

**Molekulare Analyse der Signaltransduktion
durch Humaninsulin, HMR1153, HMR1964
und AspB10-Insulin in Muskelzellen**

Inaugural – Dissertation

zur

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

vorgelegt von

Irini Rakatzi

aus Athen

2001

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

Referent: Prof. Dr. Jürgen Eckel

Korreferent: Prof. Dr. Frank Wunderlich

Tag der mündlichen Prüfung: 16.07.2001

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	19
2.1.	Zellkultur Methoden	19
2.1.1.	Kultivierung von H9c2- und K6-Zellen	19
2.1.2.	Kultivierung humaner Skelettmuskelzellen (SkMC)	20
2.2.	Untersuchung der initialen Signalauslösung mittels ¹²⁵ I-Insulin	21
2.2.1.	Insulin-Bindung	21
2.2.2.	Insulin-Internalisierung	22
2.2.3.	Insulin-Degradierung	23
2.3.	Immunopräzipitation	23
2.3.1.	Immunopräzipitation in K6-Myoblasten	23
2.3.2.	Immunopräzipitation in adulten Kardiomyozyten	25
2.3.3.	Immunopräzipitation und Inhibition des Insulin- bzw. IGF-I-Rezeptors in menschlichen Skelettmuskelzellen	26
2.4.	MAP-Kinase Aktivierung	26
2.5.	Messung der DNA-Synthese	27
2.6.	Phosphorylierung der intakten Myoblasten mit [³³ P]-Orthophosphat	28
2.7.	Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen	29
2.7.1.	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	29
2.7.2.	Zweidimensionale Gelelektrophorese	30
2.8.	Proteintransfer auf Membranen (Westernblot)	31
2.9.	Färbetechniken	33
2.9.1.	Ponceau S-Färbung	33
2.9.2.	Silberfärbung	33

2.10.	Immunodetektion	33
2.10.1.	Detektion mit verstärkter Chemilumineszenz (ECL)	33
2.10.2.	Phosphotyrosinnachweis	34
2.11.	Strippen der Blotmembran	34
2.12.	Proteinbestimmung	35
2.13.	Auswertung der Daten und Statistik	35
2.14.	Antiseren	36
2.15.	Zellsysteme	38
2.16.	Kulturmedien	38
2.17.	Kit-Systeme	39
2.18.	Radioisotope	39
2.19.	Chemikalien	40
3.	Ergebnisse	42
3.1.	Charakterisierung der K6-Myoblasten	42
3.1.1.	Bindungscharakteristik von Insulinanaloga	43
3.1.2.	Rezeptorvermittelte Internalisierung und intrazelluläre Degradierung von Insulinanaloga	45
3.1.3.	Autophosphorylierung des IGF-I Rezeptors	47
3.2.	Molekulare Untersuchungen zum Mechanismus der Signaltransduktion durch Insulinanaloga auf Postrezeptor-Ebene	50
3.2.1.	Untersuchung zur Aktivierung der MAP- Kinase Kaskade	50
3.2.2.	Untersuchungen zur Wirkung von Insulinanaloga auf das Adapterprotein Shc	54
3.2.3.1.	Analyse der Aktivierung des IRS-Signalweges durch Insulinanaloga in K6-Myoblasten	59

