im Ethidiumbromid-markierten 0,8%igen Agarosegel in TBE-Puffer aufgetrennt (Bild C).

Die Effizienz einer transienten Transfektion hängt weiterhin ab von anderen Parametern wie dem Zustand und Generationsstatus der Zellen, Serumeinflüssen und nicht zuletzt von der Transfektionstechnik. Klassische Transfektionsmethoden wie Elektroporation (Neumann et al., 1982), DEAE-Dextran (Vaehri & Pagano, 1965), oder Calciumphosphat (Graham & van der Eb, 1973) sind zwar zur stabilen Überexpression von Proteinen gut geeignet, jedoch zum Zwecke der transienten Proteinüberexpression bewirken sie eine schlecht reproduzierbare, ungleichmäßige Bildung und Verteilung von DNA-Carrier-Komplexen über den Zellmonolayer, wodurch die DNA nur in einen geringen Anteil der Zellen eindringen kann. Die Transfektion über kationische Liposomen wurde erstmals 1987 gezeigt (Felgner et al., 1987), die DNA-Komplexierung erfolgt hier über eine Interaktion positiv geladener Liposomen mit der negativ geladenen DNA. Eine andere kürzlich entwickelte Technik nutzt als Carrier aktivierte Dendrimere (Tang et al., 1996), die mit positiv geladenen Aminosäureresten die DNA komplexieren. Um möglicherweise eine prozentuale Steigerung der Transfektionsrate zu erzielen, wurde der Einfluß der kationischen Liposomen-Reagenzien Cellfectin und Lipofectin (Boehringer, Mannheim), und des polykationischen, aus ‘ ‘ aktivierten Dendrimeren‘ ‘ bestehenden SuperFect (Qiagen, Hilden) auf die Transfektionsrate im Vergleich zur Calciumphosphat-Technik untersucht. Zu diesem Zweck wurden subkonfluente H9K6-Myoblasten 24 h nach Aussaat mit pEGFP-C1 transfiziert. Die meisten oben genannten Parameter konnten so nach dem etablierten Transfektionsprotokoll kontrolliert werden (Siehe 2.6).

36 – 48 h nach Transfektion wurde nach Fluoreszenz-Anregung der Anteil EGFP-exprimierender, grün fluoreszierender Zellen an der Gesamtzellzahl im Lichtmikroskop durch Auszählen der Zellen bestimmt. Wie in Abbildung 6 A gezeigt, konnten mittels Calciumphosphat-Technik zum einen nur ca 10% aller Zellen transfiziert werden, zum anderen war die Intensität der Fluoreszenz pro transfizierter Zelle recht unregelmäßig (Abb. 6 B, links). Dies läßt den Schluß zu, daß keine gleichmäßige Verteilung der DNA auf die Zellen stattgefunden hat. Der kationische Liposomen-Carrier Cellfectin steigerte die Transfektionsrate auf ca 50% der Gesamtzellzahl. Desweiteren erhöhten der Liposomen-Carrier Lipofectin, sowie der Dendrimer-Carrier SuperFect die Transfektionseffizienz auf 65 – 70% der Gesamtzellzahl (Abb. 6 A). Wie in Abb. 6 B (rechts) dargestellt, war bei den mittels SuperFect transfizierten Zellen die Intensität der Fluoreszenz gleichmäßig auf die Zellen verteilt. Dies läßt vermuten, daß der Carrier ein recht genau definiertes

Quantum an DNA pro Zelle transportiert hat. Die folgenden Untersuchungen wurden daraufhin mittels der SuperFect-Technik durchgeführt.

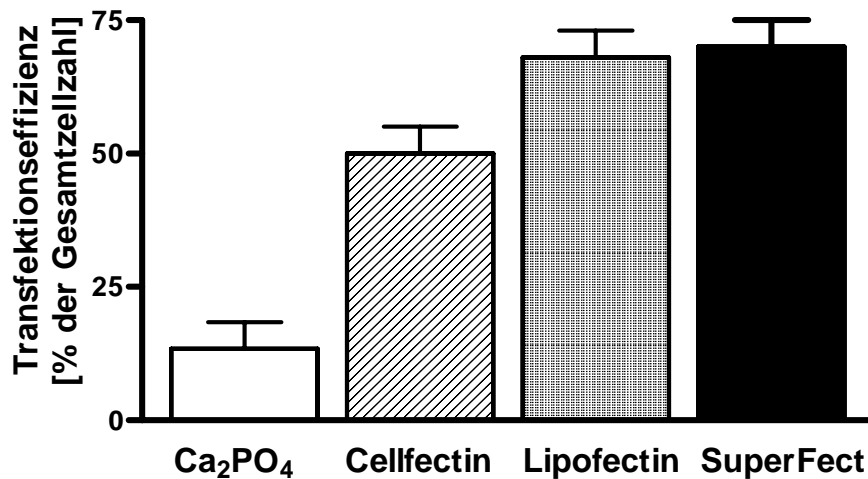
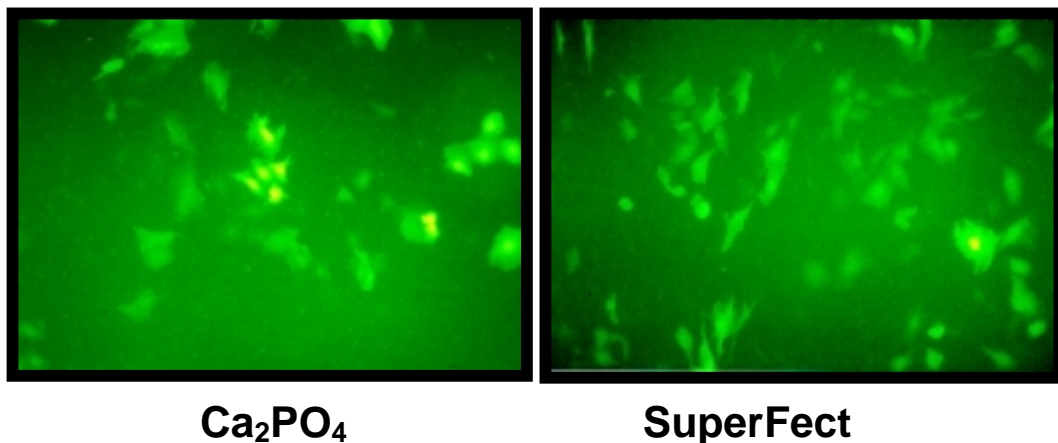
A**B**

Abb. 6: Charakterisierung der Transfektionseffizienz an H9K6-Myoblasten

H9K6-Myoblasten wurden bei 60-70% Konfluenz in serumfreiem DMEM-Medium für 3 - 4 h inkubiert, dann mit Hilfe der verschiedenen DNA-Carrier (Ca₂PO₄, Cellfectin, Lipofectin, SuperFect) mit 5 – 10 µg pEGFP-C1 transfiziert. Der Anteil grün fluoreszierender Zellen an der Gesamtzellzahl wurde 36 - 48 h nach Transfektion im Lichtmikroskop durch Auszählung bestimmt (Bild A). In Bild B sind Zellen dargestellt, die mittels Ca₂PO₄ (links) und SuperFect (rechts) transfiziert wurden.

3.1.3 Einfluß der GTPase Rab4A auf die Glucoseaufnahme und GLUT4-Umverteilung in H9K6-Myoblasten

Die endogene Expression der Rab-GTPasen Rab4A und Rab3C in kardialen Gewebe adulter Ratten wurde bereits in unserer Arbeitsgruppe beschrieben (Uphues et al., 1994; Uphues et al., 1995 A & B). Rab4A wurde in subzellulären Fraktionen unbehandelter Zellen überwiegend im Cytosol bei einer Masse von 24 kDa gefunden, nach Insulinstimulus wurde die Umverteilung von Rab4A zur Plasmamembran detektiert. Rab3C wurde im basalen Zustand überwiegend im Cytosol bei einer Masse von 29 kDa detektiert, nach Insulingabe konnte eine Translokation zur Plasmamembran gezeigt werden. In H9c2-Myoblasten konnte jedoch nur eine marginale endogene Expression der GTPasen Rab3C und Rab4A gefunden werden. Zum Nachweis der Überexpression der Rab-GTPasen wurden Rohmembranfraktionen von H9K6-Myoblasten, die mit pCMV-rab4A oder pCMV-rab3C transient transfiziert waren, per SDS-PAGE aufgetrennt, auf PVDF-Membranen transferiert und mit Antiseren gegen Rab4A oder Rab3C immunodetektiert. Wie in Abbildung 7 ersichtlich, konnte in H9c2-Myoblasten keine endogene Expression von Rab3C (Bild B) und nur eine marginale Expression von Rab4A (Bild A) nachgewiesen werden. Allerdings wurde Rab4A in transfizierten Zellen in Übereinstimmung mit der Kontrolle aus adultem Gewebe (KM) bei einer Masse von ca 24 kDa nachgewiesen (Bild A). Die transiente Transfektion führte hier die Rab4A-Expression in H9K6 also auf ein Niveau zurück, welches mit dem in Kardiomyozyten detektierten vergleichbar ist. Nach Überexpression von Rab3C konnte ebenfalls dieses Protein bei einer Masse von 29 kDa detektiert werden.

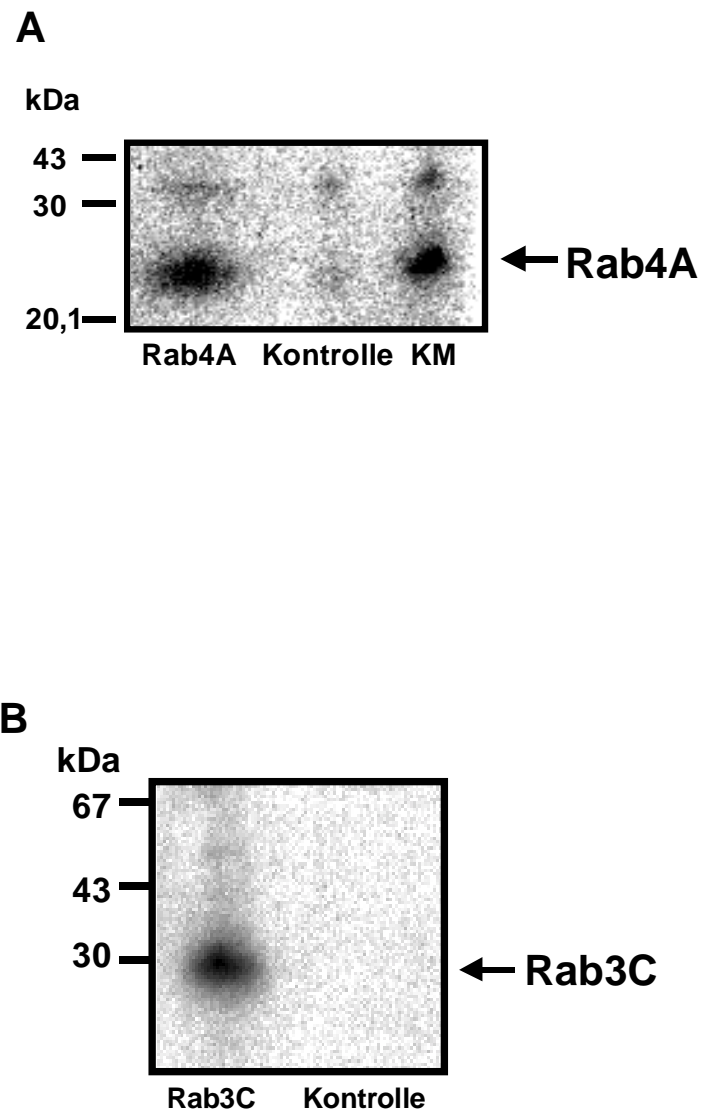


Abb. 7: Nachweis der Überexpression der Rab-GTPasen in H9K6-Myoblasten

Rohmembranfraktionen (20 μ g Protein/ Spur) adulter Kardiomyozyten (KM) oder von H9K6-Myoblasten, die mit pCMV (Kontrolle), pCMV-rab4A oder pCMV-rab3C transient transfiziert waren, wurden per SDS-PAGE aufgetrennt, auf PVDF-Membranen überführt und mit Antiseren gegen Rab4A (Bild A) oder Rab3C (Bild B) immunodetektiert. Dargestellt sind repräsentative Autoradiogramme von drei separaten Experimenten.

Um eine mögliche funktionelle Interaktion dieser GTPasen mit den Glucosetransportern in kardialen Zellen zu untersuchen, wurden H9K6-Myoblasten mit pCMV-rab4A, pCMV-rab3C, oder zur Kontrolle mit pCMV transfiziert und die Glucoseaufnahme in basalen oder insulinstimulierten Zellen wurde gemessen.

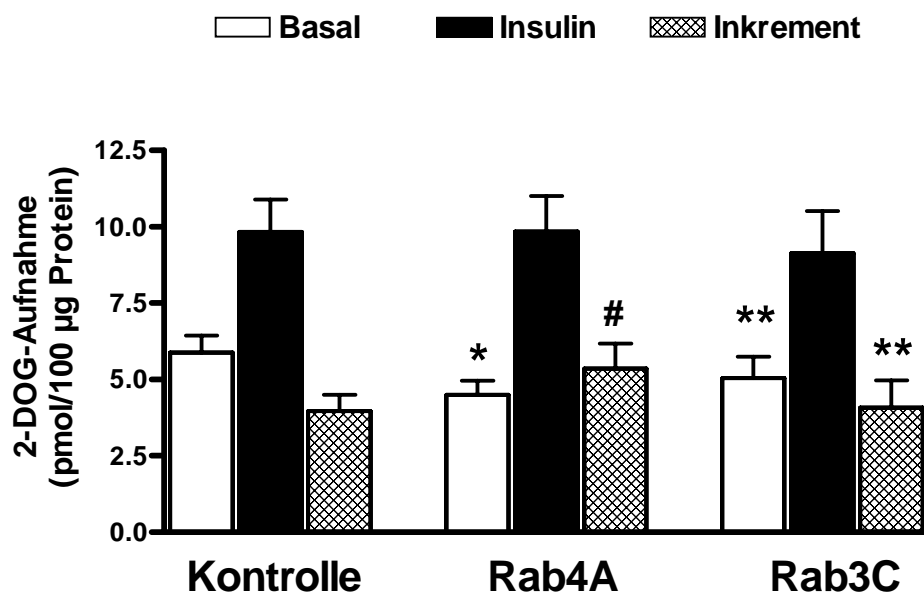


Abb. 8: Einfluß der Überexpression von Rab4A und Rab3C auf die Glucoseaufnahme basaler und insulinstimulierter H9K6-Myoblasten

H9K6-Myoblasten wurden mit pCMV (Kontrolle), pCMV-rab4A oder pCMV-rab3C transfiziert und für 48 h inkubiert. Nach Behandlung für 2,5 h in serumfreiem DMEM-Medium wurde die basale und insulinstimulierte (45 min; 1 µM) Glucoseaufnahme durch Zugabe von 2-Deoxy-D-[^{14}C] glucose (0,2 µCi pro Well) für 30 min gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von neun separaten Experimenten.

* signifikant verschieden von basaler Kontrolle mit $p=0,0071$; # signifikant verschieden von Kontrolle mit $p=0,0232$; ** nicht signifikant verschieden von Kontrolle.

Wie in Abbildung 8 gezeigt, erhöht in Kontrollzellen eine Insulingabe die Glucoseaufnahme um etwa 70% der basalen Aufnahmerate. Die Transfektion von Rab3C hatte keinen signifikanten Effekt auf die basale Glucoseaufnahme, auch Insulin bewirkte unter diesen Bedingungen keine signifikante Änderung der Glucoseaufnahme verglichen mit der Kontrollsituation. Im Gegensatz dazu resultierte die Rab4A-Transfektion in einer signifikanten Erniedrigung der basalen Glucosetransportrate um $31 \pm 5\%$. Insulin stimulierte unter diesen Bedingungen die Glucoseaufnahme um 120%, wobei hier die gleiche maximale Insulinwirkung wie in Kontrollzellen erreicht wurde. Zieht man dabei die durch SuperFect erzielte Transfektionseffizienz von 65 – 70% in Betracht, so kann hieraus geschlossen werden, daß der basale Glucosetransport in Rab4A-transfizierten Zellen um ca 50% reduziert wird. Die durch Rab4A induzierte Verstärkung der Insulinwirkung wird hier zusätzlich durch den inkrementellen Anstieg (graue Balken) dargestellt. Der hier gezeigte Effekt ist spezifisch für Rab4A, wodurch eine generelle Modulation der Insulinsignalkaskade durch nichtspezifische Überexpression von Rab-GTPasen ausgeschlossen werden kann.

Um einen tieferen Einblick in die molekularen Mechanismen der Interaktion von Rab4A mit Glucosetransportern zu erlangen und um zusätzlich zwischen den kardialen GLUT-Isoformen differenzieren zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Technik zur spezifischen Markierung von Zelloberflächen-Proteinen angewendet. Mit dieser konnte die Menge der Isoformen GLUT1 und GLUT4 an der Zelloberfläche der H9K6-Myoblasten bestimmt werden. Hierzu wurden H9K6-Myoblasten mit pCMV oder pCMV-rab4A transfiziert und die Oberflächen basaler und insulinstimulierter Zellen biotinyliert. Lysate und Zelloberflächen-biotinylierte Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit Antiseren gegen GLUT4 oder GLUT1 immunodetektiert, wie in Abbildung 9 A dargestellt. Bild B zeigt die Quantifizierung von GLUT4 an der Zelloberfläche.

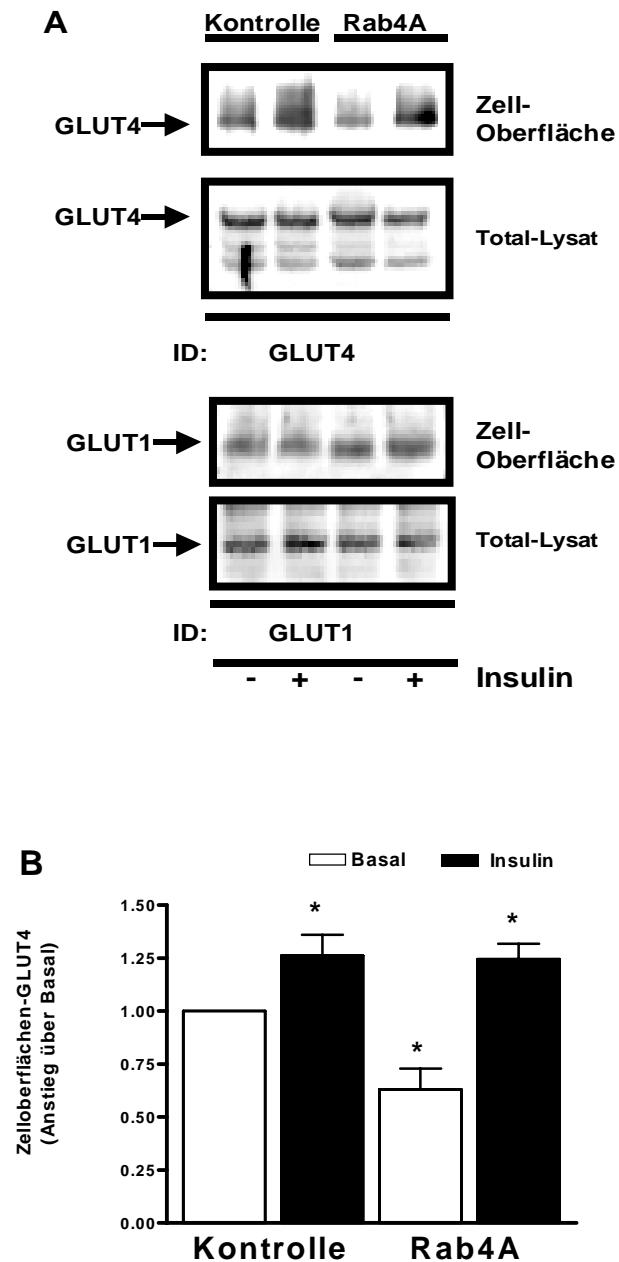


Abb. 9: Einfluß von Rab4A auf die GLUT4-Umverteilung in H9K6-Myoblasten

H9K6-Myoblasten wurden mit 5 – 10 μ g pCMV (Kontrolle) oder pCMV-rab4A transfiziert und 48 h inkubiert. Nach Behandlung für 2,5 h in serumfreiem Medium wurden die Oberflächen basaler und insulinstimulierter (45 min; 1 μ M) Zellen biotinyliert. Die biotinylierten Lysate wurden einer Affinitätsaufreinigung durch Streptavidin unterzogen. Je 15 μ g Lysate oder 3 μ g Zelloberflächen-biotinylierter Fraktionen wurden per SDS-PAGE (8 – 18%) aufgetrennt, auf PVDF-Membranen überführt und mit Antiseren gegen GLUT4 (Bild A) oder GLUT1 immunodetektiert. Dargestellt sind repräsentative Autoradiogramme von drei separaten Experimenten. Bild B zeigt die Quantifizierung in Mittelwerten \pm SEM von drei separaten Experimenten.

* signifikant verschieden von basaler Kontrolle mit $p < 0,05$.

Weder Insulin noch die Rab4A-Überexpression bewirkte eine signifikante Änderung der GLUT1-Gesamtexpression im Vergleich zur Kontrolle. Unter denselben Bedingungen konnte auch keine Veränderung der GLUT1-Menge an der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu vermochte Insulin in Kontrollzellen die GLUT4-Menge an der Zelloberfläche um fast 30% zu steigern. Rab4A-Transfektion löste eine signifikante Erniedrigung des GLUT4-Gehalts an der Oberfläche unbehandelter Zellen um ca 40% aus, wie die Quantifizierung ergab (Abb. 9 B). Zieht man dabei die durch SuperFect erzielte Transfektionseffizienz von 65 – 70% in Betracht, so kann hieraus geschlossen werden, daß allein in transfizierten Zellen der GLUT4-Gehalt an der Zelloberfläche um ca 60% reduziert wird. Unter denselben Bedingungen erhöhte die Stimulation mit Insulin die GLUT4-Menge an der Zelloberfläche um 100%. Diese Daten zeigen klar, daß Rab4A an der Umverteilung von GLUT4 zu einem insulinsensitiven Kompartiment partizipiert. Dies führt schließlich, durch die Insulinwirkung ausgelöst, zu einer Verstärkung der GLUT4-Translokation.