3.2.3.2.	Untersuchung der Effekte von Insulinanaloga auf die Aktivierung der IRS-Signalkaskade in adulten Kardiomyozyten der Ratte	63
3.3.	Untersuchung zur molekularen Abgrenzung der Wirkung von Insulinanaloga über den Insulin- bzw. IGF-I-Rezeptor in humanen Skelettmuskellzellen	67
3.3.1.	Einfluß von Insulinanaloga auf die Tyrosinphosphorylierung der IRS-1/2 Proteine in menschlichen Skelettmuskelzellen	68
3.3.2.	Hemmung der Tyrosinphosphorylierung der IRS-1/2 Proteine durch die Blockade des IGF-I- bzw. Insulinrezeptors in menschlichen Skelettmuskelzellen	71
3.4.	Wirkung der Insulinanaloga auf die DNA-Synthese	78
3.5.	Wirkung der Insulinanaloga auf die Proteinphosphorylierung	80
4.	Diskussion	84
4.1.	Zentrale Bedeutung der Insulinanaloga für die Insulintherapie beim Diabetes mellitus	84
4.2.	Regulation der durch Humaninsulin bzw. Insulinanaloga induzierten initialen Signalauslösung	88
4.2.1.	Initiale Rezeptorinteraktion: Bindung, Internalisierung, Degradierung	88
4.2.2.	Induktion der IGF-I Rezeptor Autophosphorylierung durch Humaninsulin bzw. Insulinanaloga	94
4.3.	Weiterleitung der rezeptorvermittelten Wirkung von Humaninsulin bzw. Insulinanaloga	96
4.3.1.	Aktivierung der Shc/MAPK-Kaskade und DNA-Synthese	96
4.3.2.	Aktivierung der IRS-Signalkaskade	103
4.4.	Funktionelle Bedeutung der Signalspezifität des Insulin- und IGF-I-Rezeptors im menschlichen Myoblastensystem	113

5.	Zusammenfassung	120
6.	Literatur	124
7.	Abkürzungsverzeichnis	141
8.	Abbildungsverzeichnis	143

1. Einleitung

Unter der Bezeichnung Diabetes mellitus werden Stoffwechseleränderungen unterschiedlicher Ursachen zusammengefasst. Sie sind durch eine dauerhafte Erhöhung der Blutzuckerkonzentration (Hyperglykämie) oder durch das Unvermögen des Organismus gekennzeichnet, zugeführte Kohlenhydrate zu verwerten (Glukosetoleranzstörung).

Der Diabetes mellitus ist eine komplexe Stoffwechselkrankheit, die bereits im zweiten Jahrhundert nach Christus durch Aretaios erkannt und scharfsichtig von ihm als ein „schmelzen von Fleisch und Gliedern zu Harn“ charakterisiert wurde. Aretaios beschrieb die typischen Symptome der stark vermehrten Flüssigkeitsausscheidung und des Gewichtsverlusts beim unbehandelten Diabetes mellitus. Im 17. Jahrhundert diagnostizierte Thomas Willis erstmalig diese bis dahin so rätselhafte Krankheit durch die Beschreibung des „honigsüßen“ Uringeschmacks. Der Begriff Diabetes mellitus stammt aus dem Griechischen (diabetes=fließend) und dem Lateinischen (mellitus=süß wie Honig) und bedeutet sinngemäß übersetzt „vermehrtes Ausscheiden von honigsüßem Urin“.

Der Diabetes mellitus, volkstümlich als Zuckerkrankheit bezeichnet, ist heutzutage die häufigste und zugleich bedeutsamste Stoffwechselstörung, deren Vorkommen in den letzten Jahrzehnten stark zugenommen hat. Allein in Deutschland sind etwa 5% der Bevölkerung betroffen und die Erkrankungstendenz ist weiterhin steigend (Ratzmann, 1991). Alarmierend hoch ist darüber hinaus die Dunkelziffer von Diabetikern, die bisher nicht diagnostiziert und daher auch nicht einer Behandlung zugeführt wurden. Schwerwiegende Folgen für die Gesellschaft ergeben sich aus der Häufigkeit dieser Erkrankung, ihren Spätkomplikationen und der damit verbundenen verkürzten Lebenserwartung. Selbst bei optimaler Therapie sind akute

Komplikationen nicht gänzlich auszuschließen, Folgeschäden des Diabetes machen zusätzlich langwierige Behandlungsmaßnahmen erforderlich. Dem Patienten wird ein hohes Maß an Selbstdisziplin und Eigenverantwortung durch die Therapie und die meistens erforderliche Umstellung der Lebensgewohnheiten abverlangt. All dies führt zu einer Einschränkung der Lebensqualität bei Diabetikern und ihren Angehörigen.

Charakteristisch für den unbehandelten Diabetes mellitus ist ein abnormer Glukosestoffwechsel, der durch eine Reihe von unterschiedlichen Störungen ausgelöst werden kann. Ursächlich liegt der Hyperglykämie stets eine mangelnde Insulinwirkung, entweder durch Insulindefizit als Folge einer nicht ausreichenden Sekretion des Hormons und/oder durch eine Verminderung der Wirksamkeit des verfügbaren Insulins zugrunde.

Ein Meilenstein im Verständnis der Physiologie und Pathophysiologie der Glukosehomöostase aber auch in der Diabetestherapie war die Entdeckung des Insulins im Jahre 1921 von Banting und Best (Bliss, 1982). Insulin ist ein kleines globuläres Protein mit einem Molekulargewicht von 5.800 Da, das aus 51 Aminosäuren besteht. Das Hormon setzt sich aus einer A- und einer B-Kette zusammen, die durch Disulfidbrücken verbunden sind. Insulin wird als inaktive Vorstufe, dem sogenannten Proinsulin bereitgestellt und entsteht mittels proteolytischer Abspaltung des „Connecting peptide“, des C-Peptids, durch die Proinsulin-Konvertasen (PC2, PC3/PC1). Das native Insulin wird in Gegenwart von Zink in Form von hexameren Kristallen zusammen mit dem C-Peptid und geringen Mengen an Proinsulin und anderen intermediären Spaltprodukten in den reifen sekretorischen Granula gespeichert (Chan et al., 1976; Lomedico et al., 1977; Docherty & Steiner, 1997).

Insulin wird in den Beta-Zellen der Langerhansschen Inseln produziert, welche als diskrete Cluster endokriner Zellen sich über das gesamte Pankreas

(Bauchspeicheldrüse) verteilen. Die Insulinsekretion wird primär über die Glukosekonzentration reguliert und erfolgt als Antwort auf einen erhöhten Blutzuckerspiegel, wobei die genauen molekularen Mechanismen noch nicht vollständig aufgeklärt sind. Neben der entscheidenden Rolle der Glukosekonzentration gibt es neurale und humorale Modulatoren der Insulinfreisetzung, z.B. die gastrointestinalen Hormone Cholezystokinin, Sekretin, sowie die Aminosäure Leucin (Cook & Taborsky, 1977).

Insulin nimmt eine zentrale Rolle in der Regulation der zellulären Homöostase höherer Organismen ein, wobei seine physiologischen Einwirkungen auf die Zelle pleiotrop sind. Eine der wichtigsten biologischen Wirkungen des Insulins ist die rasche Beschleunigung der Glukoseaufnahme in die Muskel- und Fettzellen durch eine selektive Permeabilitätserhöhung der Zellmembranen für Glukose. Weiterhin fördert Insulin die Glykogensynthese im Muskel, im Fettgewebe sowie in der Leber, hemmt gleichzeitig die hepatische Glukoneogenese und zählt daher insgesamt zu den wichtigsten Regulatoren des Glukosemetabolismus (Klarlund et al., 1997). Eine weitere zentrale Funktion des Peptidhormons Insulin besteht in der Regulation von Zellwachstum und Proliferation durch die Aktivierung der Transkription von Genen, die für Kontrolle und Ablauf des Zellzyklus von großer Bedeutung sind (Straus, 1989).

Insulin entfaltet seine Wirkung über die Bindung an spezifische Rezeptoren auf der Plasmamembran der Zielzellen (Freychet et al., 1971; Cuatrecasas, 1971). Eine zentrale Funktion bei der Vermittlung der biologischen Effekte dieses Proteinormons wird dem Insulinrezeptor und dem strukturell homologen IGF-I Rezeptor (insulin-like growth factor-I receptor) zugeschrieben. Beide Rezeptoren, die nahezu in allen Geweben, jedoch mit unterschiedlicher Häufigkeit vorkommen, gehören zur Familie der Rezeptortyrosinkinase mit intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität und koppeln über