3.2 Regulation der subzellulären Verteilung des Glucosetransporters GLUT4 durch Metaboliten der kardialen 12-Lipoxygenase

3.2.1 Bedeutung des F-Actin-Cytoskelettes für die Regulation der kardialen insulinabhängigen Glucoseaufnahme

Die insulininduzierte Translokation des GLUT4 von intrazellulären Vesikeln zur Plasmamembran als einer der Hauptkurzzeiteffekte dieses Hormons (Kandror & Pilch, 1996; Rea & James, 1997) benötigt die Beteiligung intakter Elemente des Cytoskelettes. Mehrere Arbeitsgruppen konnten in neueren Untersuchungen an Adipozyten und Skelettmuskelzellen mit Hilfe von Inhibitoren des Cytoskelettes zeigen, daß sowohl die Mikrotubuli (Fletcher et al., 2000; Emoto et al., 2001) als auch das F-Actinnetzwerk (Omata et al., 2000; Tsakiridis et al., 1994) über die Vermittlung der GLUT4-Translokation an der durch Insulin regulierten Glucoseaufnahme partizipieren. Auf der Grundlage dieser Daten sollte in dieser Arbeit an isolierten ventrikulären Kardiomyozyten die Bedeutung des F-Actincytoskelettes für die Regulation der kardialen insulinabhängigen Glucoseaufnahme näher charakterisiert werden. Hierzu wurden ventrikuläre Kardiomyozyten isoliert und auf Glasdeckblättchen kultiviert, wie in Abbildung 10 A gezeigt. Die Zellen wurden zunächst in An- oder Abwesenheit des aus *Zygosporium masonii* gewonnenen Cytoskelettdisruptors Cytochalasin D vorbehandelt, fixiert und permeabilisiert. Zur Actin-Färbung wurden sie mit FITC-Phalloidin markiert, die eingedeckten Fixpräparate wurden in einem inversen konfokalen Lasermikroskop betrachtet und analysiert. In Abbildung 10 B ist das grün fluoreszierende Actinnetzwerk ganzer Zellen (Projektion) und einzelner repräsentativer Zellschnittebenen (Sektion) dargestellt. Wie die oberen lichtoptischen Bilder zeigen (Projektion), wird die generelle Form der Zellen nicht wesentlich durch die Vorbehandlung mit Cytochalasin D beeinträchtigt. Im Gegensatz hierzu zeigt die Betrachtung einer Schnittebene des Zellinneren (Sektion), daß im Vergleich zu den streng parallel geordneten Actinfibrillen unbehandelter Zellen eine massive Umorganisation des F-Actincytoskeletts in den Zellen zu beobachten ist, welche mit Cytochalasin D vorbehandelt wurden. Die Exposition mit Cytochalasin D führt also auch in Kardiomyozyten zu einer Schädigung der Actinfibrillen.

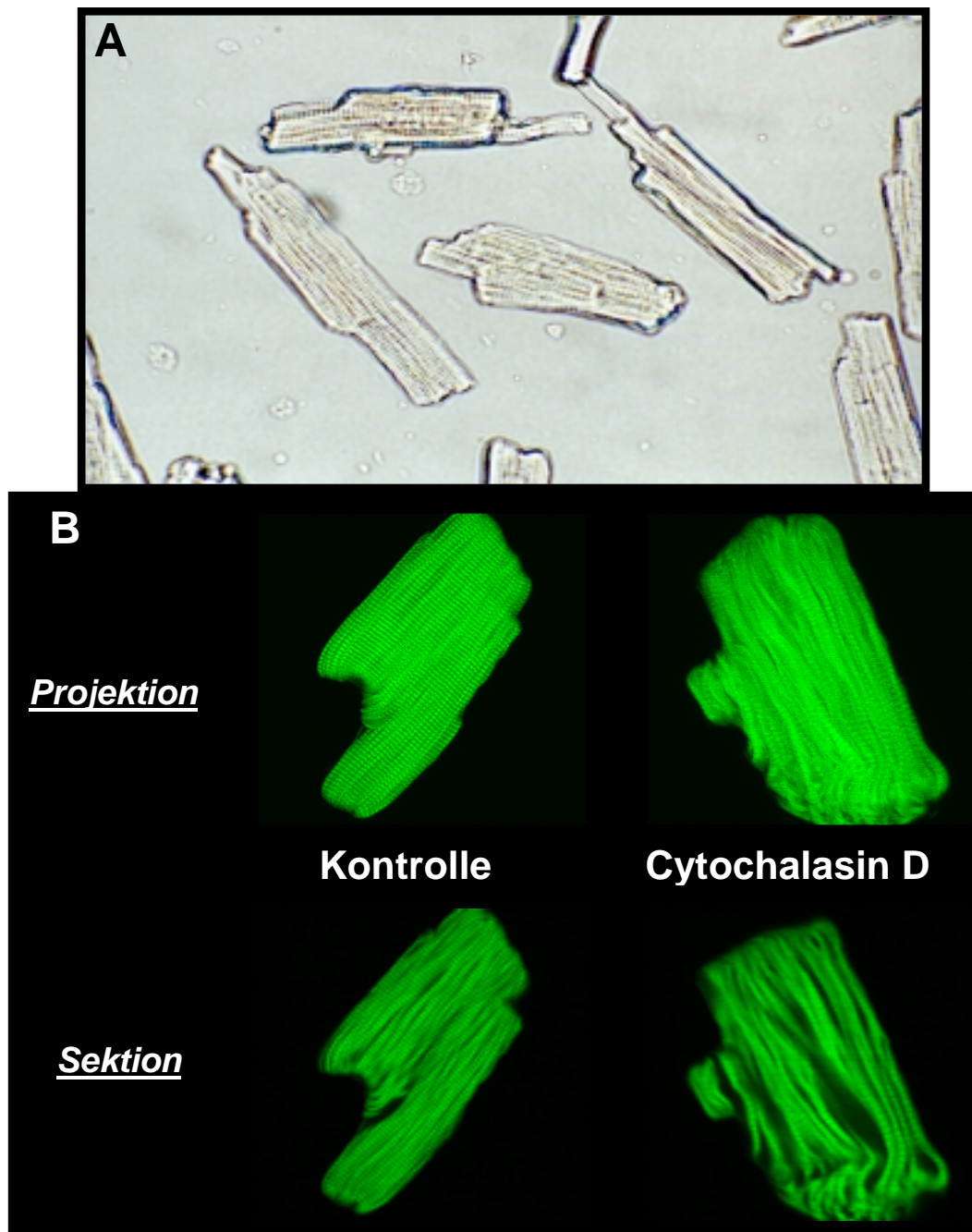


Abb. 10: Einfluß von Cytochalasin D auf die Organisation des F-Actinnetzwerkes in Kardiomyozyten

Ventrikuläre Kardiomyozyten wurden isoliert und für 16 h auf Glasdeckblättchen kultiviert, wie in 2.8 näher beschrieben (Bild A). Die Zellen wurden zunächst für 1 h mit 0,1% (v/v) DMSO oder 1 μ M Cytochalasin D vorbehandelt, dann mit Paraformaldehyd fixiert und mit Triton X-100 permeabilisiert. Sie wurden anschließend zur Actinfärbung mit FITC-Phalloidin in PBS für 16 h bei 6° C inkubiert. Die eingedeckten Fixpräparate wurden in einem inversen konfokalen Lasermikroskop (Leica) betrachtet und analysiert. Das grün gefärbte Actinnetzwerk ganzer Zellen ist oben als ' 'Projektion' ' dargestellt, einzelne Zellschnittebenen sind unten mit ' 'Sektion' ' bezeichnet (Bild B). Dargestellt sind repräsentative Fluoreszenzfärbungen von drei separaten Experimenten.

Es sollte nun eine mögliche Bedeutung des F-Actincytoskelettes für die Regulation der kardialen insulinabhängigen Glucoseaufnahme näher charakterisiert werden. Hierzu wurden frisch isolierte Kardiomyozyten in Suspension in An- oder Abwesenheit von Cytochalasin D inkubiert. Anschließend wurde die basale oder insulinstimulierte Glucoseaufnahme gemessen. Wie in Abbildung 11 dargestellt, vermochte Insulin die Glucoseaufnahme in Kontrollzellen um das fünffache zu steigern. In Zellen, die mit Cytochalasin D vorbehandelt waren, blieb zunächst die basale Glucoseaufnahme unverändert. Dies deutet darauf hin, daß mögliche nicht-spezifische, durch Cytochalasin D ausgelöste zelluläre Stessreaktionen weitgehend ausgeschlossen werden können. Unter denselben Bedingungen vermochte Insulin jedoch nicht die Glucoseaufnahme signifikant zu steigern, es kam hier also zu einer vollständigen Blockade des insulinstimulierten Glucosetransportes, was mit den oben erwähnten, an Adipozyten und Skelettmuskeln erhobenen Daten gut übereinstimmt.

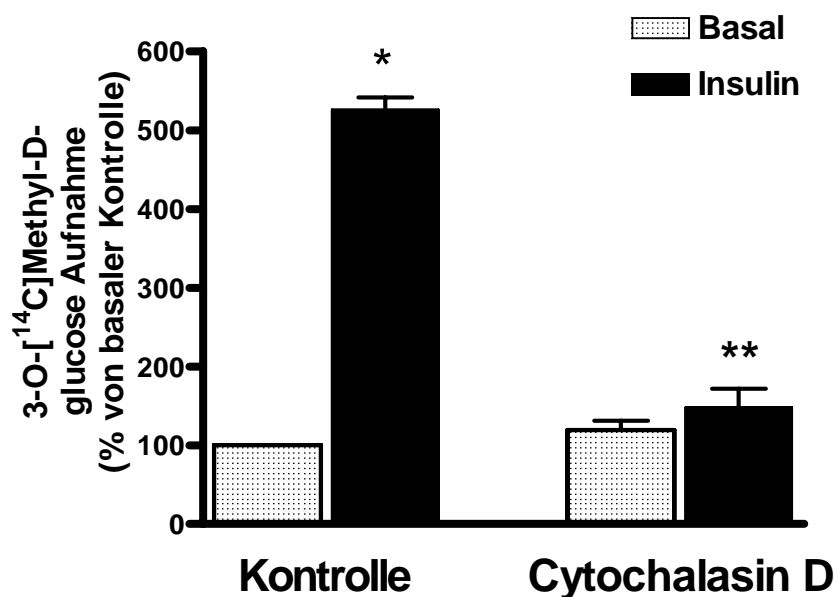


Abb. 11: Einfluß von Cytochalasin D auf die basale und insulinstimulierte Glucoseaufnahme in Kardiomyozyten

Frisch isolierte Kardiomyozyten in Suspension wurden für 1 h mit 0,1% (v/v) DMSO oder mit Cytochalasin D (1 μ M) behandelt, gefolgt von einer Inkubation für 5 min mit oder ohne Insulin (100 nM). Anschließend wurde die Glucoseaufnahme für 10 sec gemessen durch Zugabe von 3-O-[14 C] Methyl-D-glucose (100 μ M). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von vier separaten Experimenten. * signifikant verschieden von basaler Kontrolle mit $p < 0,05$. ** nicht signifikant verschieden von Basal.

3.2.2 Charakterisierung der kardialen 12-Lipoxygenase und ihr Einfluß auf die Organisation des F-Actinnetzwerkes

Die genauen Mechanismen, die zur Umorganisation des an der Vermittlung der insulininduzierten GLUT4-Translokation beteiligten Actinnetzwerkes führen, sind bislang noch ungenügend aufgeklärt. Neuere Studien über die Organisation von Actinfilamenten konnten die Beteiligung von Lipoxygenasemetaboliten an der Organisation des F-Actin-Netzwerkes aufzeigen (Kang & Vanderhoek, 1998; Kang et al., 1999; Rice et al., 1998; Tang et al., 1994; Tang et al., 1993 A & B). Obwohl die Charakterisierung von Lipoxygenaseisoformen noch eingehender Aufklärung bedarf (Funk, 1996; Brash, 1999; Kuhn & Thiele, 1999), wurde am Rattenherzen vorwiegend die Expression der 12-LO-Isoform nachgewiesen (Breitbart et al., 1996). Im folgenden sollte eine mögliche Beteiligung von LO-Metaboliten sowohl an der Reorganisation des Cytoskelettes als auch an der insulinabhängigen Glucoseaufnahme in Kardiomyozyten untersucht werden. Zur näheren Charakterisierung der kardialen 12-LO-Isoform wurden zunächst unbehandelte ventrikuläre Kardiomyozyten auf Glasdeckblättchen kultiviert, wie in Abbildung 12 gezeigt. In den fixierten und permeabilisierten Zellen wurde dann spezifisch die 12-LO und das F-Actin angefärbt. Die Fixpräparate wurden in einem inversen konfokalen Lasermikroskop betrachtet und analysiert. In Abbildung 12 A ist oben die 12-LO-gekoppelte Immunfluoreszenz in rot dargestellt, die Mitte (B) zeigt das grün gefärbte Actinnetzwerk, der untere Abschnitt (C) die Kombination aus beiden. Das Actincytoskelett zeigte sich im perinukleären Zellschnitt über die ganze Länge der spindelförmigen Kardiomyozyten in strikt parallel verlaufenden Fasern angeordnet. Hier waren außerdem die zur Actinfilamentachse 90° C versetzt verlaufenden A-Banden und Z-Scheiben in paralleler Anordnung zu erkennen. Diese Struktur zog sich auch bis in membrannahere Bereiche, wie im unteren Bildteil zu erkennen. Im Gegensatz dazu wurde für die 12-LO (links) eine eher homogene Verteilung in Kardiomyozyten detektiert, bei verstärkter Anfärbung der Randbereiche. Dieser Befund wurde deutlicher in membrannaheren Zellschnitten (rechts), wo eine stark punktierte 12-LO-spezifische Anfärbung zu erkennen war. Es wurde in den Kardiomyozyten unter den gegebenen Bedingungen keine Colokalisation der 12-LO mit dem F-Actinnetzwerk detektiert.

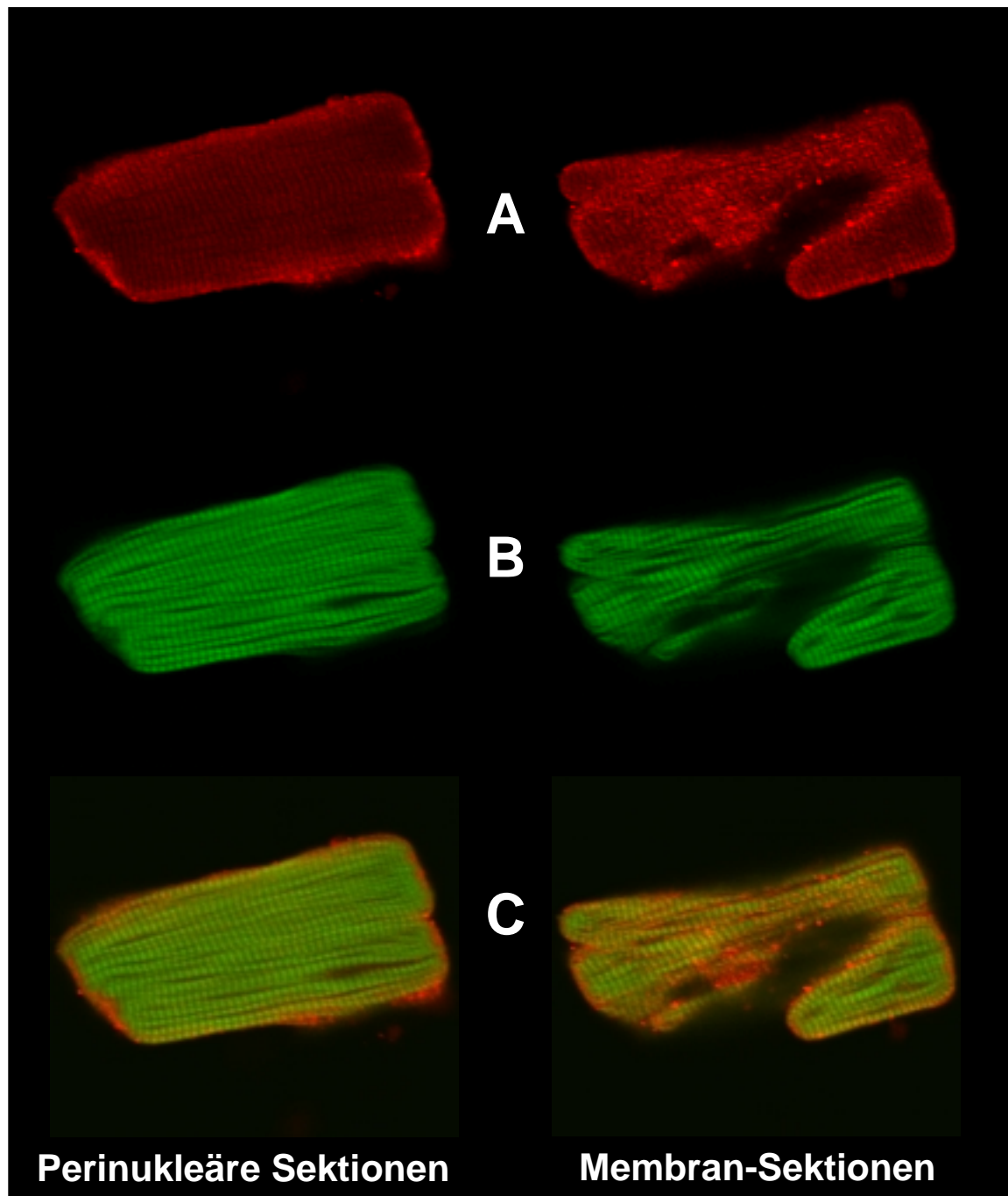


Abb. 12: Immunfluoreszenzdetektion von F-Actin und 12-LO in Kardiomyozyten

Ventrikuläre Kardiomyozyten wurden isoliert und für 16 h auf Glasdeckblättchen kultiviert, wie in Abb. 9 A gezeigt. Die Zellen wurden mit Paraformaldehyd fixiert und dann mit Triton X-100 permeabilisiert. Die Zellen wurden mit Anti-12-LO-Antiserum und FITC-Phalloidin in PBS für 16 h bei 6° C, anschließend für 2 h bei RT mit Cy3-markiertem Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper in PBS inkubiert. Die eingedeckten Fixpräparate wurden in einem inversen konfokalen Lasermikroskop (Leica) betrachtet und analysiert. Oben (A) ist die 12-LO-gekoppelte Immunfluoreszenz in rot dargestellt, die Mitte (B) zeigt das grün gefärbte Actinnetzwerk, der untere Abschnitt (C) die Kombination aus beidem. Dargestellt sind repräsentative Fluoreszenzfärbungen von drei separaten Experimenten.

Zur Darstellung der Inhibition der 12-LO-Isoform wurden zunächst ventrikuläre Kardiomyozyten isoliert und dann mit dem aus *Larrea tridentata* gewonnenen LO-Inhibitor NDGA, oder dem aus *Artemisia montana* isolierten LO-Inhibitor Esculetin vorbehandelt. Von den Zellen wurden Phospholipidextrakte hergestellt und der 12(S)-HETE-Gehalt per ELISA bestimmt.

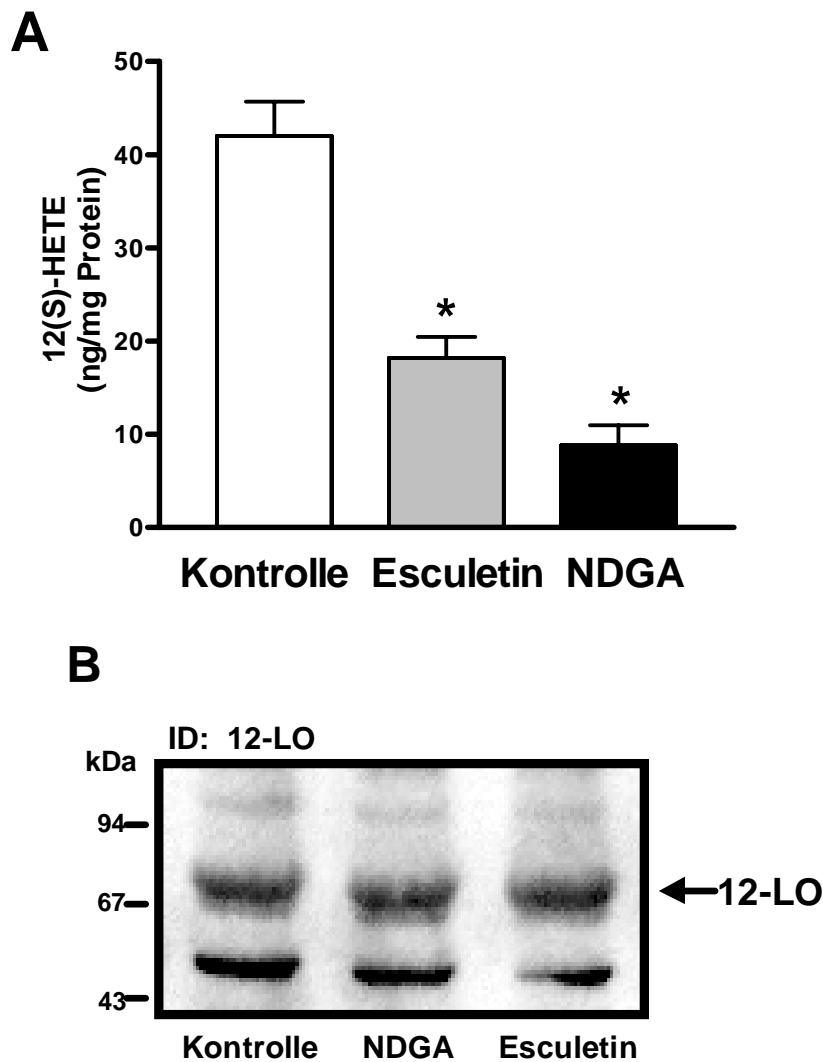


Abb. 13: Charakterisierung der Inhibition der kardialen 12-LO-Isoform

Kardiomyozyten wurden zunächst mit 0,1% (v/v) DMSO (Kontrolle), 50 μ M NDGA (1 h) oder 100 μ M Esculetin (16 h) vorbehandelt. Von diesen wurden Phospholipid-Extrakte hergestellt (2.23) und der 12(S)-HETE-Gehalt wurde per ELISA bestimmt (Bild A). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von drei separaten Experimenten.

* signifikant verschieden von basaler Kontrolle mit $p < 0,05$.

Lysate der vorbehandelten Zellen wurden per SDS-PAGE (8 – 18%) aufgetrennt, auf PVDF-Membranen überführt und mit einem Antiserum gegen 12-LO immunodetektiert (Bild B). Dargestellt ist ein repräsentatives Autoradiogramm von drei separaten Experimenten.

Wie in Abbildung 13 A gezeigt, wurde in unbehandelten Kardiomyozyten ein 12(S)-HETE-Gehalt von $42,0 \pm 3,66$ ng pro mg Protein gefunden. Die Exposition der Kardiomyozyten mit den LO-Inhibitoren resultierte in einer massiven Reduktion des 12(S)-HETE-Gehaltes auf $18,2 \pm 2,27$ ng (= 67%ige Hemmung der 12-LO durch Esculetin), bzw. $8,8 \pm 2,17$ ng (= 83%ige 12-LO-Hemmung durch NDGA). Um mögliche Einflüsse der 12-LO-Inhibition auf ihre Expression zu messen, wurden Lysate der vorbehandelten Zellen per SDS-PAGE aufgetrennt, auf PVDF-Membranen überführt und mit einem Antiserum gegen 12-LO immunodetektiert. Wie in Abbildung 13 B gezeigt, konnte die kardiale 12-LO bei einer Masse von 70 –75 kDa detektiert werden. Im Vergleich zu unbehandelten Zellen konnten hier keinerlei Veränderungen des Gesamtgehaltes an 12-LO durch die 12-LO-Inhibition in Kardiomyozyten festgestellt werden.