eine ligandvermittelte Aktivierung das extrazelluläre Signal an gemeinsame intrazelluläre Signalkaskaden (LeRoith et al., 1995; White, 1997). Sowohl der Insulin- als auch der IGF-I-Rezeptor sind heterotetramere Glykoproteine, die aus zwei extrazellulären α -Ketten und zwei membrandurchspannenden β -Untereinheiten, welche durch Disulfidbrücken kovalent miteinander verbunden sind, bestehen. Die Untereinheiten jedes Rezeptors stammen aus jeweils einem einzigen Gen und entstehen durch proteolytische Spaltung der Prorezeptoren, die eine 50%ige Sequenzhomologie aufweisen (Ullrich et al., 1985; Ullrich et al., 1986). Die native $(\alpha/\beta)_2$ Struktur ist essentiell für die ligandinduzierte Aktivierung der Rezeptoren, die nach einem allosteren Mechanismus verläuft (Treadway et al., 1991; Frattali et al., 1992).

Durch die Hormonbindung an die α -Untereinheit wird über eine Konformationsänderung des Rezeptors die Autophosphorylierung bestimmter Tyrosinreste in verschiedenen Regionen der β -Ketten induziert, ein Prozeß, der mit der Aktivierung der intrazellulären Tyrosinkinase verbunden ist. (White, 1997; Holman & Kasuga, 1997). Mutationen im Bereich der potentiellen Phosphorylierungsstellen sind mit Defekten der Insulinwirkung assoziiert. Während die C-terminale Autophosphorylierung des Rezeptors für die Insulin-Sensitivität der Zielzelle von Bedeutung zu sein scheint, ist für die intrazelluläre Weiterleitung und Amplifizierung des Insulinsignals die Tyrosinphosphorylierung cytosolischer Substratproteine wichtig.

Es wurden bisher mehrere endogene Substrate der Insulin- und IGF-I-Rezeptortyrosinkinasen in insulinsensitivem Gewebe wie Muskel, Fettgewebe und Leber identifiziert, über die das Insulinsignal an verschiedene Signalkaskaden gekoppelt wird, die sowohl den Stoffwechsel als auch die Genregulation und Expression betreffen können.