Zur Charakterisierung möglicher Einflüsse der LO-Inhibitoren auf die Organisation des F-Actinnetzwerkes in Kardiomyozyten wurden diese mit NDGA und Esculetin vorbehandelt, und analog zur Behandlung der in Abbildung 10 und 12 dargestellten Präparate fixiert und permeabilisiert. Sie wurden dann zur Actinfärbung mit FITC-Phalloidin markiert, die eingedeckten Fixpräparate wurden in einem inversen konfokalen Lasermikroskop betrachtet und analysiert. In Abbildung 14 ist das grün fluoreszierende Actinnetzwerk ganzer Zellen (Projektion) und einzelner repräsentativer Zellschnittebenen (Sektion) dargestellt. Die intakte Struktur der Actinfibrillen unbehandelter Zellen wurde bereits in Abbildung 12 eingehend beschrieben. Wie die linken Bilder (Projektion) zeigen, wurde die Form der mit den LO-Inhibitoren inkubierten Zellen nicht wesentlich durch die Vorbehandlung beeinträchtigt. Im Gegensatz hierzu zeigten Schnitte (Sektion) repräsentativer Zellen, die mit Esculetin oder NDGA behandelt waren, eine massive Umorganisation der Actinfibrillen. Diese waren nicht mehr strikt parallel angeordnet, es erschienen größere ungefärbte Bereiche im Vergleich zur dichten, lückenlosen Struktur der Kontrollzellen. Die unter diesen Bedingungen zu erkennende Umorganisation des Actincytoskelettes war vergleichbar mit dem Effekt, welcher durch den oben näher beschriebenen Cytoskelettdisruptor Cytochalasin D ausgelöst wurde (Siehe Abb. 10).

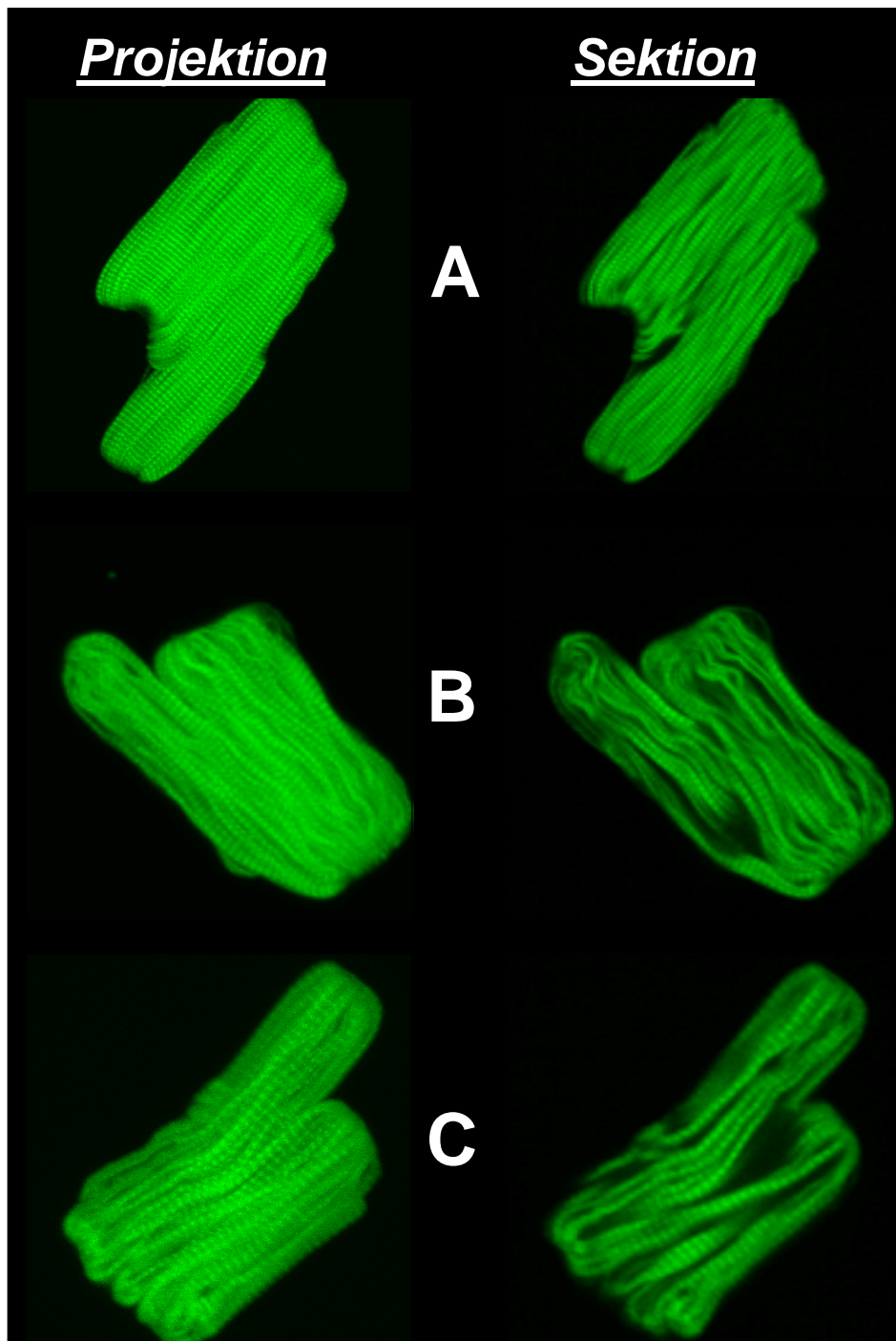


Abb. 14: Einfluß der LO-Inhibitoren auf die Organisation des F-Actinnetzwerkes in Kardiomyozyten

Kultivierte Kardiomyozyten wurden zunächst für 1 h mit 0,1% (v/v) DMSO (A), oder 50 μ M NDGA (B), oder für 16 h mit 100 μ M Esculetin (C) vorbehandelt, dann mit Paraformaldehyd fixiert und mit Triton X-100 permeabilisiert. Sie wurden anschließend zur Actinfärbung mit FITC-Phalloidin in PBS für 16 h bei 6° C inkubiert. Die eingedeckten Fixpräparate wurden in einem inversen konfokalen Lasermikroskop (Leica) betrachtet und analysiert. Das grün gefärbte Actinnetzwerk ganzer Zellen ist links als ' ' Projektion' ' dargestellt. Einzelne Zellschnittebenen sind rechts mit ' ' Sektion' ' bezeichnet. Dargestellt sind repräsentative Fluoreszenzfärbungen von drei separaten Experimenten.

3.2.3 Einfluß von Metaboliten der 12-Lipoxygenase auf die Regulation der kardialen insulinabhängigen Glucoseaufnahme

Da auf der Ebene der Organisation des Actincytoskelettes vergleichbare Effekte von Cytochalasin D und den LO-Inhibitoren gefunden wurden, wurden nun analog dazu mögliche Einflüsse der LO-Inhibitoren auf die basale und insulinstimulierte Glucoseaufnahme der Kardiomyozyten untersucht. Hierzu wurden zuerst frisch isolierte Kardiomyozyten mit steigenden Konzentrationen von NDGA vorbehandelt, gefolgt von einer Inkubation mit oder ohne Insulin. Mit der höchsten NDGA-Dosis vorbehandelte Zellen wurden zusätzlich in An- oder Abwesenheit von 12(S)-HETE inkubiert, anschließend wurde die Glucoseaufnahme gemessen. Wie in Abbildung 15 dargestellt, steigert Insulin die Glucoseaufnahme in Kontrollzellen um das vier- bis fünffache. Die basale Glucoseaufnahme der mit NDGA behandelten Zellen blieb unbeeinflusst von der Exposition mit dem Inhibitor. Die Rate der insulininduzierten Glucoseaufnahme blieb in Zellen, die mit der niedrigsten NDGA-Dosis (0,5 μ M) behandelt waren, nicht signifikant verändert, jedoch zeigte sich bei 5 μ M NDGA eine ca 50%ige, signifikante Hemmung des Insulineffektes. Inkubation der Kardiomyozyten mit der höchsten NDGA-Dosis (50 μ M) führte hier zu einer kompletten Hemmung des Insulineffektes. Um die Spezifität dieser Hemmung näher zu untersuchen, wurden mit der höchsten NDGA-Dosis vorbehandelte Zellen zusätzlich in An- oder Abwesenheit des 12-LO-Metaboliten 12(S)-HETE inkubiert. Unter diesen Bedingungen konnte 70% der insulinregulierten Steigerung der Glucoseaufnahme in Kontrollzellen wieder erreicht werden. Die exogene Zugabe des Produktes der 12-LO umging unter diesen Bedingungen also die inhibitorische Wirkung des NDGA.

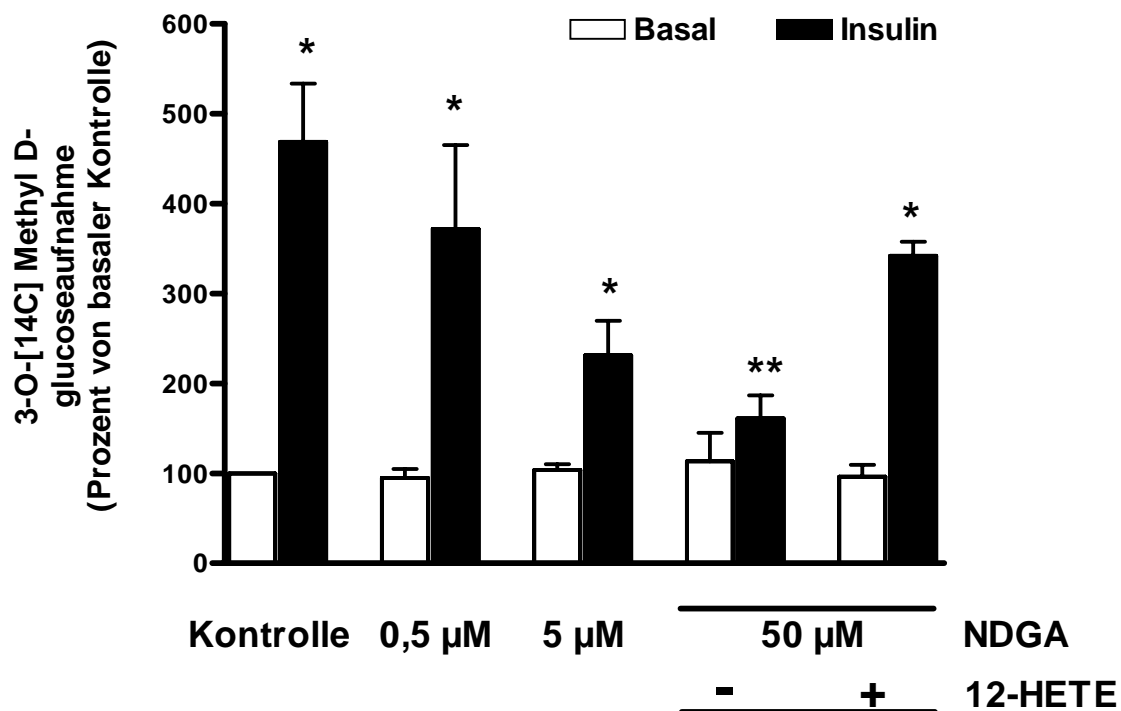


Abb. 15: Einfluß von NDGA auf die basale und insulinstimulierte Glucoseaufnahme in Kardiomyozyten

Frisch isolierte Kardiomyozyten in Suspension wurden für 1 h mit 0,1% (v/v) DMSO oder mit steigenden Konzentrationen von NDGA (0,5 µM – 50 µM) behandelt, gefolgt von einer Inkubation für 5 min mit oder ohne Insulin (100 nM). Mit 50 µM NDGA vorbehandelte Zellen wurden zusätzlich in An- oder Abwesenheit von 3 µM 12(S)-HETE inkubiert. Anschließend wurde die Glucoseaufnahme für 10 sec gemessen durch Zugabe von 3-O-[¹⁴C] Methyl-D-glucose (100 µM). Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von vier separaten Experimenten. * signifikant verschieden von basaler Kontrolle mit $p < 0,05$. ** nicht signifikant verschieden von Basal.

Zur Untersuchung der Wirkung des von NDGA strukturell unterschiedlichen LO-Inhibitors Esculetin auf die Glucoseaufnahme wurden Kardiomyozyten mit Esculetin kultiviert, anschließend wurde die basale und insulinstimulierte Glucoseaufnahme gemessen. Die Abbildung 16 zeigt einen zwei- bis dreifachen Anstieg der Transportrate in Kontrollzellen, welche mit Insulin stimuliert wurden. Analog zu den in Abb. 15 gezeigten Daten wurde auch in Zellen, die mit dem LO-Inhibitor Esculetin vorbehandelt wurden, eine vollständige Hemmung der insulininduzierten Glucoseaufnahme gemessen. Die basale Glucoseaufnahme blieb von der 12-LO-Inhibition unbeeinflusst.

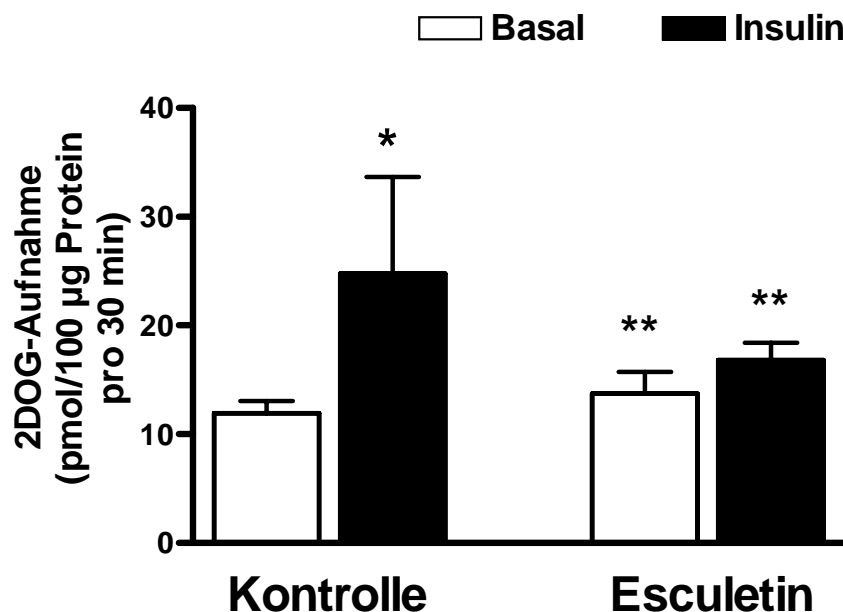


Abb. 16: Einfluß von Esculetin auf die basale und insulinstimulierte Glucoseaufnahme in Kardiomyozyten

Ventrikuläre Kardiomyozyten wurden isoliert und für 16 h mit 0,1% (v/v) DMSO oder 100 µM Esculetin kultiviert. Nach Vorbehandlung für 3 h in Kulturmedium II (siehe 2.8) wurde die basale und insulinstimulierte (1 h; 1 µM) Glucoseaufnahme durch Zugabe von 2-Deoxy-D-[^{14}C] glucose (0,4 µCi pro Well) für 30 min gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von vier separaten Experimenten. * signifikant verschieden von basaler Kontrolle mit $p < 0,05$. ** nicht signifikant verschieden von Basal.

Durch die beiden strukturell voneinander verschiedenen LO-Inhibitoren konnte die Steigerung der Glucoseaufnahme als kurzzeitige zelluläre Reaktion auf die Insulingabe massiv unterbunden werden. Hieraus ergab sich die Fragestellung, ob die 12-LO-Produkte möglicherweise an der Beeinflussung von Elementen der Insulinsignalkaskade beteiligt sind, die der Translokation von GLUT4 vorgeschaltet sind. Um dies zu untersuchen, wurden Kardiomyozyten in An- oder Abwesenheit von NDGA vorbehandelt. Lysate dieser Zellen wurden mit Antiseren gegen IRS-1 und IRS-2 immunopräzipitiert, die Immunopellets wurden per SDS-PAGE aufgetrennt, auf Membranen überführt und mit Antiseren gegen IRS-1, IRS-2, oder Phospho-Tyrosin immunodetektiert.

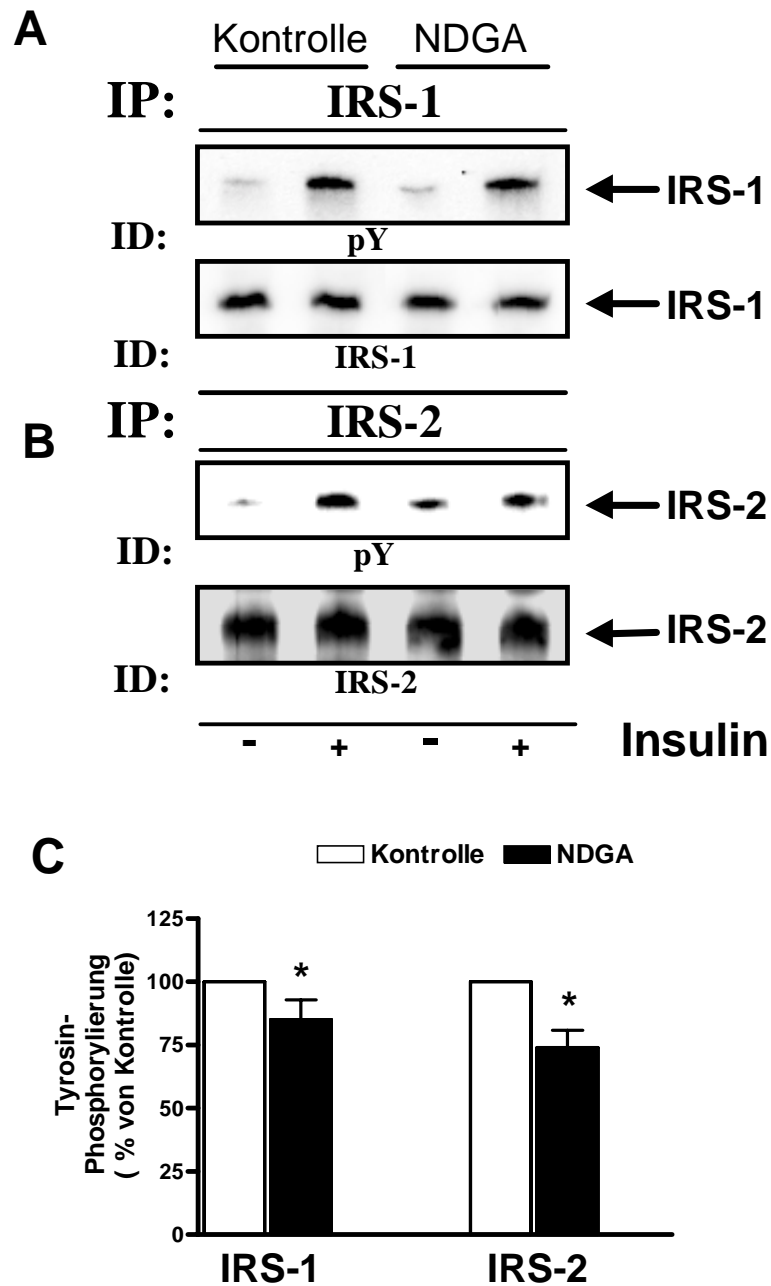


Abb. 17: Einfluß der 12-LO-Hemmung auf die Tyrosinphosphorylierung von IRS-1 und IRS-2 in Kardiomyozyten

Kardiomyozyten wurden zunächst mit 0,1% (v/v) DMSO oder 50 μ M NDGA (1 h) vorbehandelt. RIPA-Lysate dieser Zellen wurden mit Antiseren gegen IRS-1 (A) oder IRS-2 (B) immunopräzipitiert, Immunopellets der Lysate wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und mit Antiseren gegen Phospho-Tyrosin (pY), IRS-1, oder IRS-2 immunodetektiert. Oben dargestellt sind repräsentative Autoradiogramme von mindestens vier separaten Experimenten. Bild C zeigt unten die Quantifizierung.

* signifikant unterschiedlich von Kontrolle mit $p < 0,05$.

Wie in Abbildung 17 zu sehen, steigerte in Kontrollzellen Insulin die Tyrosinphosphorylierung von IRS-1 4,6-fach (Bild A) verglichen mit unbehandelten Zellen, während IRS-2 eine 3,5-fache Erhöhung als Antwort auf den Hormonstimulus erfuhr (Bild B). Mögliche Einflüsse der LO-Inhibitoren auf den Gesamtgehalt der Zellen an IRS-1 und IRS-2 konnten hier ausgeschlossen werden. Zellen, welche mit dem LO-Inhibitor NDGA behandelt wurden, wiesen eine nur schwach veränderte Modifizierung dieses Phosphorylierungsmusters im Vergleich zu Kontrollzellen auf. Wie die Quantifizierung ergab (Bild C), so wurde unter diesen Bedingungen die Tyrosinphosphorylierung von IRS-1 um $15 \pm 7,9\%$ reduziert, während sich die Tyrosinphosphorylierung von IRS-2 um $25 \pm 6,9\%$ erniedrigte.

Weiterhin sollte untersucht werden, ob die 12-LO-Aktivität möglicherweise die insulinstimulierte Assoziation der p85-Untereinheit der PI 3-Kinase an IRS-1 sowie die insulinabhängige Phosphorylierung der Proteinkinase B (Akt) beeinflusst. Daher wurden analog zum oben beschriebenen Experiment Kardiomyozyten in An- oder Abwesenheit von NDGA vorbehandelt. Lysate dieser Zellen wurden mit einem Antiserum gegen IRS-1 immunopräzipitiert, die Immunopellets und Lysate der vorbehandelten Zellen wurden per SDS-PAGE aufgetrennt, auf Membranen überführt und mit Antiseren gegen p85, Phospho-Akt und Akt immunodetektiert. Wie in Abbildung 18 gezeigt, wurde in insulinstimulierten Zellen, die mit dem LO-Inhibitor NDGA behandelt waren, eine im Vergleich zu Kontrollzellen unveränderte Assoziation der PI 3-Kinase an IRS-1 als Effekt der Hormonwirkung gemessen. Auch die Phosphorylierung der Proteinkinase Akt blieb in den insulinstimulierten Zellen, die mit dem LO-Inhibitor NDGA behandelt waren, nicht signifikant verändert im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

Zusammenfassend kann man sagen, daß unter diesen Bedingungen durch die Hemmung der 12-LO-Aktivität zwar auf der Ebene der Insulinrezeptorsubstrate eine leichte Abschwächung der Signalweiterleitung induziert wird, diese jedoch offenbar nicht ausreicht, um inhibierend in nachgeschaltete Elemente der Insulinsignalkaskade einzugreifen, welche zur GLUT4-Translokation und letztlich zur Steigerung der Glucoseaufnahme führen.