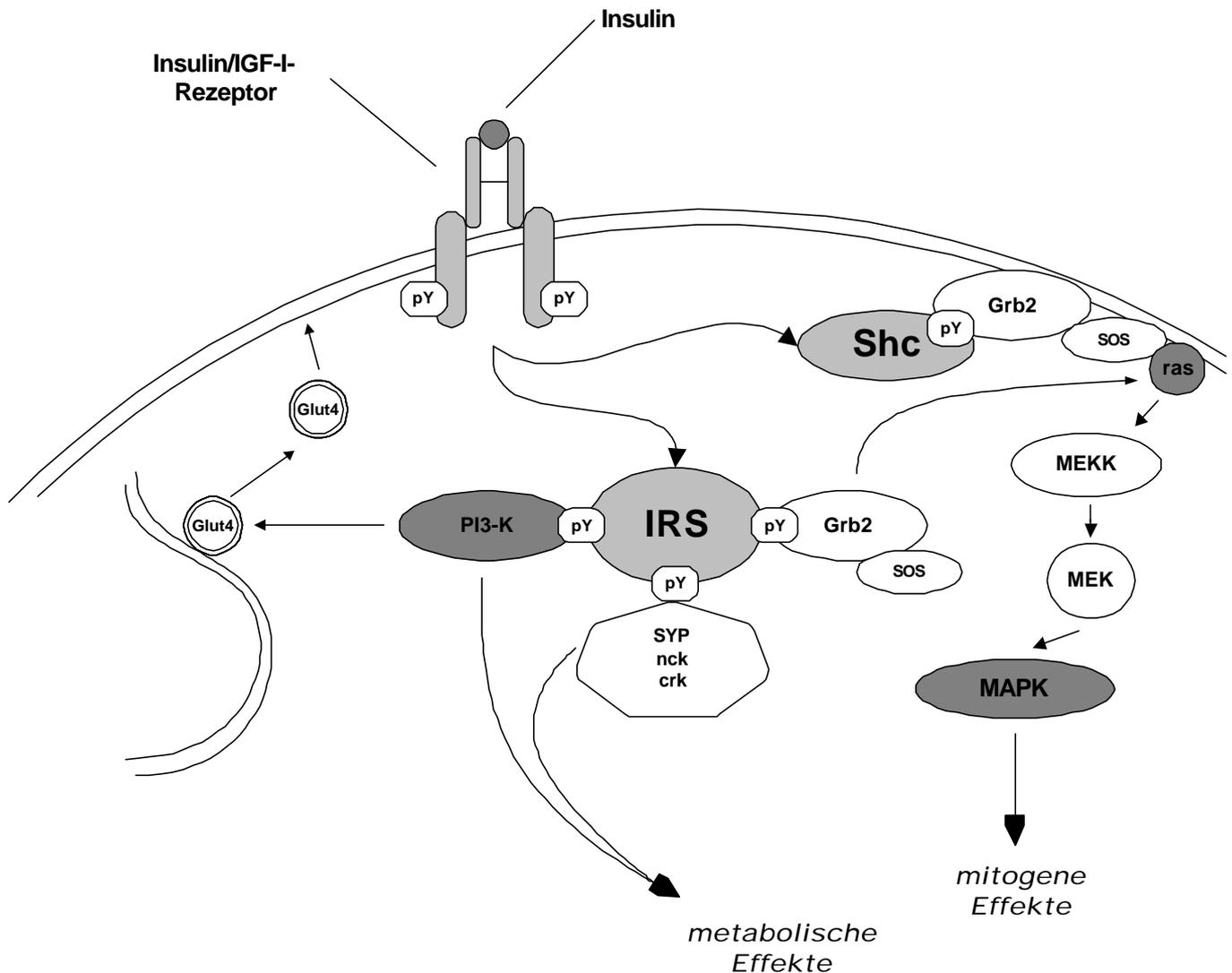


Abb.1.: Intrazelluläre Mechanismen der Insulinwirkung (in Anlehnung an M.F.White, 1997).

Die Insulinrezeptorsubstrate IRS-1 und IRS-2 sind die bislang am besten strukturell und funktionell charakterisierten Vertreter dieser Gruppe (Übersichtsartikel: Myers & White, 1996; Yenush & White, 1997). Diese Proteine verfügen über verschiedene konservierte Regionen. In ihrem aminoterminalen Bereich ist eine sogenannte Pleckstrin-homologe Domäne (PH-Domäne) und eine Phosphotyrosin-Bindedomäne (PTB-Domäne) lokalisiert, welche über spezifische Protein-Protein Wechselwirkungen die Interaktion mit den aktivierten Rezeptoren und die dadurch vermittelte

Tyrosinphosphorylierung ermöglichen. Im carboxyterminalen Bereich enthalten die IRS Proteine 21 potentielle Tyrosinphosphorylierungsmotive in YMXM- oder YXXM-Sequenz, die an src-Homologie-2 Domänen (SH2) mit hoher Affinität binden und dadurch eine Kopplung zu anderen zellulären, an der Signalkaskade beteiligten Effektormolekülen verschaffen. Von diesen Motiven konnten 8 als Substrate der Insulinrezeptorkinase identifiziert werden. Mutationen der IRS Proteine verursachen in der Regel Defekte in der Insulinsignalübertragung, die aber nur selten Ursache für die Entwicklung eines Diabetes sind.