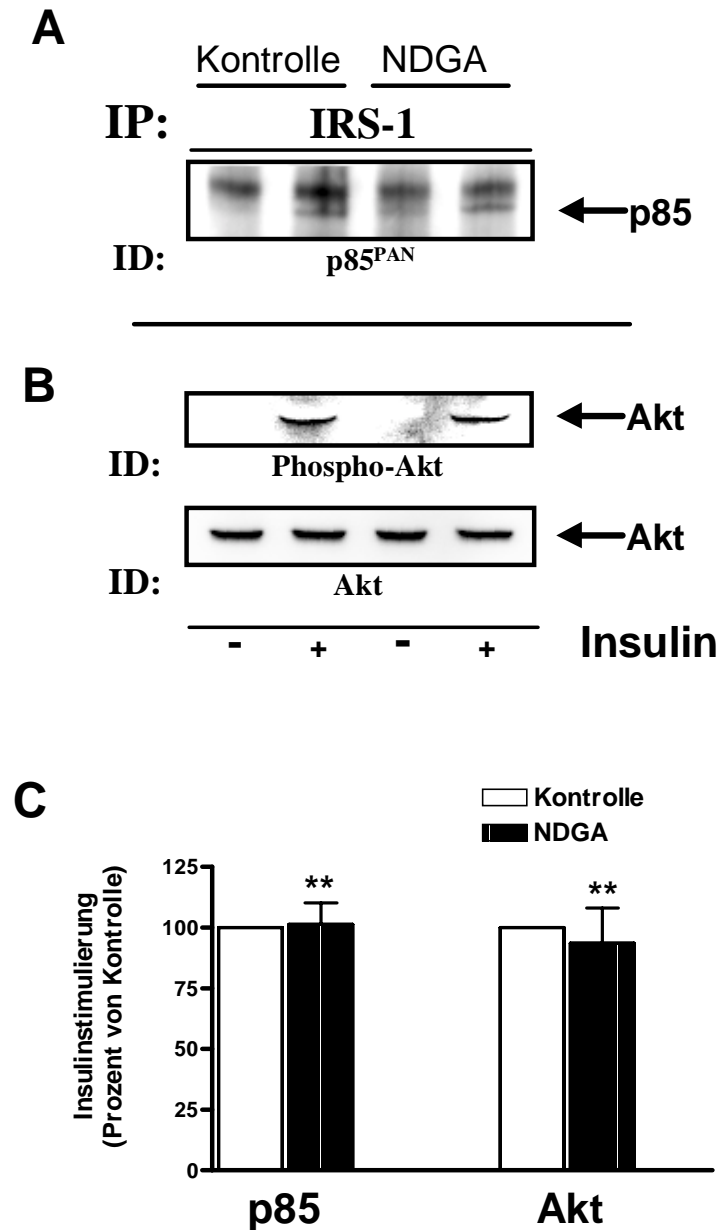


Abb. 18: Einfluß der 12-LO-Hemmung auf der IRS-Ebene nachgeschaltete Elemente der Insulinsignalkaskade in Kardiomyozyten

Kardiomyozyten wurden zunächst mit 0,1% (v/v) DMSO oder 50 μ M NDGA (1 h) vorbehandelt. RIPA-Lysate dieser Zellen wurden mit IRS-1-Antiserum immunopräzipitiert, Lysate und IRS-1-Immunopellets wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und mit Antiseren gegen p85 (A) oder Phospho-Akt und Akt (B) immunodetektiert. Dargestellt sind repräsentative Autoradiogramme von vier separaten Experimenten. Bild C zeigt die Quantifizierung. ** nicht signifikant unterschiedlich von Kontrolle.

3.2.4 Einfluß von Metaboliten der 12-Lipoxygenase auf die insulinabhängige Umverteilung von GLUT4

Es konnte bisher in Kardiomyozyten eine Beteiligung von Actinfibrillen an der Regulation der insulinabhängigen Glucoseaufnahme nachgewiesen werden, was in Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen am Skelettmuskel und Adipozyten bestätigt wurde (Omata et al., 2000; Tsakiridis et al., 1994). Desweiteren konnte ein funktioneller Zusammenhang aufgezeigt werden zwischen Produkten der kardialen 12-LO und der Auslösung einer Reorganisation des F-Actincytoskelettes, welche letztlich eine Hemmung der Insulinwirkung auf der Ebene der Glucoseaufnahme zur Folge hat. Da die 12-LO-Metaboliten, wie oben gezeigt, nicht in frühe Ereignisse der Insulinsignalkaskade eingreifen, sollte nun die mechanistische Grundlage der gestörten Insulinwirkung von solchen Signalprozessen untersucht werden, die der PI 3-Kinase nachgeschaltet sind. Hieraus ergab sich der Ansatz, den Einfluß der 12-LO-Inhibition auf die insulinstimulierte GLUT4-Umverteilung in Kardiomyozyten zu messen. Hierzu wurden isolierte Kardiomyozyten in An- oder Abwesenheit von Esculetin kultiviert. Dann wurden die Zelloberflächen basaler oder insulinstimulierter Zellen biotinyliert. Lysate oder Zelloberflächen-biotinylierte Fraktionen wurden anschließend per SDS-PAGE aufgetrennt, auf Membranen überführt und mit Antiseren gegen GLUT4 oder GLUT1 immunodetektiert. Wie in Abbildung 19 A gezeigt, konnten Einflüsse der durch Esculetin induzierten 12-LO-Hemmung auf den Gesamtgehalt der Isoformen GLUT1 und GLUT4 in den Kardiomyozyten ausgeschlossen werden. Weder Insulin, noch Esculetin induzierten signifikante Alterationen im GLUT1-Gehalt an der Zelloberfläche.

Im Gegensatz hierzu verursachte in Kontrollzellen der Insulinstimulus einen signifikanten Anstieg von GLUT4 an der Zelloberfläche. Die Quantifikation ergab eine insulininduzierte Steigerung um 214% über Basal (Siehe Abb. 19 B). Jedoch in Zellen, die mit Esculetin vorbehandelt waren, vermochte Insulin nicht den GLUT4-Gehalt an der Zelloberfläche der Kardiomyozyten zu steigern. Hieraus kann gefolgert werden, daß die Reduzierung des 12(S)-HETE-Gehaltes einen Verlust der insulinregulierten GLUT4-Translokation in Kardiomyozyten verursacht.

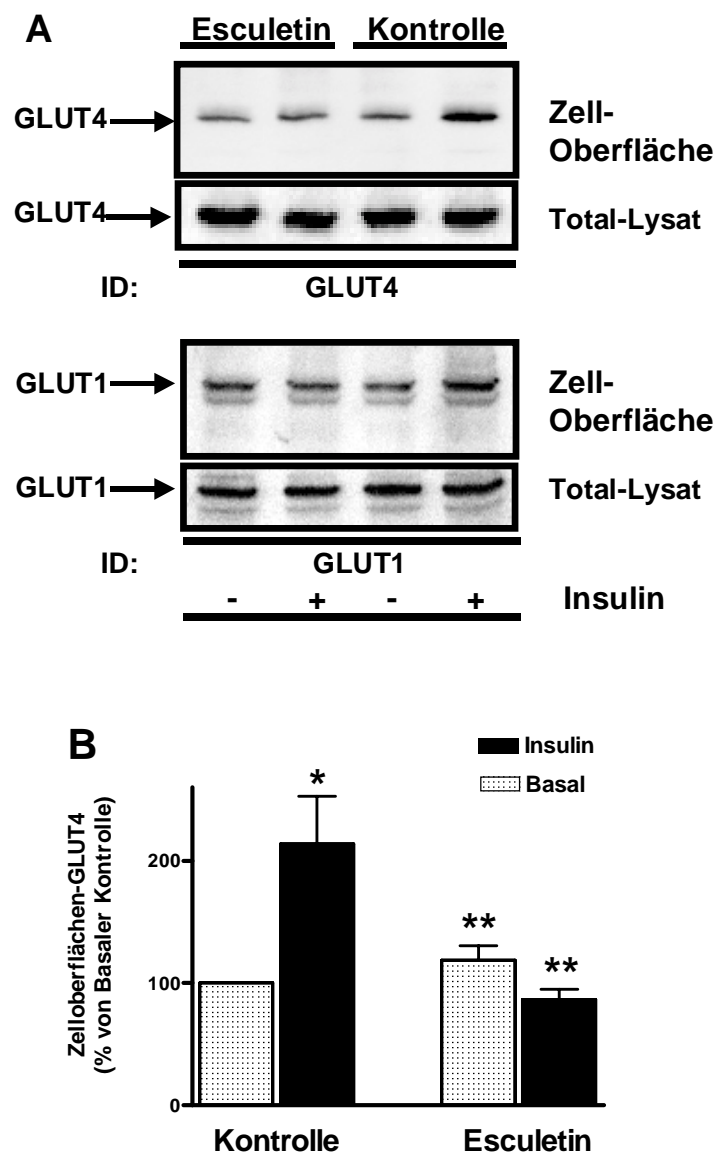


Abb. 19: Einfluß von Esculetin auf die insulinstimulierte GLUT4-Umverteilung in Kardiomyozyten

Ventrikuläre Kardiomyozyten wurden isoliert und für 16 h mit 0,1% (v/v) DMSO oder 100 μ M Esculetin kultiviert. Nach Vorbehandlung für 3 h in Kulturmedium II (Siehe 2.8) wurden die Zelloberflächen unbehandelter oder insulinstimulierter (1 h; 1 μ M) Zellen biotinyliert (Siehe 2.12). Je 15 μ g Lysat oder 3 μ g Zelloberflächen-biotinylierter Fraktionen wurden per SDS-PAGE (8 – 18%) aufgetrennt, auf PVDF-Membranen überführt und mit Antisera gegen GLUT4 oder GLUT1 immunodetektiert. Dargestellt sind repräsentative Autoradiogramme von drei separaten Experimenten (Bild A). Bild B zeigt die Quantifizierung in Mittelwerten \pm SEM von drei separaten Experimenten.

* signifikant verschieden von basaler Kontrolle mit $p < 0,05$.

** nicht signifikant verschieden von basaler Kontrolle.

IV. Diskussion

4.1 Charakterisierung neonataler kardialer H9K6-Myoblasten mit stabiler GLUT4-Expression

Ein detailliertes Verständnis der molekularen Mechanismen der Insulinwirkung, welche die kardiale Glucoseaufnahme bestimmen, ist von großem Interesse (Eckel, 1989). Wie in früheren Studien unserer Arbeitsgruppe beschrieben, wurden isolierte ventrikuläre Kardiomyozyten bereits erfolgreich zur Analyse der insulinregulierten Glucoseaufnahme eingesetzt (Till et al., 1997; Bähr et al., 1996; Bähr et al., 1995; Eckel et al., 1991; Eckel et al., 1983). Frisch isolierte Kardiomyozyten weisen eine hohe GLUT4-Expression auf. Studien unserer Arbeitsgruppe zufolge unterliegt das GLUT4-Transkript jedoch nach 48 h in Primärkultur einer spezifischen Degradierung, gleichzeitig erfolgt ein Anstieg der GLUT1-Expression (von Holtey, 1996; Dransfeld et al., 2000). Dieser Umstand schließt die sinnvolle Nutzung kultivierter Kardiomyozyten für Langzeit-Studien der Insulinwirkung unter Berücksichtigung des GLUT4 und der Glucosetransportebene aus. Vergleichbare Beobachtungen wurden diesbezüglich auch an Adipozyten gemacht (Gerrits et al., 1993).

In der vorliegenden Arbeit wurden ausgewählte Parameter der Insulinwirkung an Myoblasten des stabil GLUT4-überexprimierenden Klones H9K6 charakterisiert. H9c2-Wildtypzellen weisen im Myoblastenstadium ein niedriges Niveau der GLUT4-Expression auf. Diese Beobachtung steht in Einklang mit einer Studie von Lu und Mitarbeitern, derzufolge das niedrige Niveau der GLUT4-Expression auf der Ebene der RNA in H9c2-Myoblasten erst im Verlauf der Differenzierung zu Myotuben wesentlich ansteigt. Nach ihren Befunden trifft dies jedoch nicht auf die GLUT1-Expression zu (Lu et al., 1997). Wir konnten zeigen, daß die stabile Transfektion die Expression dieses Glucosetransporters jedoch auf ein Niveau führt, welches mit der in adulten Kardiomyozyten vorgefundenen GLUT4-Expression durchaus vergleichbar ist. Dies reicht offenbar aus, um eine Insulinsensitivität der H9c2-Myoblasten herzustellen, was sich in einer 70%igen Steigerung der Glucoseaufnahme bemerkbar macht. Vergleichbare Studien anderer Arbeitsgruppen an Myotuben des H9c2-Wildtyps zeigen, daß im Verlauf der Differenzierung die GLUT4-Expression zwar ansteigt, die Insulinsensitivität der Myotuben hinsichtlich der Glucoseaufnahme jedoch weitgehend unverändert bleibt (Yu et al., 2000; Yu et al., 1999; Tsiani et al.,

1998). Die relativ niedrige Insulinsensitivität dieser Zellen mit halbmaximaler Stimulation der Glucoseaufnahme bei 10 nM spiegelt eine typische Eigenschaft myoblastischer Zelllinien wieder. Unter diesen Bedingungen ist offenbar die Amplifikation des Insulinsignales schon auf der Rezeptorebene nicht in genügendem Maße gewährleistet, denn früheren Studien unserer Arbeitsgruppe zufolge besitzen H9c2-Zellen sehr wenig Insulinrezeptoren, wohingegen IGF-I schon in H9c2-Myoblasten relativ stark exprimiert wird (Bähr et al., 1996). Vergleichbare Ergebnisse wurden auch in L6-Myoblasten mit stabiler GLUT4-Expression gefunden (Robinson et al., 1993). Wie in einer Studie an der Muskelzelllinie C₂C₁₂ gezeigt wurde, reicht offenbar die GLUT4-Überexpression als solche allein nicht aus, um eine Insulin-regulierbare Steigerung der Glucoseaufnahme zu induzieren (Kotliar & Pilch, 1992). Obwohl das Vorkommen essentieller Parameter der Insulinsignalkaskade in unterschiedlichen Studien an differenzierten H9c2-Myotuben beschrieben wurde (Yu et al., 2000; Yu et al., 1999; Tsiani et al., 1998), wurde im Vergleich mit adulten Kardiomyozyten nur eine marginale Expression der Rab-GTPase Rab4A in H9K6-Zellen gefunden. Die transiente Transfektion führt die Expression der Rab-GTPase jedoch auf ein Niveau, welches mit der in adulten Kardiomyozyten vorgefundenen Expression von Rab4A durchaus vergleichbar ist. Daher eignet sich H9K6 als Zellsystem, um unter definierten Bedingungen isoliert die Frage der funktionellen Beteiligung von Rab4A für den basalen und insulinregulierten kardialen Glucosetransport zu analysieren.

4.2 Bedeutung von Rab4A für die kardiale Glucoseaufnahme

Obwohl die exakten Mechanismen, die zur insulinregulierten Umverteilung des GLUT4 führen, noch unklar sind, gilt es als gesichert, daß GTP-bindende Proteine an diesem Prozess beteiligt sind. Unsere Arbeitsgruppe (Uphues et al., 1994) wies im Einklang mit anderen Untersuchungen an Adipozyten (Cormont et al., 1991) das Vorkommen kleiner GTP-bindender Proteine in GLUT4-enthaltenden Vesikeln aus kardialem Gewebe nach und belegte eine Beteiligung von Rab-GTPasen an der Regulation des kardialen GLUT4-Vesikeltransportes. Zum einen wurde gezeigt, daß die Isoform Rab3C insulinabhängig zur Plasmamembran transloziert (Uphues et al., 1995 B). Desweiteren wurde in GLUT4-haltigen Vesikeln neben der Isoform Rab4A (Uphues et al., 1994) eine weitere GTPase mit der Masse 24 kDa nachgewiesen,

welche insulinabhängig zur Plasmamembran umverteilt wird. Sie wurde von unserer Arbeitsgruppe als Rab11 identifiziert (Kessler et al., 2000).

Ein zentraler Befund der vorliegenden Arbeit besteht diesbezüglich in der Beobachtung, daß die Expression von Rab4A in den transfizierten H9K6-Myoblasten zu einer Unterdrückung der basalen Glucosetransportrate um ungefähr 50% führt. Dies deckt sich mit Daten von Zorzano und Mitarbeitern (Mora et al., 1997), die nach Injektion von Rab4-cRNA in Oozyten einen 50-90%igen Abfall des Glucosetransportes beobachteten. Im Gegensatz hierzu zeigte die Gruppe von Kojima in einer Studie an Adipozyten, daß das Einbringen kompetitiver Rab4-Peptide oder Rab4-Antikörper keinerlei Einfluß auf die basale Glucoseaufnahme der Fettzellen hat (Shibata et al., 1996). Die sich hieraus ergebende Diskrepanz läßt sich so deuten, daß transfizierte Zellen schon im basalen Zustand vermutlich einen höheren Anteil der Isoform GLUT4 an der Zelloberfläche aufweisen als differenzierte Zellen in Primärkultur.

In einer früheren *in vivo* Studie unserer Arbeitsgruppe wurde am Herzmuskel gesunder Ratten die insulinabhängige Translokation von Rab3C von mikrosomalen Fraktionen zur Plasmamembran gezeigt, was sich jedoch nicht in insulinresistenten Zucker-Ratten bestätigte (Uphues et al., 1995 B). In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch unter isolierten Bedingungen eine funktionelle Beteiligung der GTPase Rab3C an der Regulierung des kardialen Glucosetransportes ausgeschlossen werden. Dies verstärkt den spezifischen Charakter der Effekte, welche durch die GTPase Rab4A vermittelt werden. Studien anderer Arbeitsgruppen an Adipozyten ließen analog hierzu den Schluß zu, daß eine Beteiligung von Rab3 an der Regulation der insulin-induzierten Glucoseaufnahme ausgeschlossen werden kann (Cormont et al., 1996 A; Shibata et al., 1996; Vollenweider et al., 1997). Ebenfalls konnte gezeigt werden, daß die Isoform Rab3D im gleichen Gewebe nicht in GLUT4-haltigen Vesikeln lokalisiert ist (Guerre-Millo et al., 1997). Die Gruppe um Le Marchand-Brustel berichtete in diesem Zusammenhang zwar für Rab5 von einer insulinabhängigen Umverteilung (Cormont et al., 1996 B), eine funktionelle Relation dieser Isoform für die Regulation des Glucosetransportes konnte aber später ebenfalls ausgeschlossen werden (Mora et al., 1997). Diese Daten legen die Schlußfolgerung nahe, daß die Effekte von Insulin auf die Umverteilung der GTPasen (Rab3, Rab4, Rab5) eher eine generelle Wirkung des Hormons auf Prozesse des zellulären Vesikel-Trafficking

repräsentieren. Hier wird jedoch klar ein funktioneller Zusammenhang für Rab4A mit der zellulären Umverteilung des Glucosetransporters GLUT4 aufgezeigt.

In der vorliegenden Arbeit wurden mithilfe eines Biotinylierungs-Protokolls Zelloberflächenproteine selektiv markiert. Diese Methode stellt eine geeignete Alternative zur exklusiv verfügbaren exofazialen GLUT4-Photoaffinitätsmarkierung (Holman et al., 1986; Quon et al., 1993) oder zu spezifischen GLUT4-Markierungstechniken mit Peptiden wie GFP (Powell et al., 1999) oder dem *c-myc*-Epitop (Ueyama et al., 1999; Kanai et al., 1993) dar, welche nur mittels einer Transfektion zu bewerkstelligen sind. So konnte hier gezeigt werden, daß die Verminderung des basalen Glucosetransportes in Rab4A-transfizierten Zellen vollständig erklärt wird durch eine markante Reduzierung der Transporterisoform GLUT4 an der Zelloberfläche. Diese wurde in der Population der transfizierten Zellen als ungefähr 60% im Vergleich zu Kontrollzellen gemessen. Die vorliegenden Ergebnisse stimmen recht genau überein mit Befunden der Gruppe um Le Marchand-Brustel, die in GLUT4-*myc*-exprimierenden Adipozyten eine 50-80%ige Abnahme des markierten Glucosetransporters an der Zelloberfläche in Zellen fanden, die mit Rab4 transfiziert waren (Cormont et al., 1996 A). Hiermit übereinstimmende Beobachtungen wurden auch am Skelettmuskel gemacht (Sherman et al., 1996). Frühere Untersuchungen an CHO-Zellen konnten eine Lokalisation von Rab4 in endosomalen Kompartimenten belegen (Van der Sluijs et al., 1991). Von dieser Arbeitsgruppe stammt auch die Überlegung, daß die GTPase Rab4 an der Kontrolle zielgerichteter Sortierprozesse des endozytotischen Recycling Pathway beteiligt sei (Van der Sluijs et al., 1992 A & B). Ausgehend von den vorliegenden Daten kann in Übereinstimmung mit anderen Studien (Shibata et al., 1996; Vollenweider et al., 1997) ein möglicher inhibitorischer Einfluß von Rab4A auf die GLUT4-Endozytose ausgeschlossen werden. Dies läßt den Schluß zu, daß Rab4 an der intrazellulären Sequestrierung von GLUT4 und an der Biogenese des endosomalen GLUT4-Pools beteiligt ist und somit eine essentielle Komponente der GLUT4-Endozytose in Kardiomyozyten darstellt (Rea & James, 1997). Diese Sichtweise wird zusätzlich unterstützt durch frühere *in vivo* Studien unserer Arbeitsgruppe, wonach Rab4 durch Insulinstimulation zur Plasmamembran umverteilt wird (Uphues et al., 1994).

Die Rab4A-Überexpression in H9K6-Zellen und die damit verbundene Umverteilung von GLUT4 resultierte in einer markanten Steigerung (mindestens vierfach) der Effizienz von Insulin in der Vermittlung der GLUT4-Translokation. Weiterhin ist das

Niveau der Expression von Rab4A in transfizierten Zellen durchaus vergleichbar mit dem, welches in adulten Kardiomyozyten gemessen wurde. Als Schlußfolgerung hieraus darf Rab4A als eine kritische Determinante der Insulinantwort unter physiologischen Bedingungen angesehen werden. Aus vergleichbaren Beobachtungen, welche an isolierten Adipozyten gemacht wurden (Cormont et al., 1996 A), geht ebenfalls hervor, daß Rab4 an der endozytotischen Umverteilung von GLUT4 zu einem insulinsensitiven GLUT4-Speicherkompartiment beteiligt ist.

Eine neuere Studie gibt Anlass zu der Annahme, daß Rab4 an der Weiterleitung des Insulinsignales zur exozytotischen GLUT4-Translokationsmaschinerie beteiligt sei (Shibata et al., 1997). Hier wurde gezeigt, daß Rab4 innerhalb der Insulinsignalkaskade der PI 3-Kinase nachgeschaltet ist, außerdem wird im Verlauf der Hormonwirkung der Guaninnukleotidaustausch an Rab4 stimuliert. Andere Studien lassen jedoch auch vermuten, daß Rab4 eine Komponente des Exozytoseprozesses von GLUT4 darstellt. Diese Studien an Adipozyten, in die Rab4-Antikörper, Rab4-Mutanten, oder Rab4-Carboxyterminale Peptide eingeführt wurden, konnten eine Störung der insulininduzierten GLUT4-Translokation belegen (Shibata et al., 1996; Vollenweider et al., 1997). Eine andere Sichtweise zur Bedeutung von Rab4 zeigen in diesem Zusammenhang Olson und Mitarbeiter in einer Studie an 3T3-L1 Adipozyten auf (Knight et al., 2000). Die Überexpression einer cytoplasmatisch vorkommenden Rab4-Mutante, welcher die Prenylierungsstelle fehlt, führte hier im Gegensatz zu Rab5 zu einer reduzierten insulinabhängigen Phosphorylierung von IRS-1. Dies resultierte in einer Erniedrigung der Aktivierung nachgeschalteter Proteine wie der PI 3-Kinase und Akt. Nach Meinung dieser Gruppe weisen die Befunde eher auf ein Modell der Insulinwirkung, in welcher die Regulation des internen Membran-Trafficking eine wichtige Rolle in der Weiterleitung des Insulinsignales spielt.

Zwar lassen die Daten der vorliegenden Arbeit keinerlei Rückschlüsse bezüglich einer möglichen Beteiligung von Rab4 an der insulinregulierten Exozytose von GLUT4 zu, basierend auf den zuvor beschriebenen Beobachtungen in Rab4-transfizierten Kardiozyten im Hintergrund der diskutierten Studien jedoch kann spekuliert werden, daß Rab4 funktionell beteiligt ist zum einen an der intrazellulären Sequestrierung von GLUT4, zum anderen an der Exozytose des Glucosetransporters als Antwort auf das Insulinsignal.

4.3 Die Regulation des GLUT4-Vesikel-Trafficking durch Rab-GTPasen

Zahlreiche Studien konnten belegen, daß Ras-homologe GTPasen an der Regulation des intrazellulären Vesikel-Trafficking beteiligt sind (Goud & McCaffrey, 1991; Novick & Brennwald, 1993; Kandror & Pilch, 1996). Diverse Rab-Isoformen wurden in den letzten Jahren in unterschiedlichen Kompartimenten innerhalb exo- und endozytotischer Transportprozesse identifiziert, was auf spezialisierte Transportfunktionen der verschiedenen Rab-Proteine hinweist (Martinez & Goud, 1998; Zerial & Stenmark, 1993). In diesem Zusammenhang werden einige Rab-Isoformen seitdem als wichtige Regulatoren der insulinregulierten GLUT4-Translokation angesehen.

Obwohl die genaue Funktion der Isoform Rab4 für den GLUT4-Umverteilungsprozeß zur Zeit noch unklar bleibt, geben neuere Studien Anlaß zur Hypothese, daß den Rab-Proteinen eine regulierende Rolle im Verlaufe der Bildung des SNARE-Komplexes zugeschrieben werden könnte (Aroeti et al., 1998; Rothman & Söllner, 1997; Rea & James, 1997; Sogaard et al., 1994). In diesem als SNARE-Hypothese formulierten Modell binden Proteinkomplexe eines Vesikelkompartimentes (v-SNARE's) selektiv an spezifische Rezeptoren auf der Zielmembran (t-SNARE's). Dies führt zu einer spezifischen Erkennung, welche ein Andocken und anschließendes Fusionieren mit der Zielmembran auslöst (Rea & James, 1997; Elmendorf & Pessin, 1999). Die Identifikation verschiedener t-SNARE's (Syntaxin 4, SNAP23/Syndet), v-SNARE's (VAMP2, VAMP3) und weiterer die Vesikelfusion entscheidend beeinflussender Proteine (Munc 18, Synip) ist bereits beschrieben worden (Elmendorf & Pessin, 1999; Randhawa et al., 2000; Kao et al., 2000).

Zwar bleibt die genaue Funktion von Rab4 für die Regulation des GLUT4-Vesikel-Trafficking zur Zeit noch unklar, kürzlich wurde jedoch eine direkte funktionelle Interaktion von Rab4 mit Syntaxin 4 nachgewiesen, welches entscheidend am Andocken von GLUT4-Vesikeln an Membranen beteiligt ist (Li et al., 2000). Die Rab4-Syntaxin 4-Bindung konnte in dieser Studie durch Munc 18 inhibiert werden. Zum einen schließen Shibata und Mitarbeiter daraus, daß die Rab4-Syntaxin 4-Interaktion spezifisch ist, zum anderen konnte gezeigt werden, daß sie vom Guaninnukleotidstatus von Rab4 abhängt.

4.4 Bedeutung von Rab-GTPasen für die insulinvermittelte Reorganisation des Actinnetzwerkes

Zahlreiche Studien weisen klar auf einen funktionellen Zusammenhang zwischen Vertretern der Rab-GTPasen und der Modulation des Actincytoskelettes hin (Schimmöller et al., 1998; Aroeti et al., 1998; Takai et al., 2001). In Rab4-haltigen endosomalen hepatischen Vesikelpools konnte eine Anreicherung von Elementen des Cytoskelettes wie Actin und Tubulin nachgewiesen werden (Pol et al., 1997), weiterhin konnte immunhistochemisch eine Colokalisation von Rab4 mit dem Actinnetzwerk exokriner Gewebe nachgewiesen werden (Valentijn et al., 1997). Die Gruppe von Le Marchand-Brustel zeigte in einer Studie an Adipozyten (Vollenweider et al., 1997), daß Rab4 eine essentielle Komponente der GLUT4-Translokationsmaschinerie ist und die GTP-bindende Funktion von Rab4 dabei entscheidend benötigt wird. Durch Expression einer Rab4-Mutante mit defekter GTP-bindender Domäne in diesen Zellen wurde außerdem eine direkte Beteiligung von Rab4 an der insulininduzierten Umorganisation der Actinfilamente belegt. Demzufolge wurde die insulininduzierte Umorganisation der Actinfilamente nur durch die Rab4-Mutante und Rab4-Antikörper selektiv inhibiert. Die Autoren argumentieren daher, daß die GTP-bindende Aktivität von Rab4 offenbar auch bei dieser Funktion der GTPase von entscheidender Bedeutung ist.

Obwohl sie hierbei im Fettgewebe eine Beteiligung von Rab3 für diesen Prozeß ausschließen, konnten Kirk und Mitarbeiter für diese Isoform eine Beteiligung an der Reorganisation des F-Actincytoskelettes in exokrinen Geweben belegen (Sunshine et al., 2000). Einer Studie der Gruppe von Jamieson an exokrinen Geweben zufolge korreliert das Andocken exozytotischer Vesikel an Actinfilamente mit der gleichzeitigen Dissoziation von Rab3 (Valentijn et al., 1999). Deren Befunde weisen ebenfalls auf eine enge Verbindung zwischen den Actinfilamenten und Rab3, welches ihrer Meinung nach als Brückenbildner zwischen dem Cytoskelett und der SNARE-Erkennungs- und Fusionsmaschinerie dienen könnte. Die genannten Befunde weisen klar auf eine neue Rolle dieser Rab-GTPasen in der Modulation des Actinnetzwerkes hin. Zukünftige Studien, die sich mit der Natur dieser Wechselwirkung der Rab-GTPasen mit dem Cytoskelett und seiner akzessorischen Proteine beschäftigen, werden auch neue Aspekte hinsichtlich der Bedeutung von Rab4 für die insulinvermittelte GLUT4-Translokation aufzeigen.

4.5 Bedeutung des Actinnetzwerkes für die GLUT4-Translokation

Das Actincytoskelett spielt eine Schlüsselrolle in der Regulation multipler exo- und endozytotischer Vesikeltransportprozesse (Valentijn et al., 1999; Qualmann et al., 2000; Rogers & Gelfand, 2000). Actinproteine liegen innerhalb der Zelle entweder einzeln in löslicher, globulärer Form (G-Actin) oder polymerisiert in Form von Filamenten (F-Actin) vor, in Säugetieren konnten bisher drei Isoformen (α -, β -, γ -Actin) dieser ubiquitär vorkommenden Familie der Actinproteine beschrieben werden (Christopher & Carpenter, 2000). Der Aufbau und die Dynamik der Actinfilamente wird hierbei entscheidend reguliert durch die Beeinflussung ihrer Polymerisation und Depolymerisation (Borisy & Svitkina, 2000; Cooper & Schafer, 2000; Chen et al., 2000). Hinsichtlich der Regulation der Biogenese des F-Actin bedient sich die Zelle einer Reihe actinbindender Proteine, welche spezifische Aufgaben erfüllen für das Bündeln, die Verzweigung, oder die Polymerisierung und Depolymerisierung der Filamente (Cooper & Schafer, 2000; Bartles, 2000).

Die genauen Mechanismen, die zur insulininduzierten Bindung von Vesikeln an F-Actinfilamente führen, bleiben zur Zeit jedoch unklar (Rogers & Gelfand, 2000; Carpenter, 2000; Qualmann et al., 2000). Obwohl es auch Hinweise auf eine Beteiligung der Mikrotubuli an der insulinregulierten GLUT4-Translokation gibt (Wang et al., 1996; Fletcher et al., 2000; Guilherme et al., 2000), gilt es mittlerweile als gesichert, daß ein intaktes Actincytoskelett eine essentielle Rolle für die insulinstimulierte Steigerung der Glucoseaufnahme spielt. Zahlreiche Untersuchungen am Fettgewebe und am Skelettmuskel mit Inhibitoren des Actincytoskelettes bestätigen, daß eine Zerstörung oder Umorganisation des Actinnetzwerkes die GLUT4-Translokation und damit die Steigerung der Glucoseaufnahme als Reaktion auf den Insulinstimulus komplett blockiert (Tsakiridis et al., 1999; Tsakiridis et al., 1994; Omata et al., 2000).

Im Einklang mit den dargestellten Befunden anderer Gruppen konnte in der vorliegenden Arbeit in adulten ventrikulären Kardiomyozyten, die mit dem aus Pilzen gewonnenen Metaboliten Cytochalasin D behandelt wurden, eine massive Umorganisation der Actinfilamente nachgewiesen werden. Diese Zellen weisen weiterhin ungeachtet der Insulinstimulierung eine komplette Hemmung der insulininduzierten Glucoseaufnahme auf, wobei die basale Aufnahmerate unverändert bleibt. Diese Befunde legen für adulte Kardiomyozyten die

Schlußfolgerung nahe, daß auch hier ein intaktes Actinnetzwerk essentiell zur insulininduzierten Translokation von GLUT4-Vesikeln beiträgt.

In diesem Zusammenhang belegt eine Studie von Klip und Mitarbeitern an 3T3-L1 Adipozyten, daß die Insulinwirkung *per se* eine Umorganisation des Actinnetzwerkes auslöst (Wang et al., 1998 A & B). Sie konnten weiterhin zeigen, daß Actinfilamente an der insulininduzierten Umverteilung der PI 3-Kinase zu GLUT4-haltigen Kompartimenten und somit an der Steigerung der Glucoseaufnahme partizipieren. Ihre Befunde geben Anlaß zu der Vermutung, daß es eine wichtige Funktion der Actinfilamente sein könnte, die insulininduzierte Assoziation der PI 3-Kinase mit den GLUT4-haltigen Kompartimenten zu vermitteln. Unterschiedlichen Studien zufolge wurde eine direkte Colokalisation von GLUT4 mit Actinfilamenten nach Insulinstimulation nachgewiesen (Vollenweider et al., 1999; Kao et al., 1999; Asahi et al., 1999). Außerdem fand man eine insulininduzierte Colokalisation von Actinfilamenten mit GLUT4 und auch der PI 3-Kinase (Khayat et al., 2000). Interessanterweise konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, daß Insulin eine Assoziation von Komplexen der PI 3-Kinase mit IRS-1 an Elemente des Actincytoskelettes veranlaßt (Clark et al., 1998). Die genannten Befunde weisen auf eine mögliche neue Rolle der PI 3-Kinase im Zusammenhang mit der insulinvermittelten Modulation des Actinnetzwerkes hin.

Eine Beteiligung akzessorischer Proteine an der Modulierung der F-Actin-Organisation in Reaktion auf den Insulinstimulus bedarf noch eingehender Untersuchung und wird zur Zeit kontrovers diskutiert (Tsakiridis et al., 1997; Zorzano et al., 1998 A; Martin et al., 1999; Foster & Klip, 2000). Die Gruppe von Pessin und Saltiel konnte in einer *in vitro* Studie das Enzym Aldolase als ein Protein mit potentieller akzessorischer Funktion identifizieren (Kao et al., 1999). Sie zeigten, daß GLUT4 spezifisch die Anwesenheit der Aldolase benötigt, um an F-Actin zu binden. Ihren Befunden zufolge wird die Exozytose von GLUT4 durch Reagenzien inhibiert, welche spezifisch die Interaktion zwischen Actin und der Aldolase stören, während der GLUT4-Endozytoseprozess hiervon unbeeinflusst bleibt. Einer Studie von Kojima und Mitarbeitern zufolge (Omata et al., 2000) spielen Actinfilamente eine wichtige Rolle ausschließlich in der Vermittlung der exozytotischen Rekrutierung der GLUT4-Vesikel vom intrazellulären Pools zur Plasmamembran. Durch Wortmannin-Hemmung der insulinvermittelten Glucoseaufnahme in 3T3-L1 Adipozyten und Bestimmung des endozytotisch entstehenden 35 kDa Trypsinfragmentes von GLUT4

demonstrierten sie, daß die Endozytoserate von GLUT4 unbeeinflusst bleibt von der Zerstörung des Actincytoskelettes.

4.6 Bedeutung von Metaboliten der 12-Lipoxygenasereaktion für die Organisation von Actinfilamenten

Lipoxygenasen (LO) repräsentieren eine in Säugetieren weitverzweigt vorkommende Enzymfamilie (Brash, 1999). Sie produzieren parakrin wirkende Lipidperoxide durch stereospezifischen Einbau von O₂ in mehrfach ungesättigte Fettsäuren, wie Arachidonsäure oder Linolsäure (Funk, 1996). Multiple LO-Isoformen (wie 5-, 12-, oder 15-LO) wurden bislang in verschiedenen Geweben von Säugetieren identifiziert (Freire-Moar et al., 1995; Brash, 1999), aber die biologische Funktion und physiologische Bedeutung der meisten Isoformen bleibt bislang noch unklar (Funk, 1996; Brash, 1999; Kuhn & Thiele, 1999). Das Vorkommen der 12-LO-Isoform wurde bisher in unterschiedlichen Geweben von Ratte, Maus und Mensch beschrieben (Yamamoto et al., 1997 A & B). Verschiedene Arbeitsgruppen haben interessanterweise einen klaren funktionellen Zusammenhang zwischen Alterationen der 12-LO-Aktivität und der Inzidenz des insulinabhängigen Diabetes und der Insulinresistenz belegt (Bleich et al., 1999; Tohjima et al., 1998; Antonipillai et al., 1996). Sigal und Mitarbeiter identifizierten und charakterisierten in insulinsensitiven Geweben wie Leber und Herzmuskel vor kurzer Zeit erstmalig die 12-LO Isoform (Freire-Moar et al., 1995). Ihr Stoffwechselprodukt 12(S)-HETE wurde von Grossmann und Mitarbeitern in Untersuchungen an Kardiomyozyten als das hauptsächlich vorherrschende Produkt der Lipoxygenasereaktion charakterisiert (Breitbart et al., 1996). Die Autoren beschreiben das Vorkommen der 12-LO-Enzymaktivität sowohl im Cytosol als auch in mikrosomalen Membranfraktionen der Kardiomyozyten.

In Übereinstimmung mit diesen Daten wird in der vorliegenden Arbeit mittels Immunfluoreszenzmarkierung das Vorkommen der 12-LO in ventrikulären Kardiomyozyten bestätigt. Die 12-LO-gekoppelte Immunfluoreszenz dagegen ergibt zum einen in perinukleären Zellschnitten ein homogeneres Verteilungsmuster, während sich in Zellschnitten in unmittelbarer Nähe der Plasmamembran eine verstärkt punktuelle 12-LO-gekoppelte Färbung nachweisen läßt. Eine ähnliche subzelluläre Verteilung dieses Enzyms wurde von Ishimura und Mitarbeitern in einer 12-LO-Expressionsstudie gefunden (Nakamura et al., 1997). Das Actinnetzwerk

unbehandelter Kardiomyozyten zeigt sich innerhalb der ganzen Zelle in Form von streng parallel liegenden Filamenten organisiert, wobei unter Verwendung der Phalloidin-Nachweistechnik selektiv das F-Actin, jedoch nicht das einzeln vorliegende cytoplasmatische G-Actin sichtbar wird. Unter den gegebenen Bedingungen wurde keine Colokalisation der 12-LO mit dem Actincytoskelett nachgewiesen.

Allerdings weisen in diesem Zusammenhang *in vitro* Studien der Gruppe von Vanderhoek auf eine mögliche Beteiligung dieser parakrin wirkenden Hydroxyeicosatetraenoide (HETE's) an der Regulation des Actinnetzwerkes in Aussicht (Kang et al., 1999; Kang & Vanderhoek, 1998). Sie konnten zeigen, daß diese eingangs genannten Eicosanoide selektive Liganden von Actinfibrillen darstellen. Ihre Daten geben Anlaß zu der Hypothese, daß Actinfilamente als Zielproteine der HETE-Wirkung eine neue Rolle in der biologischen Wirkung dieser parakrinen 12-LO-Produkte darstellen könnten.

Ein zentraler Befund der vorliegenden Arbeit zeigt in diesem Zusammenhang mittels Immunfluoreszenzmarkierung des F-Actins in adulten Kardiomyozyten klar, daß die mithilfe zweier strukturell unterschiedlicher Hemmstoffe erreichte Inhibition der 12-LO-Isoform zu einer massiven Umorganisation der Actinfilamente führt. Desweiteren konnte hier gezeigt werden, daß dieser Prozeß offenbar an einen starken Abfall des zellulären 12(S)-HETE-Gehaltes gekoppelt ist. Studien unterschiedlicher Arbeitsgruppen zu diesem Thema erhärten die Hypothese, daß 12(S)-HETE eine PKC-abhängige Phosphorylierung von Actinfilamenten auslöst. Honn und Mitarbeiter zeigen, daß die Phosphorylierung der Actinfilamente zum einen eine Erhöhung des zellulären Actingehaltes, zum anderen eine Steigerung der Polymerisationsrate von Actin zur Folge hat (Rice et al., 1998; Tang et al., 1994; Tang et al., 1993 A & B). Aus der Sicht der Autoren kann 12(S)-HETE über die Aktivierung und Translokation der PKC vom Cytosol zur Plasmamembran die beschriebenen modulatorischen Effekte auf die Actinfilamente bewirken, wobei hier eine Spezifizierung der PKC-Isoformen bisher nicht erfolgte. Einer an Kardiomyozyten von Walker und Mitarbeitern durchgeführten Studie zufolge löst jedoch ein aktivierter Arachidonsäurestoffwechsel eine selektive Umverteilung der PKC- vom Cytosol zu filamenthaltigen Fraktionen aus, wodurch diese Isoform aus der Sicht der Autoren an der Regulation der Eigenschaften der Myofilamente beteiligt ist (Huang et al., 1997). Einer Studie von Farese und Mitarbeitern an Adipozyten zufolge stimulierte die Überexpression der Isoform PKC- ζ eine PI 3-Kinase-abhängige GLUT4-Translokation (Staendert et al.,

1997). Die Struktur, Funktion und die Divergenz der verschiedenen PKC-Isoformen im Zusammenhang mit der Regulation der Signaltransduktion ist in unterschiedlichen Studien eingehend beschrieben worden (Newton, 1995; Hug & Sarre, 1993), ihre Bedeutung für die Weiterleitung der Insulinwirkung, insbesondere unter Berücksichtigung der Reorganisation des Cytoskelettes, ist bisher aber noch unklar. Auf der Basis zahlreicher Studien an unterschiedlichen Geweben und Zelltypen verdichten sich allerdings die Beobachtungen, daß aktivierte PKC-Isoformen an der Reorganisation von Elementen des Cytoskelettes beteiligt sind, wobei sie mit diversen Proteinkomponenten des Cytoskelettes assoziiert sein können (Keenan & Kelleher, 1998; Toker, 1998). Im Herzen wurde beispielsweise eine Beteiligung der PKC- ϵ und PKC- δ an der Umorganisation von Elementen des Cytoskelettes belegt. Interessanterweise konnten Terrian und Mitarbeiter in einer Studie an neuronalem Gewebe ein für die PKC- ϵ spezifisches Actinbindungsmotiv nachweisen (Prekeris et al., 1996). Sie zeigen weiterhin, daß die PKC- ϵ Isoform eine spezifische Bindung mit filamentösem Actin eingeht. Basierend auf den beschriebenen Beobachtungen ist eine mögliche Beteiligung kardialer PKC-Isoformen an der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen massiven Umorganisation der Actinfilamente durchaus denkbar und mag in zukünftigen Studien eingehender untersucht werden.

Obwohl die 12-LO-Reaktion durch Generierung freier Radikale auch mit der Entstehung myokardialer Defekte in Zusammenhang gebracht wird (Kuzuya et al., 1993), konnte die Gruppe von Steenbergen in diesem Zusammenhang zeigen, daß 12(S)-HETE eine wichtige Rolle in der Erzielung eines kardioprotektiven Effektes im Kontext der ischämischen Präkonditionierung spielt (Chen et al., 1999; Murphy et al., 1995). Sie zeigen in diesen Studien, daß der kardiale 12-LO-Reaktionsweg klar stimuliert wird während der ischämischen Präkonditionierung, aber auch als Antwort auf die Aktivierung der PKC. Ähnliche Beobachtungen wurden auch von Ytrehus und Mitarbeitern gemacht (Starkopf et al., 1998). Außerdem führt den Befunden der Gruppe von Steenbergen zufolge zum einen die Inhibition der PKC, aber auch der 12-LO zu einer Unterdrückung dieses Effektes, dieser kann aber durch exogene Zugabe von 12(S)-HETE wiederhergestellt werden. Dies deutet auf eine neue Rolle des parakrinen Eicosanoides 12(S)-HETE als Modulator der PKC und des Actinnetzwerkes im Zusammenhang mit kardioprotektiven Prozessen hin. Diesbezüglich wurde bereits gezeigt, daß das Cytoskelett eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit Prozessen der Kardiomyopathie spielt (Hein et al., 2000) und die

kardiale kontraktile Dysfunktion eng zusammenhängen kann mit Alterationen des Gesamtgehaltes und der zellulären Verteilung von Elementen des Cytoskelettes (Di Somma et al., 2000). Somit wird auf der Grundlage der in dieser Arbeit präsentierten Daten erstmalig eine potentielle Beteiligung dieser Eicosanoide an der Regulation der Organisation des kardialen Actinnetzwerkes in Aussicht gestellt (Siehe Abb. 20).