Die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3-Kinase) ist ein intrazellulärer Signalmediator, der den IRS Proteinen in der Insulinkaskade nachgeschaltet ist und dem eine zentrale Rolle bei der Weiterleitung des Insulinsignals zukommt, wobei hier die Regulation der Translokation der Glukosetransporterisofom GLUT4 im Vordergrund steht (siehe Abb. 1). Die PI3-Kinase ist ein heterodimeres Enzym, das aus einer katalytischen und einer regulatorischen Untereinheit besteht. Letztere enthält zwei SH2-Domänen und eine SH3-Domäne, die als Bindemodule für Phosphotyrosinmotive fungieren und so die Assoziation mit weiteren Signalträgern ermöglichen (Übersichtsartikel: Shepherd et al., 1998).

Neben der Gruppe der IRS Proteine ist das Adaptermolekül Shc (src-homologes Kollagen Protein) für die Insulinsignalweiterleitung von zentraler Bedeutung. Dieses Protein verfügt ebenfalls über eine PTB- und eine SH2-Domäne, die seine Interaktion mit dem Rezeptor steuern und die rezeptorvermittelte Tyrosinphosphorylierung gewährleisten (Pelicci et al., 1992; Kovacina & Roth, 1993). Mehrere Studien belegen, daß das Shc Protein über verschiedene kaskadenartige Protein-Protein Wechselwirkungen, die Aktivierung und Membranassoziation des Grb2/Sos- (Growth factor receptor binding protein 2 / Son of sevenless)-Komplexes vermittelt (siehe Abb. 1), wodurch eine Kopplung zwischen der aktivierten Rezeptortyrosinkinase und

den Ras (rat sarcoma) Proteinen hergestellt wird (Skolnik et al., 1993). Die Mitglieder der Ras-Superfamilie sind regulatorische GTPasen und stellen zentrale Schaltstationen für Wachstums- und Differenzierungsvorgänge dar. Die Identifizierung mehrerer Effektormoleküle, die den Ras Proteinen nachgeschaltet sind, unterstreicht die hohe Komplexität der Ras-Signalübertragung (Reuther & Der, 2000). Ein Hauptweg führt über die aktivierte Serin /Threonin-spezifische Raf-Kinase in die Proteinkinase-Kaskade des MAP-Kinase Wegs, der für die Mitogenese und Zellzyklusprogression von primärer Bedeutung ist. Zentrale Komponenten der MAP-Kinase Kaskade sind cytoplasmatische Ser/Thr-spezifische Proteinkinasen, die in Säugetieren aufgrund ihrer Regulierbarkeit durch extrazelluläre, häufig mitogen wirkende Liganden als Mitogen aktivierte Proteinkinasen (MAPK) oder extrazellulär regulierte Kinasen (ERK) bezeichnet werden. Die MAPK/ERK-Proteine enthalten eine TXY-Sequenz, deren Phosphorylierung durch die vorgeschalteten MAPK-Kinasen essentiell für die Weiterleitung des Signals ist. Es sind bisher verschiedene MAPK-Subtypen mit unterschiedlicher Substratspezifität identifiziert worden, so daß von hier aus eine Verzweigung des Signalweges erfolgt. Eine zentrale Funktion der MAPK-Signalübertragung besteht in der Aktivierung der Genexpression, die über die Phosphorylierung verschiedener Transkriptionsfaktoren vermittelt wird (Übersichtsartikel: Blenis, 1993; Seger & Krebs, 1995; Cobb & Goldsmith, 1995).

Die intrazelluläre Insulinsignalkaskade (siehe Abb. 1) stellt ein verzweigtes und sehr komplexes Netzwerk dar, bedingt durch die vielfältigen Wechselwirkungen zwischen den in Abhängigkeit vom Insulin aktivierten Proteinen, deren molekulare Mechanismen noch unzureichend aufgeklärt sind und intensiver Erforschung in den nächsten Jahren bedürfen. Die pleiotropen Insulinwirkungen auf unterschiedliche intrazelluläre Systeme wie Transportaktivität, Enzymaktivität und Genexpression über

verschiedene Mediatoren macht die komplexe Rolle dieses Hormons für die Entstehung des Diabetes mellitus deutlich.