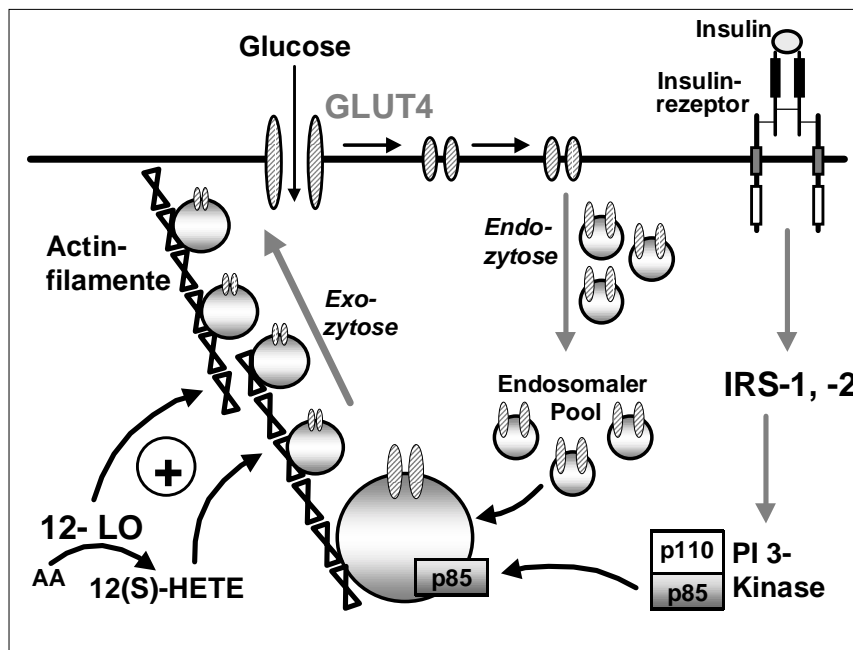


Abb. 20: Schematische Darstellung der funktionellen Regulation der GLUT4-Exozytose durch Metaboliten der 12-Lipoxygenase

4.7 Bedeutung der 12-Lipoxygenasereaktion für die Regulation der kardialen Glucoseaufnahme

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, am System der adulten Kardiomyozyten eine mögliche Korrelation der Aktivität der 12-LO-Reaktion mit der Organisation des Actinnetzwerkes - wie oben dargestellt - aufzuzeigen. Weiterhin sollte eine potentielle Beteiligung des 12-LO-Reaktionsweges an der Regulation des GLUT4-Trafficking und seine möglichen Auswirkungen auf die kardiale Glucoseaufnahme untersucht werden. Als ein entscheidender Befund wird in dieser Arbeit gezeigt, daß die Inhibition der 12-LO-Reaktion ihrerseits zu einer Hemmung der insulininduzierten GLUT4-Translokation führt, während Alterationen des zellulären Gesamtgehaltes an GLUT4 ausgeschlossen werden können. Auf der Glucosetransportebene hat dies weiterhin eine dosisabhängige und bei 50 μ M NDGA komplette Hemmung des

insulinstimulierten Glucosetransportes zur Folge, wobei die basale Transportrate von der 12-LO-Inhibition unbeeinflusst bleibt. Messungen des Einflusses der 12-LO-Inhibition auf die insulinstimulierte Tyrosinphosphorylierung von IRS-1 und IRS-2 ergaben hierbei zwar, daß der Aktivierungsprozeß dieser Signalelemente der Insulinsignalkaskade unter diesen Bedingungen leicht abgeschwächt wird. Es wurde jedoch in einer früheren Studie unserer Arbeitsgruppe an Kardiomyozyten bereits gezeigt, daß eine maximale Insulinwirkung auf der IRS-Ebene bereits bei physiologischen Insulindosen erreicht wird, was schließlich zu einer maximalen Stimulation der kardialen Glucoseaufnahme führt (Kolter et al., 1997). So muß hier erwähnt werden, daß die komplette Hemmung der insulinabhängigen GLUT4-Translokation und der Glucoseaufnahme nach 12-LO-Inhibition offenbar nicht in der leichten Abschwächung des Insulinsignals auf der IRS-Ebene ihre Erklärung findet. Desweiteren wurde zumal klar gezeigt, daß durch die 12-LO-Inhibition weder die insulininduzierte Assoziation der p85-Untereinheit der PI 3-Kinase noch die Phosphorylierung der Proteinkinase Akt, welche als Signalelemente dem GLUT4 vorgeschaltet sind, signifikant reduziert werden. Zusammenfassend kann also gesagt werden, daß durch die Hemmung der 12-LO trotz einer leichten Abschwächung des Insulinsignales auf der frühen Postrezeptorebene die Aktivierung derjenigen Signalelemente, welche zur GLUT4-Translokation führen, im wesentlichen unbeeinflusst bleibt.

Die Spezifität der Hemmung der kardialen 12-LO-Isoform durch NDGA wurde hier klar bestätigt, denn die exogene Zugabe von 12(S)-HETE führte in den Kardiomyozyten zu einer nahezu kompletten Wiederherstellung der maximalen Insulinsensitivität auf der Ebene der Glucoseaufnahme. Dieser Befund steht im Einklang mit Daten von Yamada und Proia, deren Befunden zufolge durch exogene Zugabe von LO-Metaboliten die inhibitorischen Effekte von Esculetin auf die Verteilung der Actinfilamente komplett aufgehoben wurden (Yamada & Proia, 2000). Unter Berücksichtigung der durch die 12-LO-Inhibition ausgelösten – oben beschriebenen – Umorganisation der Actinfilamente wird in der vorliegenden Arbeit auf der Basis der beschriebenen Befunde ein Modell vorgeschlagen, in welchem 12(S)-HETE in seiner potentiellen Funktion als Modulator des Actinnetzwerkes als eine wichtige Determinante der kardialen Glucosetransportmaschinerie fungieren könnte (Siehe Abb. 20).

Einer Studie von Azhar und Mitarbeitern an Adipozyten zufolge führt im Gegensatz zu unseren Daten die Inhibition der LO-Reaktion durch NDGA zu einer Steigerung sowohl der basalen als auch der insulininduzierten Glucoseaufnahme (Gowri et al., 1999). Nach der Meinung der Autoren steht dieser Befund allerdings nicht im kausalen Zusammenhang mit der Funktion von NDGA als LO-Inhibitor. Desweiteren mag die Diskrepanz dieser Befunde in dem gewebespezifisch zwischen Herz und Adipozyten divergierenden Expressionsmuster der LO-Isoformen ihre Erklärung finden, wie in unterschiedlichen Studien beschrieben wurde (Brash, 1999; Kuhn & Thiele, 1999). Interessanterweise kommen O’Rahilly und Mitarbeiter in einer vergleichbaren Studie an diesem Zellsystem zu unterschiedlichen Schlußfolgerungen, die ihrerseits im Einklang mit den hier vorliegenden Befunden stehen (Nugent et al., 2001). In Adipozyten, die zunächst mit Arachidonsäure behandelt wurden, führte im besonderen die selektive LO-Inhibition durch NDGA zu einer Reduzierung des Glucosetransportes in An- oder Abwesenheit von Insulin. Alterationen anderer von Arachidonsäure ausgehenden Stoffwechselwegen wurden hier weitgehend ausgeschlossen. Die gemessenen Änderungen der Glucoseaufnahme basieren nach ihren Befunden auf Alterationen des GLUT4- und GLUT1-Levels an der Plasmamembran. O’Rahilly und Mitarbeiter können hier erstmalig zeigen, daß diese Effekte wiederum durch eine über Metaboliten des LO-Reaktionsweges angeschaltete Aktivierung des nuklären PPAR- -Rezeptors ausgelöst werden. Nach Meinung der Autoren stellen LO-Metaboliten mögliche endogene Liganden von PPAR- dar, sie zeigen somit eine Evidenz für ein neues Wirkmodell der Regulation der Glucoseaufnahme unter Beteiligung der LO-Metaboliten. Ähnliche Schlußfolgerungen lassen die von Long und Pekala zu dieser Fragestellung erhobenen Daten zur Regulation von GLUT4 in Adipozyten zu (Long & Pekala, 1996 A; Long & Pekala, 1996 B). Ihren Befunden zufolge wird die GLUT4-Expression ebenfalls durch den Arachidonsäurestoffwechsel entscheidend moduliert. Eine mechanistische Identifizierung der Signalwege erfolgte zwar innerhalb ihrer Studien nicht, die Beteiligung von PPAR’s daran kann nach Meinung der Autoren aber eine wichtige Rolle spielen. Unterschiedliche Studien in verschiedenen Geweben zu dieser Fragestellung belegen allerdings einen klaren funktionellen Zusammenhang. So zeigten Glass und Mitarbeiter (Huang et al., 1999), daß PPAR-Liganden von der 12/15-LO-Isoform produziert werden. Die Gruppe von Lazar belegte in einer Studie an Adipozyten die selektive Aktivierung von PPAR- α durch

den Liganden 8(S)-HETE (Yu et al., 1995), vergleichbare Beobachtungen wurden von Kadowaki und Mitarbeitern gemacht (Murakami et al., 1999). Die PPAR- Familie, die gewebespezifische Expression ihrer bisher identifizierten Isoformen α , β , γ und δ , und ihre Beteiligung an der Regulation des Glucosestoffwechsels ist detailliert von Auwerx und Mitarbeitern untersucht und charakterisiert worden (Auwerx, 1999; Martin et al., 1998; Staels et al., 1997; Schoonjans et al., 1997). Obwohl im Herzen die Expression jeder der PPAR-Isoformen bereits beschrieben wurde (Bishop-Bailey, 2000), ist bislang wenig über die Funktionen bekannt, die durch kardiale PPAR-Liganden vermittelt werden, und über die potentielle Rolle der PPAR's für kardiale Dysfunktionen. Da in diesem Zusammenhang von verschiedenen Arbeitsgruppen bereits gezeigt wurde, daß die Regulation der Glucoseaufnahme und der GLUT4- und GLUT1-Expression entscheidend verändert wird während der kardialen Ischämie (Tardy-Cantalupy et al., 1999; Young et al., 1999), wird es von Interesse sein zu zeigen, welche Bedeutung nach dem oben beschriebenen Wirkmodell diese parakrinen Hormone in ihrer Funktion als PPAR-Liganden für die Regulation der kardialen Glucoseaufnahme einnehmen.

VII. Zusammenfassung

In Säugetieren werden das Fettgewebe sowie der Skelett- und Herzmuskel als die wichtigsten Zielgewebe des Polypeptidhormones Insulin angesehen. In diesen Geweben stellt die markante Steigerung der Blutglucoseaufnahme und die hieraus resultierende kurzfristige Erniedrigung des Blutglucosespiegels eine der Hauptkurzzeitwirkungen des Hormones dar. Diese Wirkung wird hauptsächlich durch die Translokation der Glucosetransporterisoform GLUT4 von intrazellulären Vesikelpools zur Plasmamembran vermittelt. GLUT4 befindet sich in verschiedenen Kompartimenten unterschiedlicher, teils noch ungenügend geklärter Funktion innerhalb eines fortwährenden endo- und exozytotischen Kreislaufes, der Hauptanteil der Insulinwirkung wird in dieser Hinsicht der Erhöhung der Exozytoserate von GLUT4 zugeschrieben. Obschon sich das Wissen über die initialen Signalschritte für die Weiterleitung des Hormonsignales in jüngster Zeit vertieft hat, ergibt der Kenntnisstand innerhalb des GLUT4-Vesikel-Trafficking über die genauen Mechanismen, welche letztlich zur exozytotischen Umverteilung von GLUT4 beitragen, zur Zeit noch ein unklares Bild.

Unterschiedlichen Studien am Fettgewebe und Skelettmuskel zufolge gilt es jedoch als gesichert, daß ein intaktes Actincytoskelett essentiell ist für die Vermittlung dieses Translokationsprozesses. Die genauen Mechanismen, welche zur insulinabhängigen Assoziation der GLUT4-Vesikel mit dem Actincytoskelett und zu der Vermittlung seiner Translokation zur Plasmamembran führen, sind jedoch bislang ungeklärt und werden kontrovers diskutiert. Neuere Studien an unterschiedlichen Geweben zeigen in dieser Hinsicht eine klare Evidenz, daß Metaboliten der Lipoxygenasereaktion an der Modulation des Actincytoskelettes beteiligt sind. Ein Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es daher, eine potentielle Beteiligung der kardialen Lipoxygenasereaktion an der Modulation der Actinfilamente und der Regulation der kardialen insulinabhängigen Glucoseaufnahme zu untersuchen. Zunächst konnte durch Inhibitionsstudien die kritische Bedeutung der Actinfilamente für die Vermittlung der insulinabhängigen Steigerung der Glucoseaufnahme auf den Herzmuskel ausgeweitet werden. Weiterhin konnte die kardiale 12-Lipoxygenasereaktion als eine kritische Determinante der Organisation der Actinfilamente identifiziert werden, da die Inhibition der 12-LO-Isoform zu einer massiven Umorganisation des Actinnetzwerkes

führt. Es wurde ebenfalls gezeigt, daß dieser Prozess mit einer Blockierung der insulinabhängigen GLUT4-Translokation und damit verbundenen Steigerung der Glucoseaufnahme gekoppelt ist. Die Spezifität des Effektes konnte nachgewiesen werden, da trotz 12-LO-Inhibition durch exogene Zugabe der 12-LO-Metaboliten die Insulinsensitivität der Kardiomyozyten fast vollständig wiederhergestellt wird. Somit wird auf der Grundlage der in dieser Arbeit vorgestellten Daten erstmalig eine funktionelle Relation zwischen der 12-Lipoxygenaseaktivität und der kardialen insulinabhängigen Glucoseaufnahme über eine Regulation des Actinnetzwerkes nachgewiesen.

In vielen Studien wurde eine Beteiligung von Isoformen der Familie der Rab-GTPasen an der Vermittlung des insulinabhängigen GLUT4-Vesikel-Trafficking nachgewiesen. In vorhergehenden Studien unserer Arbeitsgruppe an kardialem Gewebe wurde desweiteren eine Assoziation der Isoform Rab4A mit GLUT4-haltigen Vesikeln und deren insulinabhängige subzelluläre Umverteilung nachgewiesen. Auf der Grundlage dieser Daten sollte daher im anderen Teil der vorliegenden Arbeit in einer Transfektionsstudie an kardialen Zellen mit stabiler GLUT4-Überexpression die funktionelle Bedeutung der Isoform Rab4A für das insulinvermittelte GLUT4-Trafficking auf der Ebene der GLUT4-Translokation und der Glucoseaufnahme charakterisiert werden. Als ein wichtiger Befund dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die kardiale Überexpression von Rab4A zu einer Unterdrückung der basalen Glucosetransportrate führt, während unter diesen Bedingungen die insulinabhängige Glucoseaufnahme der kardialen H9K6-Myoblasten unverändert bleibt. Die Insulinwirkung selbst wird also durch den Einfluß von Rab4A gesteigert. Gleichzeitig wurde eine mögliche Beteiligung der Isoform Rab3C an der Regulation der kardialen Glucoseaufnahme unter diesen Bedingungen ausgeschlossen. Zum anderen wurde die Beobachtung gemacht, daß die Überexpression von Rab4A gleichzeitig zu einer markanten Reduzierung von GLUT4 an der Zelloberfläche führt, während mögliche Effekte der GTPase auf die Regulation von GLUT1 ausgeschlossen wurden. Dies liefert somit eine mechanistische Erklärung für den vorhergehenden Befund. Ausgehend von diesen Daten kann im Einklang mit anderen Studien ein möglicher inhibitorischer Einfluß von Rab4A auf die GLUT4-Endozytose ausgeschlossen werden. Desweiteren kann hier spekuliert werden, daß Rab4 zum einen in Abwesenheit von Insulin an der intrazellulären Retention und Sequestrierung von

GLUT4, zum anderen an der Verstärkung der Exozytoserate als Antwort auf das Insulinsignal funktionell beteiligt ist.

VI. Literatur

- Abas L, Bogoyevitch MA and Guppy M.: Mitochondrial ATP production is necessary for activation of the extracellular-signal-regulated kinases during ischaemia/reperfusion in rat myocyte-derived H9c2 cells. *Biochem. J.* 349 (1): 119-126, 2000
- Aledo JC, Darakshan F and Hundal HS.: Rab4, but Not the Transferrin Receptor, Is Colocalized with GLUT4 in an Insulin-Sensitive Intracellular Compartment in Rat Skeletal Muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215 (1): 321-328, 1995
- Alessi DR and Downes CP.: The role of PI 3-kinase in insulin action. *Biochim. Biophys. Acta* 1436.: 151-164, 1998
- Antonipillai I, Nadler J, Jost Vu E, Bughi S, Natarajan R and Horton R.: A 12-lipoxygenase product, 12-hydroxyeicosatetraenoic acid, is increased in diabetics with incipient and early renal disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81: 1940-1945, 1996
- Aroeti B, Okhrimenko H, Reich V and Orzech E.: Polarized trafficking of plasma membrane proteins: emerging roles for coats, SNAREs, GTPases and their link to the cytoskeleton. *Biochim. Biophys. Acta* 1376.: 57-90, 1998
- Asahi Y, Hayashi H, Wang L and Ebina Y.: Fluoromicroscopic detection of myc-tagged GLUT4 on the cell surface. Co-localization of the translocated GLUT4 with rearranged actin by insulin-treatment in CHO cells and L6 myotubes. *J. Med. Invest.* 46 (3-4): 192-199, 1999

Auwerx J.: PPAR , the ultimate thrifty gene. *Diabetologia* 42.: 1033-1049, 1999

Backer JM, Myers MG, Shoelson SE, Chin DJ, Miralpeix M, Hu P, Margolis B, Skolnik EY, Schlesinger J and White MF.: The phosphatidyl-inositol 3-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. *EMBO J.* 11.: 3469-3479, 1992

Bähr M, Kolter T, Seipke G and Eckel J.: Growth promoting and metabolic activity of the human insulin analogue [GlyA21, ArgB31, ArgB32] insulin (HOE901) in muscle cells. *Eur. J. Pharmacol.* 320: 259-265, 1997

Bähr M, Spelleken M, Bock M, von Holtey M, Kiehn R and Eckel J.: Acute and chronic effects of troglitazone (CS-045) on isolated rat ventricular cardiomyocytes. *Diabetologia* 39: 766-774, 1996

Bähr M, von Holtey M, Müller G and Eckel J.: Direct stimulation of myocardial glucose transport and glucose transporter-1 (GLUT1) and GLUT4 protein expression by the sulfonylurea glimepiride. *Endocrinology* 136: 2547-2553, 1995

Baldini G, Scherer PE and Lodish HF.: Nonneuronal expression of Rab3A: Induction during adipogenesis and association with different intracellular membranes than Rab3D. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92.: 4284-4288, 1995

Baldini G, Hohl T, Lin HY and Lodish HF.: Cloning of a Rab3 isotype predominantly expressed in adipocytes. *Biochemistry* 89.: 5049-5052, 1992

- Baldini G, Hohmann R, Charron MJ and Lodish HF.: Insulin and nonhydrolyzable GTP analogs induce translocation of GLUT 4 to the plasma membrane in alpha-toxin-permeabilized rat adipose cells. *J. Biol. Chem.* 266: 4037-40, 1991
- Banting FG, Best CH, Collip JB Campbell WR and Fletcher AA.: Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus. *Can. Med. Assoc. J.* 12.: 141-146, 1922
- Bartles JR.: Parallel actin bundles and their multiple actin-bundling proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12.: 72-78, 2000
- Baumann CA and Saltiel AR.: Spatial compartmentalization of signal transduction in insulin action. *BioEssays* 23.: 215-222, 2001
- Bishop-Bailey D.: Peroxisome proliferator-activated receptors in the cardiovascular system. *Brit. J. Pharmacol.* 129.: 823-834, 2000
- Bleich D, Chen S, Zipser B, Sun D, Funk CD and Nadler JL.: Resistance to type 1 diabetes induction in 12-lipoxygenase knockout mice. *J. Clin. Invest.* 103 (10): 1431-1436, 1999
- Borisy GG and Svitkina TM.: Actin machinery: pushing the envelope. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12.: 104-112, 2000
- Bortoluzzi MN, Cormont M, Gautier N, Van Obberghen E and Le Marchand-Brustel Y.: GTPase activating protein activity for Rab4 is enriched in the plasma membrane of 3T3-L1 adipocytes. Possible involvement in the regulation of Rab4 subcellular localization. *Diabetologia* 39.: 899-906, 1996

Bourne HR, Sanders DA and McCormick F.: The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* 365.: 126-132, 1990

Bradford MM.: A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72.: 248-254, 1976

Brash AR.: Lipoxygenases: Occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J. Biol. Chem.* 274 (34):. 23679-23682, 1999

Breitbart E, Sofer Y, Shainberg A and Grossman S.: Lipoxygenase activity in heart cells. *FEBS Lett.* 395.: 148-152, 1996

Burgering BT and Coffer PJ.: Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature* 37 (6541):. 599-602, 1995

Chavrier P and Goud B.: The role of ARF and RabGTPases in membrane transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11.: 466-475, 1999

Chen H, Bernstein BW and Bamburg JR.: Regulating actin-filament dynamics *in vivo*. *Trends Biochem. Sci.* 25.: 19-23, 2000

Chen W, Glasgow W, Murphy E and Steenbergen C.: Lipoxygenase metabolism of arachidonic acid in ischemic preconditioning and PKC-induced protection in heart. *Am. J. Physiol.* 276 (45):. H2094-H2101, 1999

Chun YK, Kim J, Kwon S, Choi SH, Hong F, Moon K, Kim JM, Choi SL, Ha J and Kim SS.: Phosphatidylinositol 3-kinase stimulates muscle differentiation by activating p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276 (2): 502-507, 2000

Clark SF, Martin S, Carozzi AJ, Hill MM and James DE.: Intracellular localization of phosphatidylinositide 3-kinase and insulin receptor substrate-1 in adipocytes: Potential involvement of a membrane skeleton. *J. Cell. Biol.* 140 (5): 1211-1225, 1998

Clausen T.: The effect of insulin on glucose transport in muscle cells. *Curr. Top. Membr. Transp.* 6.: 169-226, 1975

Cooper JA and Schafer DA.: Control of actin assembly and disassembly at filament ends. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12.: 97-103, 2000

Cormont M, Bortoluzzi MN, Gautier N, Mari M, Van Obberghen E and Le Marchand-Brustel Y.: Potential role of Rab4 in the regulation of subcellular localization of Glut4 in adipocytes. *Mol. Cell. Biol.* 16: 6879-6886, 1996 (A)

Cormont ME, Van Obberghen E, Zerial M and Le Marchand-Brustel Y.: Insulin induces a change in Rab5 subcellular localization in adipocytes independently of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Endocrinology* 137: 3408-3415, 1996 (B)

Cormont M, Tanti JF, Zahraoui A, Van Obberghen E, Tavitian A and Le Marchand-Brustel Y.: Insulin and okadaic acid induce Rab4 redistribution in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 268: 19491-19497, 1993

Cormont M, Tanti JF, Gremaux T, Van Obberghen E and Le Marchand-Brustel Y.:
Subcellular distribution of low molecular weight guanosine triphosphate-binding proteins in adipocytes: colocalization with the glucose transporter Glut 4. *Endocrinology* 129: 3343-3350, 1991

Cristopher L & Carpenter MD.: Actin cytoskeleton and cell signaling. *Crit. Care Med.* 28 (4): N94-N99, 2000

Darchen F and Goud B.: Multiple aspects of Rab protein action in the secretory pathway: focus on Rab3 and Rab6. *Biochimie* 82 (4): 375-384, 2000