Der pathogenetische Faktor beim Diabetes mellitus ist die Hyperglykämie, ausgelöst durch ein abnormes Insulinwirkungsprofil. Pathophysiologisch wird grundsätzlich zwischen zwei verschiedenen Formen des Diabetes mellitus unterschieden, dem Insulin-abhängigen Typ 1 (IDDM – insulin dependent diabetes mellitus) und dem nicht Insulin-abhängigen Typ 2 (NIDDM, non insulin dependent diabetes mellitus).

Der Typ 1 Diabetes ist auf eine Destruktion der Beta-Zellen und einem damit verbundenen Insulinmangel zurückzuführen. Diese Form von Diabetes gilt heute als eine Autoimmunerkrankung der Bauchspeicheldrüse. Auf der Grundlage einer genetischen Prädisposition in Verbindung mit umweltbezogenen Auslösefaktoren (z.B. virale Infektionen) beginnt eine Autoimmunreaktion gegen verschiedene Autoantigene der Inselzellen. Der Prozeß schreitet langsam voran und führt über die zelluläre Immunität zur Autodestruktion der Inselzellen. Erst wenn 80% der Beta-Zellen zerstört sind, wird der Diabetes mellitus klinisch manifestiert und die Erkrankung tritt mit ihren typischen Symptomen wie Hyperglykämie, Polyurie, Gewichtsverlust und Abgeschlagenheit in Erscheinung. Nach 5-10jähriger Erkrankung treten Spätkomplikationen mit erheblicher Morbidität und Mortalität auf. Bisher ist ungeklärt, welche molekularen Mechanismen dafür verantwortlich sind. Der Therapieansatz bei Typ 1 Diabetes mellitus liegt in einer Insulinbehandlung, bei der Insulin mit weitmöglicher Nachahmung des natürlichen Sekretionsmusters exogen zugeführt wird (Lernmark, 1995).

Der Typ 2 Diabetes ist durch eine verminderte Insulinwirkung im Sinne einer Insulinresistenz der Zielorgane gekennzeichnet. Der zugrunde liegende Defekt bei dieser Erkrankung beinhaltet eine Insulinunempfindlichkeit der Zielgewebe, also Muskel-, Fettgewebe und Leber (periphere Insulinresistenz), sowie eine verminderte

Sensitivität der β -Zellen gegenüber einer Hyperglykämie (Martin et al., 1992; Olefsky & Nolan, 1995; Haffner et al., 1996).

Die Ursache des Typ 2 Diabetes mellitus wird in einer angeborenen und erworbenen Insulinresistenz gesehen, ist aber im allgemeinen wegen ihrer polygenen Natur schwer zu definieren. Neben einer genetischen Prädisposition (vererbter Anlage) trägt eine Reihe von sekundären umweltbedingten Faktoren zur Insulinresistenz bei (Kahn, 1995). Hierzu zählen Adipositas, metabolische Faktoren (u.a. Hyperglykämie), Alter und Mangel an körperlicher Aktivität. Durch mehrere Untersuchungen konnte eine Reihe von Genen identifiziert werden, die in der Pathogenese des Typ 2 Diabetes beteiligt sind. Nachgewiesene Mutationen solcher Kandidatengene auf der Ebene des Insulinrezeptors und der Signalkopplungsproteine (Polymorphismus des IRS1 Gens im Kodon 972 bzw. des IRS2 Gens im Kodon 1057) erklären nur einen kleinen Teil der Resistenz-Syndrome und ihre klinische Relevanz ist unklar (Almind et al. 1993; Almind et al., 1999).

Mehrere Forschungsgruppen konnten eine verminderte Tyrosinkinaseaktivität des Insulinrezeptors bei Patienten mit Typ 2 Diabetes zeigen, sowie eine negative Korrelation zwischen Glukosespiegel und der Aktivierung der Tyrosinkinase nachweisen (Maegawa et al. 1991; Nolan et al. 1994).