DeFronzo AR, Ferrannini E, Sarto Y, Felig P and Wahren J.: Synergistic interaction between exercise and insulin on peripheral uptake. *J. Clin. Invest.* 68.: 1468-1474, 1981

Di Somma S, Marotta M, Salvatore G, Cuda G, De Vivo F, Di Benedetto MP, Ciaramella F, Caputo G and De Divitis O.: Changes in myocardial cytoskeletal intermediate filaments and myocyte contractile dysfunction in dilated cardiomyopathy: an in vivo study in humans. *Heart* 84.: 659-667, 2000

Doege H, Schurmann A, Bahrenberg G, Brauers A and Joost HG.: GLUT8, a novel member of the sugar transporter facilitator family with glucose transport activity. *J. Biol. Chem.* 275 (21): 16275-16280, 2000 (A)

Doege H, Bocianski A, Joost HG and Schurmann A.: Activity and genomic organization of human glucose transporter 9 (GLUT9), a novel member of the family of sugar-transporter facilitators predominantly expressed in brain and leukocytes. *Biochem. J.* 350 (3): 771-776, 2000 (B)

Doucet JP, Pierce GN, Hertzberg EL and Tuana BS.: Low molecular weight GTP-binding proteins in cardiac muscle. Association with a 32-kDa component related to connexins. *J. Biol. Chem.* 267.: 16503-16508, 1992

Dransfeld O, Uphues I, Sasson S, Schürmann A, Joost HG and Eckel J.: Regulation of subcellular distribution in cardiomyocytes: Rab4A reduces basal glucose transport and augments insulin responsiveness. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 108 (1): 26-36, 2000

Eckel J, Till M and Uphues I.: Cardiac insulin resistance is associated with an impaired recruitment of phosphatidylinositol 3-kinase to GLUT4-vesicles. *Int. J. Obesity* 24 (Suppl 2): S120-S121, 2000

Eckel J, Asskamp B and Reinauer H.: Induction of insulin resistance in primary cultured adult cardiac myocytes. *Endocrinology* 129: 345-352, 1991

Eckel J.: Molekulare Mechanismen der Insulinwirkung am Herzmuskel. *Georg Thieme Verlag, Stuttgart/ New York, 1989*

Eckel J, Pandalis G and Reinauer H.: Insulin action on glucose transport system in isolated cardiomyocytes from adult rat. *Biochem. J.* 21.: 385-392, 1983

Elmendorf JS and Pessin JE.: Insulin Signaling Regulating the Trafficking and Plasma Membrane Fusion of GLUT4-Containing Intracellular Vesicles. *Exp. Cell Res.* 253.: 55-62, 1999

Emoto M, Langille SE and Czech MP.: A role for kinesin in insulin-stimulated GLUT4 glucose transporter translocation in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 276 (14): 10677-10682, 2001

Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM and Danielsen M.: Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84 (21): 7413-7417, 1987

Ferrara CM and Cushman SW.: GLUT4 trafficking in insulin-stimulated rat adipose cells: evidence that heterotrimeric GTP-binding proteins regulate the fusion of docked GLUT4-containing vesicles. *Biochem. J.* 343: 571-577, 1999

Fischer Y, Thomas J, Sevilla L, Munoz P, Becker C, Holman G, Kozka IJ, Palacin M, Testar X, Kammermeier H and Zorzano A.: Insulin-induced Recruitment of Glucose Transporter 4 (GLUT4) and GLUT1 in Isolated Rat Cardiac Myocytes. *J. Biol. Chem.* 272 (11): 7085-7092, 1997

Fixman ED, Fournier TM, Kamikura DM, Naujokas MA and Park M.: Pathways downstream of Shc and Grb2 are required for cell transformation by the trp-Met oncoprotein. *J. Biol. Chem.* 271 (22): 13116-13122, 1996

Fletcher LM, Welsh GI, Oatey PB and Tavare JM.: Role for the microtubule cytoskeleton in GLUT4 vesicle trafficking and in the regulation of insulin-stimulated glucose uptake. *Biochem. J.* 352: 267-276, 2000

Fletcher LM and Tavare JM.: Divergent signalling mechanisms involved in insulin-stimulated GLUT4 vesicle trafficking to the plasma membrane. *Biochem. Soc. Trans.* 27 (4): 677-683, 1999

Foster LJ and Klip A.: Mechanism and regulation of GLUT-4 vesicle fusion in muscle and fat cells. *Am. J. Physiol.* 279.: C877-C890, 2000

Freire-Moar J, Alavi-Nassab A, Ng M, Mulkins M and Sigal E.: Cloning and Characterization of a murine lipoxigenase. *Biochim. Biophys. Acta* 1254.: 112-116, 1995

Funk CD.: The molecular biology of mammalian lipoxigenases and the quest for eicosanoid functions using lipoxigenase-deficient mice. *Biochim. Biophys. Acta* 1304.: 65-84, 1996

Furler SM, Jenkins AB, Storlien LH and Kraegen EW.: In vivo location of the rate-limiting step of hexose uptake in muscle and brain tissue of rats. *Am. J. Physiol.* 261.: E337-E347, 1991

Gerrits PM, Olson AL and Pessin JE.: Regulation of the GLUT4/muscle-fat glucose transporter mRNA in adipose tissue of insulin-deficient diabetic rats. *J. Biol. Chem.* 268: 640-644, 1993

Gonzalez Jr. L and Scheller RH.: Regulation of Membrane Trafficking: Structural Insights from a Rab/Effector Complex. *Cell* 96.: 755-758, 1999

Goodyear LJ and Kahn BB.: Exercise, Glucose Transport, and Insulin Sensitivity. *Annu. Rev. Med.* 49.: 235-261, 1998

Goodyear LJ, Hirshman MF and Horton ES.: Exercise-induced translocation of skeletal muscle glucose transporters. *Am. J. Physiol.* 261.: E795-E799, 1991

Gould GW and Holman GD.: The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression. *Biochem. J.* 295.: 329-341, 1993

Gould GW and Bell GI.: Facilitative glucose transporters: an expanding family. *Trends Biochem. Sci.* 15.: 18-23, 1990

Goud B and McCaffrey M.: Small GTP-binding proteins and their role in transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* 3: 626-633, 1991

Gowri MS, Reaven GM and Azhar S.: Effect of masoprocol on glucose transport and lipolysis by isolated rat adipocytes. *Metabolism* 48 (4): 411-414, 1999

Graham FL and Van Der Eb AJ.: A New Technique for the Assay of Infectivity of Human Adenovirus 5 DNA. *Virology* 52.: 456-467, 1973

Guerre-Millo M, Baldini G, Lodish HF, Lavau M and Cushman SW.: Rab3D in rat adipose cells and its overexpression in genetic obesity (Zucker fatty rat). *Biochem. J.* 321: 89-93, 1997

Guilherme A, Emoto M, Buxton JM, Bose S, Sabini R, Theurkauf WE, Leszyk J and Czech M.: Perinuclear Localization and Insulin Responsiveness of GLUT4 Requires Cytoskeletal Integrity in 3T3-L1 Adipocytes. *J. Biol. Chem.* 275 (49): 38151-38159, 2000

Hall A.: The cellular function of small GTP-binding proteins. *Science* 249.: 635-640, 1990

Hanahan D.: Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166 (4): 557-580, 1983

Hashiramoto M and James DE.: Characterization of Insulin-Responsive GLUT4 Storage Vesicles Isolated from 3T3L1-Adipocytes. *Mol. Cell. Biol.* 20 (1): 416-427, 2000

Hein S, Kostin S, Heling A Maeno Y and Schaper J.: The role of the cytoskeleton in heart failure. *Cardiovasc. Res.* 45.: 273-278, 2000

Hescheler J, Meyer R, Plant S, Krautwurst D, Rosenthal W and Schultz G: Morphological, biochemical, and electrophysiological characterization of a clonal cell (H9c2) line from rat heart. *Circ. Res.* 69 (6): 1476-1486, 1991

Holman GD and Kasuga M.: From receptor to transporter: insulin signalling to glucose transport. *Diabetologia* 40.: 991-1003, 1997

Holman GD, Parkar BA and Midgley PJW.: Exofacial photoaffinity labelling of the human erythrocyte sugar transporter. *Biochim. Biophys. Acta* 855.: 115-126, 1986

Huang JT, Welch JS, Ricote M, Binder CJ, Willson TM, Kelly C, Witztum JL, Funk CD, Conrad D and Glass CK.: Interleukin-4-dependent production of PPAR-ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. *Nature* 400.: 378-382, 1999

Huang XP, Pi YQ, Lokutta AJ, Greaser ML and Walker JW.: Arachidonic acid stimulates protein kinase C- ϵ redistribution in heart cells. *J. Cell Sci.* 110.: 1625-1634, 1997

Hug H and Sarre TF.: Protein kinase C isozymes: divergence in signal transduction? *Biochem. J.* 291.: 329-343, 1993

Hundal HS, Darakshan F, Kristiansen S, Blakemore SJ and Richter EA.: GLUT5 expression and fructose transport in human skeletal muscle. *Adv. Exp. Med. Biol.* 441.: 35-45, 1998

Jahn R and Sudhof TC.: Membrane fusion and exocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* 68.: 863-911, 1999

James DE, Brown R, Navarro J and Pilch PF.: Insulin-regulatable tissues express a unique insulin-sensitive glucose transport protein. *Nature* 333.: 183-185, 1988

James DE, Strube M and Mueckler M.: Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transporter. *Nature* 338.: 83-87, 1989

Kanai F, Nishioka Y, Hayashi H, Kamohara S, Todaka M and Ebina Y.: Direct demonstration of Insulin-induced GLUT4 Translocation to the Surface of Intact Cells by Insertion of a *c-myc* Epitope into an Exofacial GLUT4 Domain. *J. Biol. Chem.* 268 (19): 14523-14526, 1993

Kandror KV and Pilch PF.: Compartmentalization of protein traffic in insulin-sensitive cells. *Am. J. Physiol.* 271: E1-E14, 1996

Kang LT, Phillips TM and Vanderhoek JY.: Novel membrane target proteins for lipoxygenase-derived mono(S)hydroxy fatty acids. *Biochem. Biophys. Acta* 1438.: 388-398, 1999

Kang LT and Vanderhoek JY.: Mono (S) hydroxy fatty acids: novel ligands for cytosolic actin. *J. Lipid Res.* 39.: 1476-1482, 1998

Kao AW, Yang C and Pessin JE.: Functional comparison of the role of dynamin 2 splice variants on GLUT-4 endocytosis in 3T3L1 adipocytes. *Am. J. Physiol.* 278.: E825-E831, 2000

Kao AW, Noda Y, Johnson JH, Pessin JE and Saltiel AR.: Aldolase Mediates the Association of F-actin with the Insulin-responsive Glucose Transporter GLUT4. *J. Biol. Chem.* 274 (25):. 17742-17747, 1999

Keenan C and Kelleher D.: Protein Kinase C and the Cytoskeleton. *Cell. Signal.* 10 (4):. 225-232, 1998

Kellerer M, Lammers R and Haering HU.: Insulin signal transduction: possible mechanisms for insulin resistance. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 107 (2):. 97-106, 1999

Kessler A, Uphues I, Ouwens DM, Till M and Eckel J.: Diversification of cardiac insulin signaling involves the p85 / subunits of phosphatidylinositol 3-kinase. *Am. J. Physiol.* 280 (1):. E65-E74, 2001

Kessler A, Tomas E, Immler D, Meyer HE, Zorzano A and Eckel J.: Rab11 is associated with GLUT4-containing vesicles and redistributes in response to insulin. *Diabetologia*, 43 (12): 1518-1527, 2000

Khayat ZA, Tong P, Yaworsky K, Bloch RJ and Klip A.: Insulin-induced filament remodeling colocalizes actin with phosphatidylinositol 3-kinase and GLUT4 in L6 myotubes. *J. Cell. Sci.* 113.: 279-290, 2000

Kim JM, Yoon MY, Kim J, Kim SS, Kang I, Ha J and Kim SS.: Phosphatidylinositol 3-kinase regulates differentiation of H9c2 cardiomyoblasts mainly through the protein kinase B/Akt-independent pathway. *Arch. Biochem. Biophys.* 367 (1): 67-73, 1999

Knight JB, Cao KT, Gibson V and Olson AL.: Expression of a Prenylation-Deficient Rab4 Interferes with Propagation of Insulin Signaling through Insulin Receptor Substrate-1. *Endocrinology* 141.: 208-218, 2000

Kolter T, Uphues I and Eckel J.: Molecular analysis of insulin resistance in isolated ventricular cardiomyocytes of obese Zucker rats. *Am. J. Physiol.* 273 (36): E59-E67, 1997

Kotliar N and Pilch PF.: Expression of the glucose transporter isoform GLUT 4 is insufficient to confer insulin-regulatable hexose uptake to cultured muscle cells. *Mol. Endocrinol.* 6: 337-345, 1992

Kuhn H and Thiele BJ.: The diversity of the lipoxygenase family. *FEBS Lett.* 449.: 7-11, 1999

Kuzuya T, Hoshida S, Kim Y, Oe H, Hori M, Kamada T and Tada M.: Free radical generation with arachidonate lipoxygenase reaction relates to reoxygenation induced myocardial cell injury. *Cardiovasc. Res.* 27 (6): 1056-1060, 1993

Laemmli UK.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (259): 680-685, 1970

Lamphear L & Lienhard GE: Components of signaling pathways for insulin and insulin-like growth factor-I in muscle myoblasts and myotubes. *Endocrinology* 131 (5): 2196-2202, 1992

Lee WS, Kanai Y, Wells RG and Hedinger MA.: The high affinity Na⁺/glucose cotransporter. Re-evaluation of function and distribution of expression. *J. Biol. Chem.* 269.: 12032-12039, 1994

Li L, Omata W, Kojima I and Shibata H.: Direct interaction of Rab4 with Syntaxin 4. *J. Biol. Chem.* 276 (16): 5265-5273, 2001

Long SD and Pekala PH.: Lipid mediators of insulin resistance: Ceramide down-regulates GLUT4 gene transcription in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. J.* 319.: 179-184, 1996

Long SD and Pekala PH.: Regulation of GLUT4 gene expression by arachidonic acid. *J. Biol. Chem.* 271 (2): 1138-1144, 1996

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193.: 265-275, 1951

Lu Z, Zaniowska E and Lo TC.: Use of transport mutants to examine the identity and expression of GLUT isoforms in rat cardiac myoblasts. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 41 (1): 103-121, 1997

Marsh BJ, Alm RA, McIntosh SR and James DE.: Molecular Regulation of GLUT-4 Targeting in 3T3-L1 Adipocytes. *J. Cell Biol.* 130 (5): 1081-1091, 1995

Martelli AM, Bareggi R, Baldini G, Scherer PE, Lodish HF and Baldini G.: Diffuse vesicular distribution of Rab3D in the polarized neuroendocrine cell line AtT-20. *FEBS Lett.* 368.: 271-275, 1995

Martin G, Schoonjans K, Staels B and Auwerx J.: PPAR activators improve glucose homeostasis by stimulating fatty acid uptake in the adipocytes. *Atherosclerosis* 137 Suppl.: S75-S80, 1998

Martin S, Millar CA, Lyttle CT, Meerloo T, Marsh BJ, Gould GW and James DE.: Effects of insulin on intracellular GLUT4 vesicles in adipocytes: evidence for a secretory mode of regulation. *J. Cell Sci.* 113.: 3427-3438, 2000

Martin S, Slot JW and James DE.: GLUT4 Trafficking in Insulin-Sensitive Cells. *Cell Biochem. Biophys.* 30.: 89-113, 1999

Martinez O and Goud B.: Rab Proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1404.: 101-112, 1998

Millar CA, Shewan A, Hickson GRX, James DE and Gould GW.: Differential Regulation of Secretory Compartments Containing the Insulin-responsive Glucose Transporter 4 in 3T3-L1 Adipocytes. *Mol. Biol. Cell* 10.: 3675-3688, 1999

Mohrmann K and van der Sluijs P.: Regulation of membrane transport through the endocytotic pathway by rabGTPases. *Mol. Memb. Biol.* 16.: 81-87, 1999

Mora S, Monden I, Zorzano A and Keller K.: Heterologous expression of rab4 reduces glucose transport and GLUT4 abundance at the cell surface in oocytes. *Biochem. J.* 324: 455-459, 1997

Morgan HE, Henderson MJ, Regen DM and Park CR.: Regulation of glucose uptake in muscle. The effects of insulin and anoxia on glucose transport and phosphorylation in the isolated, perfused heart of normal rats. *J. Biol. Chem.* 236.: 253-261, 1961

Mueckler M.: Facilitative glucose transporters. *Europ. J. Biochem.* 219.: 713-725, 1994

Murakami K, Die T, Suzuki M, Mochizuki T and Kadowaki T.: Evidence for Direct Binding of Fatty Acids and Eicosanoids to Human Peroxisome Proliferators-Activated Receptor . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260.: 609-613, 1999

Murphy E, Glasgow W, Fralix, T and Steenbergen C.: Role of lipoxygenase metabolites in ischemic preconditioning. *Circ. Res.* 76.: 457-467, 1995

Nakaruma M, Yamamoto S and Ishimura K.: Subcellular localization of arachidonate 12-lipoxygenase and morphological effect of its overexpression on murine keratinocytes. *Cell Tissue Res.* 288.: 327-334, 1997

Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y and Hofschneider PH.: Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.* 1 (7): 841-845, 1982

Newton AC.: Protein Kinase C: Structure, Function, and Regulation. *J. Biol. Chem.* 270 (48): 28495-28498, 1995

Nishida M, Nagao T and Kurose H.: Activation of Rac1 increases c-Jun NH(2)-terminal kinase activity and DNA fragmentation in a calcium-dependent manner in rat myoblast cell line H9c2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 262 (2): 350-354, 1999

Novick P and Brennwald P.: Friends and family: the role of the Rab GTPases in vesicular traffic. *Cell* 75: 597-601, 1993

Nugent C, Prins JB, Whitehead JP, Wentworth JM, Chatterjee VK and O'Rahilly S.: Arachidonic acid stimulates glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes by increasing GLUT1 and GLUT4 levels at the plasma membrane: Evidence for involvement of lipoxygenase metabolites and PPAR- γ . *J. Biol. Chem.* 276 (12): 9149-9157, 2001

Omata W, Shibata H, Takata K and Kojima I.: Actin filaments play a critical role in insulin-induced exocytotic recruitment but not in endocytosis of GLUT4 in isolated rat adipocytes. *Biochem. J.* 346.: 321-328, 2000

- Ouwens DM, van der Zon GCM, Pronk GJ, Bos JL, Moeller W, Cheatham B, Kahn CR and Maassen JA.: A mutant insulin receptor induces formation of a Shc-growth factor receptor bound protein 2 (Grb2) complex and p21^{ras}-GTP without detectable interaction of insulin receptor substrate 1 (IRS-1) with Grb2. Evidence for IRS-1-independent p21^{ras}-GTP formation. *J. Biol. Chem.* 269.: 33116-33122, 1994
- Ozanne SE, Nave BT, Wang CL, Sheperd PR, Prins J and Smith GD.: Poor fetal nutrition causes long-term changes in expression of insulin signaling components in adipocytes. *Am. J. Physiol.* 273 (1 Pt 1): E46-E51, 1997
- Parente JA & Chew CS.: Combined effect of transfection reagent and Plasmid DNA quality on transfection of primary rabbit gastric cells. *QIAGEN News* 5: 1, 1998
- Phay JE, Hussain HB and Moley JF.: Cloning and expression analysis of a novel member of the facilitative glucose transporter family, SLC2A9 (GLUT9). *Genomics* 66 (2): 217-220, 2000
- Pol A, Ortega D and Enrich C.: Identification of cytoskeleton-associated proteins in isolated rat liver endosomes. *Biochem. J.* 327.: 741-746, 1997
- Powell KA, Campbell LC, Tavare JM, Leader DP, Wakefield JA and Gould GW.: Trafficking of Glut4-Green Fluorescent Protein chimaeras in 3T3-L1 adipocytes suggests distinct internalization mechanisms regulating cell surface Glut4 levels. *Biochem. J.* 344.: 535-543, 1999

- Powell WS.: Precolumn extraction and reversed-phase high-pressure liquid chromatography of prostaglandins and leukotrienes. *Anal. Biochem.* 164 (1): 117-131, 1987
- Prekeris R, Mayhew MW, Cooper JB and Terrian DM.: Identification and localization of an actin-binding motif that is unique to the epsilon isoform of protein kinase C and participates in the regulation of synaptic function. *J. Cell Biol.* 132.: 77-90, 1996
- Qualmann B, Kessels MM and Kelly RB.: Molecular Links between Endocytosis and the Actin Cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 150 (5): F111-F116, 2000
- Quon MJ, Cushman SW and Holman GD.: Use of bismannose photolabel to elucidate insulin-regulated GLUT4 subcellular trafficking kinetics in rat adipose cells. Evidence that exocytosis is a critical site of hormone action. *J. Biol. Chem.* 268: 17820-17829, 1993
- Randhawa VK, Bilan PJ, Khayat ZA, Daneman N, Liu Z, Ramlal T, Volchuk A, Peng XR, Coppola T, Regazzi R, Trimble WS and Klip A.: VAMP2, but Not VAMP3/Cellubrevin, Mediates Insulin-dependent Incorporation of GLUT4 into the Plasma Membrane of L6-Myoblasts. *Mol. Biol. Cell* 11.: 2403-2417, 2000
- Rea S and James D.E.: Moving GLUT4: the biogenesis and trafficking of GLUT4 storage vesicles. *Diabetes* 46: 1667-1677, 1997
- Rice RL, Tang DG, Haddad M, Honn KV and Taylor JD.: 12(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid increases the actin microfilament content in B16a melanoma cells: A protein kinase-dependent process. *Int. J. Cancer* 77.: 271-278, 1998

Robinson R, Robinson LJ, James DE and Lawrence JC Jr.: Glucose transport in L6 myoblasts overexpressing GLUT1 and GLUT4. *J. Biol. Chem.* 268: 22119-22126, 1993

Robinson LJ, Pang S, Harris DS, Heuser J and James DE.: Translocation of the glucose transporter (GLUT4) to the cell surface in permeabilized 3T3-L1 adipocytes: effects of ATP insulin, and GTP gamma S and localization of GLUT4 to clathrin lattices. *J. Cell. Biol.* 117: 1181-1196, 1992

Rodman JS and Wandinger-Ness A.: Rab-GTPases coordinate endocytosis. *J. Cell Sci.* 113.: 183-192, 2000

Rogers SL and Gelfand VI.: Membrane trafficking, organelle transport, and the cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12.: 57-62, 2000

Rothman JE and Soellner TH.: Throttles and Dampers: Controlling the Engine of Membrane Fusion. *Science* 276.: 1212-1213, 1997

Ryder JW, Gilbert M and Zierath JR.: Skeletal muscle and insulin sensitivity: Pathophysiological alterations. *Front. Biosci.* 6.: d154-163, 2001

Sasson S, Davarashvili A and Reich R.: Role of lipoxygenase in the regulation of glucose transport in aortic vascular cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 469.: 377-383, 1999

- Sasson S, Kaiser N, Dan-Goor M, Oron R, Koren S, Wertheimer K, Unluhizarci K and Cerasi E.: Substrate autoregulation of glucose transport: hexose 6-phosphate mediates the cellular distribution of glucose transporters. *Diabetologia* 40: 30-39, 1997
- Satoh S, Nishimura H, Clark AE, Kozka IJ, Vannucci SJ, Simpson IA, Quon MJ, Cushman SW and Holman GD.: Use of bismannose photolabel to elucidate insulin-regulated GLUT4 subcellular trafficking kinetics in rat adipose cells. Evidence that exocytosis is a critical site of hormone action. *J. Biol. Chem.* 268: 17820-17829, 1993
- Schimmöller F, Simon I and Pfeffer SR.: Rab GTPases, Directors of Vesicle docking. *J. Biol. Chem.* 273.: 22161-22164, 1998
- Schoonjans K, Martin G, Staels B and Auwerx J.: Peroxisome proliferator-activated receptors, orphans with ligands and functions. *Curr. Opin. Lipidol.* 8 (3): 159-166, 1997
- Schürmann A, Monden I, Joost HG and Keller K.: Subcellular distribution and activity of glucose transporter isoforms GLUT1 and GLUT4 transiently expressed in COS-7 cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1131: 245-252, 1992
- Shepherd PR, Withers DJ and Siddle K.: Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem. J.* 333.: 471-490, 1998
- Sherman LA, Hirshman MF, Cormont M, Le Marchand-Brustel Y and Goodyear L.: Differential Effects of Insulin and Exercise on Rab4 Distribution in Rat Skeletal Muscle. *Endocrinology* 137.: 266-273, 1996

Shibata H, Omata W and Kojima I.: Insulin stimulates guanine nucleotide exchange on Rab4 via a wortmannin-sensitive signaling. *J. Biol. Chem.* 272: 14542-14546, 1997

Shibata H, Omata W, Suzuki Y, Tanaka S and Kojima I.: A synthetic peptide corresponding to the Rab4 hypervariable carboxyl-terminal domain inhibits insulin action on glucose transport in rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* 271: 9704-9709, 1996

Shibata H, Suzuki Y, Omata W, Tanaka S and Kojima I.: Dissection of GLUT4 recycling pathway into exocytosis and endocytosis in rat adipocytes. Evidence that GTP-binding proteins are involved in both processes. *J. Biol. Chem.* 270: 11489-11495, 1995

Shisheva A and Czech MP.: Association of Cytosolic Rab4 with GDI Isoforms in Insulin-Sensitive 3T3-L1 Adipocytes. *Biochemistry* 36.: 6564-6570, 1997

Skolnik EY, Margolis B, Mohammadi M, Lowenstein E, Fischer R, Drepps A, Ullrich A and Schlessinger J.: Cloning of PI 3-kinase-associated p85 utilizing a novel method for expression/cloning of target proteins for receptor tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 271.:9704-9709, 1991

Slot JW, Geuze HJ, Gigengack S, Lienhard GE and James DE.: Immunolocalization of the insulin regulatable glucose transporter in brown adipose tissue of the rat. *J. Cell Biol.* 113: 126-135, 1991

Sogaard M, Tani K, Ye RR, Geromanos S, Tempst P, Kirchhausen T, Rothman JE and Soellner T.: A Rab Protein is Required for The Assembly of SNARE Complexes in the Docking of Transport Vesicles. *Cell* 78.: 937-948, 1994

Staels B, Schoonjans K, Fruchart JC and Auwerx J.: The effects of fibrates and thiazolidinediones on plasma triglyceride metabolism are mediated by distinct peroxisome proliferator activated receptors (PPARs). *Biochimie* 79.: 95-99, 1997

Standaert ML, Galloway L, Karnam P, Bandyopadhyay G, Moscatt J and Farese RV.: Protein Kinase C- ζ as a Downstream Effector of Phosphatidylinositol 3-Kinase during Insulin Stimulation in Rat Adipocytes. Potential Role in Glucose Transport. *J Biol. Chem.* 272 (48): 30075-30082, 1997

Starkopf J, Andreasen TV, Bugge E and Ytrehus K.: Lipid peroxidation, arachidonic acid and products of the lipoxxygenase pathway in ischemic preconditioning of the heart. *Cardiovasc. Res.* 37.: 66-75, 1998

Su YC, Kao LS, Liang Y, Tsai MH and Chern Y.: Distribution and Regulation Of Rab3C, A Small Molecular Weight GTP-Binding Protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 200 (3): 1257-1263, 1994

Sun XJ, Wang LM, Zhang Y, Yenush L, Myers MG Jr, Glasheen E, Lane WS, Pierce JH and White EF.: Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. *Nature* 377 (6545): 173-177, 1995

Sunshine C, Francis S and Kirk KL.: Rab3B regulates ZO-1 targeting and actin organization in PC12 neuroendocrine cells. *Exp. Cell Res.* 257.: 1-10, 2000

Takai Y, Sasaki T and Matozaki T.: Small GTP-binding Proteins. *Physiol. Rev.* 81 (1): 153-208, 2001

Tang DG, Diglio CA and Honn KV.: Activation of microvascular endothelium by eicosanoid 12(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid leads to enhanced tumor cell adhesion via up-regulation of surface expression of α_3 integrin: A posttranscriptional, protein kinase C- and cytoskeleton-dependent process. *Cancer Res.* 54.: 1119-1129, 1994

Tang DG, Timar J, Grossi IM, Renaud C, Kimler VA, Diglio CA, Taylor JD and Honn KV.: The lipoxygenase metabolite, 12(S)-HETE induces a protein kinase C-dependent cytoskeletal rearrangement and retraction of microvascular endothelial cells. *Exp. Cell Res.* 207.: 361-375, 1993 (A)

Tang DG, Diglio CA and Honn KV.: 12(S)-HETE-induced microvascular endothelial cell retraction results from PKC-dependent rearrangement of cytoskeletal elements and α_3 integrins. *Prostaglandins* 45.: 249-268, 1993 (B)

Tang XM, Redemann CT and Szoka FC.: In vitro gene delivery by degraded polyamidoamine dendrimers. *Bioconjug. Chem.* 7 (6): 703-714, 1996

Tardy-Cantalupy I, Montessuit C, Papageorgiou I, Remondino-Müller A, Assimacopoulos-Jeannet F, Morel DR and Lerch R.: Effect of transient ischemia on the expression of glucose transporters GLUT-1 and GLUT-4 in rat myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 31.: 1143-1155, 1999

- Telting D, van der Zon GCM, Dorrestijn J and Maassen JA.: IRS-1 tyrosine phosphorylation reflects insulin-induced metabolic and mitogenic responses in 3T3-L1 adipocytes. *Arch. Phys. Biochem.*: in press, 2001
- Till M, Kolter T and Eckel J.: Molecular mechanisms of contraction-induced translocation of GLUT4 in isolated cardiomyocytes. *Am. J. Cardiol.* 80 (3A): 85A-89A, 1997
- Tohijma T, Honda N, Mochizuki K, Watanabe K, Arisaka T, Kawamori R, Nakamura M, Kurahashi Y, Yoshimoto T and Yamamoto S.: Decreased activity of arachidonate 12-lipoxygenase in platelets of japanese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 47 (3): 257-263, 1998
- Toker A.: Signaling Through Protein Kinase C. *Front. Biosci.* 3: D1134-1147, 1998
- Tsakiridis T, Tong P, Matthews B, Tsiani E, Bilan PJ, Klip A and Downey JP.: Role of the actin cytoskeleton in insulin action. *Microsc. Res. Tech.* 47 (2): 79-92, 1999
- Tsakiridis T, Wang Q, Taha C, Grinstein S, Downey G and Klip A.: Involvement of the actin network in insulin signalling. *Soc. Gen. Physiol. Ser.* 52: 257-271, 1997
- Tsakiridis T, Vranic M and Klip A.: Disassembly of the actin network inhibits insulin-dependant stimulation of glucose transport and prevents recruitment of glucose transporters to the plasmamembrane. *J. Biol. Chem.* 267 (47): 29934-29942, 1994

- Tsiani E, Bogdanovic E, Sorisky A, Nagy L and Fantus IG.: Tyrosine phosphatase inhibitors, vanadate and pervanadate, stimulate glucose transport and GLUT translocation in muscle cells by a mechanism independent of phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase C. *Diabetes* 47 (11): 1676-1686, 1998
- Ueyama A, Yaworsky KL, Wang Q, Ebina Y and Klip A.: GLUT-4myc ectopic expression in L6 myoblasts generates a GLUT-4-specific pool conferring to insulin sensitivity. *Am. J. Physiol.* 277.: E572-E578, 1999
- Uphues I, Kolter T, Goud B and Eckel J.: Failure of insulin-regulated recruitment of the glucose transporter GLUT4 in cardiac muscle of obese Zucker rats is associated with alterations of small-molecular-mass GTP-binding proteins. *Biochem. J.* 311, 161-166, 1995 (A)
- Uphues I, Chern Y and Eckel J.: Insulin-dependent translocation of the small GTP-binding protein rab3C in cardiac muscle: studies on insulin-resistant Zucker rats. *FEBS Lett.* 377: 109-112, 1995 (B)
- Uphues I, Kolter T, Goud B and Eckel J.: Insulin-induced translocation of the glucose transporter GLUT4 in cardiac muscle: studies on the role of small-molecular-mass GTP-binding proteins. *Biochem. J.* 301.: 177-182, 1994
- Vaheri A and Pagano JS.: Infectious poliovirus RNA: A sensitive method of assay. *Virology* 27 (3): 434-436, 1965

Valentijn K, Valentijn JA and Jamieson JD.: Role of Actin in Regulated Exocytosis and Compensatory Membrane Retrieval: Insights from an Old Acquaintance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 266.: 652-661, 1999

Valentijn JA, LaCivita DQ, Gumkowski FD and Jamieson JD.: Rab4 associates with the actin terminal web in developing rat pancreatic acinar cells. *Eur. J. Cell Biol.* 72.: 1-8, 1997

Van der Sluijs P, Hull M, Webster P, Male P, Goud B and Mellmann I.: The small GTP-binding protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway. *Cell* 70: 729-740, 1992 (A)

Van der Sluijs P, Hull M, Huber LA, Male P, Goud B and Mellman I.: Reversible phosphorylation-dephosphorylation determines the localization of rab4 during the cell cycle. *EMBO J.* 11 (12): 4379-4389, 1992 (B)

Van der Sluijs P, Hull M, Zahraoui A, Tavitian A, Goud B and Mellmann I.: The small GTP-binding protein rab4 is associated with early endosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 6313-6317, 1991

Vollenweider P, Clodi M, Martin SS, Imamura T, Kavanaugh WM and Olefsky JM.: An SH2 Domain-Containing 5' Inositolphosphatase Inhibits Insulin-Induced GLUT4 Translocation and Growth Factor-Induced Actin Filament Rearrangement. *Mol. Cell. Biol.* 19 (2): 1081-1091, 1999

- Vollenweider P, Martin SS, Haruta T, Morris AJ, Nelson JG, Cormont M, Le Marchand-Brustel Y, Rose DW and Olefsky JM.: The small guanosine triphosphate-binding protein Rab4 is involved in insulin-induced GLUT4 translocation and actin filament rearrangement in 3T3-L1 cells. *Endocrinology* 138: 4941-4949, 1997
- Von Holtey M.: Untersuchungen zum nukleären Insulin-Signaltransfer in Kardiomyozyten der Ratte. *Dissertation an der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf*, 1996
- Wang L, Hayashi H, Kishi K, Huang L, Hagi A, Tamaoka K, Hawkins PT and Ebina Y.: G_i-mediated translocation of GLUT4 is independent of p85/p110 and p110 phosphoinositide 3-kinases but might involve the activation of Akt kinase. *Biochem. J.* 345.: 543-555, 2000
- Wang Q, Somwar R, Bilan PJ, Liu Z, Jin J, Woodgett JR and Klip A.: Protein Kinase B/Akt Participates in GLUT4 Translocation by Insulin in L6 Myoblasts. *Mol. Cell. Biol.* 19 (6): 4008-4018,, 1999
- Wang Q, Bilan PJ, Tsakiridis T, Hinek A and Klip A.: Actin filaments participate in the relocalization of phosphatidylinositol 3-kinase to glucose transporter-containing compartments and in the stimulation of glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. J.* 331.: 917-928, 1998 (A)
- Wang Q, Khayat Z, Kishi K, Ebina Y and Klip A.: GLUT4 translocation by insulin in intact muscle cells: detection by a fast and quantitative assay. *FEBS Lett.* 427.: 193-197, 1998 (B)

- Wang W, Hansen PA, Marshall BA, Holloszy JO and Mueckler M.: Insulin Unmasks a COOH-Terminal Glut4 Epitope and Increases Glucose Transport across T-Tubules in Skeletal Muscle. *J. Cell Biol.* 135 (2): 145-430, 1996
- Weber M, Moeller K, Welzeck M and Schorr J.: Short technical reports. Effects of lipopolysaccharide on transfection efficiency in eukaryotic cells. *Biotechniques* 19(6): 930-940, 1995
- White MF.: The insulin signalling system and the IRS proteins. *Diabetologia* 40 (2): S2-S17, 1997
- White MF and Kahn CR.: The insulin signaling system. *J. Biol. Chem.* 269.: 1-4, 1994
- Wright EM, Loo DD, Panayotova-Heiermann M and Boorer KJ.: Mechanisms of Na(+)-glucose cotransporter. *Biochem. Soc. Trans.* 22.: 646-650, 1994
- Yamada M and Proia AD.: 8(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid is the lipoxygenase metabolite of arachidonic acid that regulates epithelial cell migration in the rat cornea. *Cornea* 19 (Suppl. 1): S13-S20, 2000
- Yamamoto S, Suzuki H, Nakamura M and Ishimura K.: Arachidonate 12-lipoxygenase isozymes. *Adv. Exp. Med. Biol.* 447.: 37-44, 1999
- Yamamoto S, Suzuki H and Ueda N.: Arachidonate 12-Lipoxygenases. *Prog. Lipid Res.* 36 (1): 23-41, 1997

Yamamoto S, Takahashi Y, Hada T, Hagiya H, Suzuki H, Reddy GR, Ueda N, Arakawa T, Nakamura M, Matsuda S, Taketani y, Yoshimoto T, Azekawa T, Morita Y, Ishimura K, Arase S, Glasgow WC, Brash AR, Anton M and Kuhn H.: Mammalian arachidonate 12-lipoxygenases. *Adv. Exp. Med. Biol.* 400A.: 127-131, 1997

Yoshida A, Takata K, Kasahara T, Aoyagi T, Saito S and Hirano H.: Immunohistochemical localization of Na(+)-dependent glucose transporter in the rat digestive tract. *Histochem. J.* 27.: 420-426, 1995

Yoshimoto T, Yamamoto Y, Arakawa T, Suzuki H, Yamamoto S, Yokoyama C, Tanabe T and Toh H.: Molecular cloning and expression of human arachidonate 12-lipoxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172 (3):. 1230-1235, 1990

Young LH, Russell RR, Yin R, Caplan MJ, Ren J, Bergeron R, Shulman GI and Sinusas AJ.: Regulation of myocardial glucose uptake and transport during ischemia and energetic stress. *Am. J. Cardiol.* 83.: 25H-30H, 1999

Yu B, Schroeder A and Nagy LE.: Ethanol stimulates glucose uptake and translocation of GLUT-4 in H9c2 myotubes via a Ca²⁺-dependent mechanism. *Am. J. Physiol.* 279.: E1358-E1365, 2000

Yu B, Poirier LA and Nagy LE.: Mobilization of GLUT-4 from intracellular vesicles by insulin and K⁺ depolarization in cultured H9c2 myotubes. *Am. J. Physiol.* 277.: E259-E267, 1999

Yu K, Bayona W, Kallen CB, Harding HP, Ravera CP, McMahon G, Brown M and Lazar MA.: Differential Activation of Peroxisome Proliferator-activated Receptors by Eicosanoids. *J. Biol. Chem.* 270 (41): 23975-23983, 1995

Zerial M and Stenmark H.: Rab GTPases in vesicular transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5: 613-620, 1993

Ziel FH, Venkatesan N and Davidson MB.: Glucose transport is rate limiting for skeletal muscle glucose metabolism in normal STZ-induced diabetic rats. *Diabetes* 37.: 885-890, 1988

Zierler K.: Whole body glucose metabolism. *Am. J. Physiol.* 276.: E409-E426, 1999

Zorzano A, Sevilla L, Tomas E, Camps M, Guma A and Palacin M.: Trafficking pathway of GLUT4 glucose transporters in muscle (Review). *Int. J. Mol. Med.* 2.: 263-271, 1998

Zorzano A, Sevilla L, Camps M, Becker C, Meyer J, Kammermeier H, Munoz P, Guma A, Testar X, Palacin M, Blasi J and Fischer Y.: Regulation of Glucose Transport and Glucose Transporters Expression and Trafficking in the Heart: Studies in Cardiac Myocytes. *Am. J. Cardiol.* 80 (3A): 65A-76A, 1997

VII. Anhang

7.1 Verwendete Abkürzungen

AA	Arachidonsäure
Akt	Proteinkinase B
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5' -Triphosphat
BCA	Bicinchoninat
BSA	Rinderserumalbumin
COX	Cyclooxygenase
Cy3	Indocarbocyanin
DMEM-Medium	Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTE	Dithioerythritol
DTT	Dithiothreitol
ECL	Verstärkte Chemilumineszenz
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	verstärkt grün-fluoreszierendes Protein
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N, N, N' , N' -tetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
F-Actin	Filamentöses Actin
FCS	Fötales Kälberserum (auch Rinderserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G-Actin	Globuläres Actin
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDI	GDP Dissoziationsinhibitor
GEF	Guaninnukleotid Austauschfaktor
GLUT	Glucosetransporter
GTP	Guanosin-5' -triphosphat
GTPase	Guanosin-5' -triphosphatase
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-N-2-ethansulfonsäure
HETE	Hydroxyeicosatetraenoic acid
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunopräzipitation
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
IR	Insulinrezeptor
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LO	Lipoxygenase
MOPS	3-(N-Morpholin)propansulfonsäure
NDGA	Nordihydroguaiaretic Acid
NEAA	Nichtessentielle Aminosäuren
NSF	N-Ethylmaleimid-Sensitives Fusionsprotein
OD	Optische Dichte
Sulfo-NHS-LC-Biotin	Sulfosuccinimidyl 6-(biotinamido) hexanoat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDK	Phospholipidabhängige Kinase

PH-Domäne	Pleckstrin homologe Domäne
PI	Phosphatidylinositol
PKB	Proteinkinase B (= Akt)
PKC	Proteinkinase C
PLA2	Phospholipase A2
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTB-Domäne	Phosphotyrosinbindende Domäne
PVDF	Polyvinylidendifluorid
pY	Phosphotyrosin
RIPA	Radioimmunopräzipitationsassay
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH2-Domäne	<i>Src</i> -homologe Domäne
SNAP	NSF-attached protein
SNARE	SNAP-Rezeptor
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TEMED	N, N, N', N' -Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
Triton X-100	t-Octylphenoxypolyethoxyethanol
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schema: Insulinsignaltransduktion und Glucoseaufnahme	4
Abb. 2: Insulinsignaltransduktion und Glucoseaufnahme: Zentrale Ziele	11
Abb. 3: Charakterisierung der Insulinwirkung auf die Glucoseaufnahme kardialer H9c2-Myoblasten mit stabiler GLUT4-Expression	35
Abb. 4: Charakterisierung der Glucosetransporterexpression in kardialen Muskelzellen der Ratte	36
Abb. 5: Identifizierung des Vektors pCMV und Darstellung seines Reinheitsgrades	38
Abb. 6: Charakterisierung der Transfektionseffizienz an H9K6-Myoblasten	40
Abb. 7: Nachweis der Überexpression von Rab-GTPasen in H9K6-Myoblasten	42
Abb. 8: Einfluß von Rab4A auf die basale und insulinstimulierte Glucoseaufnahme in H9K6-Myoblasten	43
Abb. 9: Einfluß von Rab4A auf die insulininduzierte GLUT4-Umverteilung in H9K6-Myoblasten	45
Abb. 10: Einfluß von Cytochalasin D auf die Organisation des F-Actinnetzwerkes in Kardiomyozyten	48
Abb. 11: Einfluß von Cytochalasin D auf die basale und insulinstimulierte Glucoseaufnahme in Kardiomyozyten	49

Abb. 12: Immunfluoreszenzdetektion von F-Actin
und 12-LO in Kardiomyozyten _____ 51

Abb. 13: Charakterisierung der Inhibition
der kardialen 12-LO-Isoform _____ 52

Abb. 14: Einfluß der LO-Inhibitoren auf die Organisation
des F-Actinnetzwerkes in Kardiomyozyten _____ 54

Abb. 15: Einfluß von NDGA auf die basale und insulinstimulierte
Glucoseaufnahme in Kardiomyozyten _____ 56

Abb. 16: Einfluß von Esculetin auf die basale und insulinstimulierte
Glucoseaufnahme in Kardiomyozyten _____ 57

Abb. 17: Einfluß der 12-LO-Hemmung auf die insulinabhängige
Tyrosinphosphorylierung von IRS-1 und IRS-2 in Kardiomyozyten _____ 58

Abb. 18: Einfluß der 12-LO-Hemmung auf nachgeschaltete Elemente
der Insulinsignalkaskade in Kardiomyozyten _____ 60

Abb. 19: Einfluß von Esculetin auf die insulinstimulierte
GLUT4-Umverteilung in Kardiomyozyten _____ 62

Abb. 20: Schematische Darstellung der funktionellen
Regulation der GLUT4-Exozytose _____ 75

Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle zuerst meinen Eltern danken, die mich während dieser Zeit immer sehr geduldig unterstützt und ermutigt haben.

Die vorliegende Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 351 C2 und des HSP III unterstützt.

Mein besonderer Dank geht auch an Herrn Prof. Dr. Jürgen Eckel, in dessen Arbeitsgruppe ich diese Arbeit erstellen konnte. Er brachte dieser Arbeit stets höchstes Interesse entgegen, und nicht zuletzt viele gemeinsame Diskussionen ermöglichten ein erfolgreiches Fortschreiten der Dissertation. Desweiteren brachte die durch ihn ermöglichte Mitwirkung an Kongressen und Veröffentlichungen immer aufs neue entscheidende Anregungen für die wissenschaftliche Arbeit.

Meinen Kollegen im Labor möchte ich für die besonders in den letzten Jahren angenehme Arbeitsatmosphäre danken, für welche das Wort Teamarbeit wirklich zutrifft.

I would also like to thank Prof. Dr. Shlomo Sasson from the Hadassah University in Jerusalem for the refreshing scientific and friendly cooperations we had during this working period. He visited Düsseldorf most often to continue our contact.

Außerdem möchte ich Dr. Marcus Schmitt einerseits für die fachliche Unterstützung bei der Erstellung der konfokalen Bilddaten, aber auch besonders für die freundschaftliche Atmosphäre bei unserer Zusammenarbeit danken.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Frank Wunderlich für die Übernahme des Korreferates und sein fachliches Interesse an dieser Arbeit.