Adipositas ist ein weiterer entscheidender Faktor in der Genese des Typ 2 Diabetes. Etwa 80 % der Typ 2 Diabetiker sind fettleibig, und mehrere klinische Studien haben ein erhöhtes Risiko bei Übergewicht an einem manifesten Typ 2 Diabetes zu erkranken, nachgewiesen (Colditz et al., 1990; Edelstein et al., 1997).

Im Gegensatz zum Typ 1 bestehen im Frühstadium des Typ 2 Diabetes keine Symptome und Beschwerden. Aus diesem Grund besteht ein Typ 2 Diabetes oft für viele Jahre bevor es zur häufig zufälligen Erstdiagnose kommt. Aufgrund der unterschiedlichen pathophysiologischen Bedingungen unterscheiden sich die

Therapieprinzipien von denen des Insulin-abhängigen Typ 1 Diabetes. Im Vordergrund stehen Gewichtsabnahme, diätetische Maßnahmen und eine verstärkte körperliche Aktivität. Eine weitere Stufe der Therapie besteht in der Korrektur der Stoffwechseleinstellung durch eine medikamentöse Blutzuckernormalisierung. Häufig eingesetzte orale Antidiabetika stimulieren die Beta-Zellreserve (Sulfonylharnstoff-Präparat) und vermindern Insulinresistenz (Biguanide) sowie intestinale Glukoseaufnahme durch Inhibitoren der intestinalen α -Glukosidase (Acarbose) (Coniff et al., 1995; Stumvoll et al., 1995; Aguilar-Bryan et al., 1995).

Im Verlauf der Typ 2 Diabetes Erkrankung kommt es in den meisten Fällen zu einer progressiven Erschöpfung der Beta-Zellfunktion und somit zu einem Sekundärversagen der oralen Antidiabetika. Schließlich liegt ein absoluter Insulinmangel und somit die Indikation zu einer Insulintherapie vor, bei der das fehlende Insulin exogen zugeführt wird. Eine Insulintherapie sollte erst in diesem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung, aufgrund der hohen Gefahr eines häufig auftretenden Hyperinsulinismus, eingeleitet werden. Unter physiologischen Bedingungen wird das Hormon nach der pankreatischen Insulinsekretion aus der Zirkulation infolge der Leberpassage (First-pass-Effekt) bereits größtenteils eliminiert, wohingegen das Fehlen dieses Effektes bei der systemischen Applikation im Rahmen einer Therapie zu unphysiologisch hohen Insulinspiegeln im Gefäßsystem und peripheren Geweben führt.

Die Einführung der Insulintherapie in die klinisch-praktische Medizin zu Anfang des Jahres 1922 stellt einen Meilenstein der modernen Medizin dar. Nach einer langen historischen Entwicklung wird sie heutzutage als sogenannte intensivierete Substitutionstherapie sowohl beim Typ 1 als auch beim Typ 2 Diabetes eingesetzt. Das Therapieziel besteht darin, die aufgrund der Beta-Zelldestruktion verminderte Sekretion des körpereigenen Insulins in annähernd physiologischer Form zu

substituieren. Dadurch kann eine optimale Stoffwechseleinstellung mit der Verminderung von Spät komplikationen und eine Verbesserung der Lebensqualität erreicht werden (The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, 1993; Klein, 1995).

Die Kinetik der Insulinsekretion zeichnet sich bei stoffwechselgesunden Personen durch eine weitgehend konstante basale Sekretion im Nüchternzustand und über Nacht (ca. 0,5-1U Insulin / h) und durch einen mahlzeitabhängigen kurzen Anstieg (ca. 1-2U Insulin / Brot Einheit (BE)) aus, wodurch die Blutgukosekonzentration im Bereich der Norm gehalten wird (Galloway & Chance, 1994).

Die Simulation einer normalen physiologischen Insulinsekretion wird im Rahmen einer intensivierten Insulintherapie durch die Substitution des basalen und prandialen Insulinbedarfs mit Hilfe mehrfacher täglicher Injektionen von Insulinpräparationen in das subkutane Fettgewebe erzielt (White & Campbell, 1996).

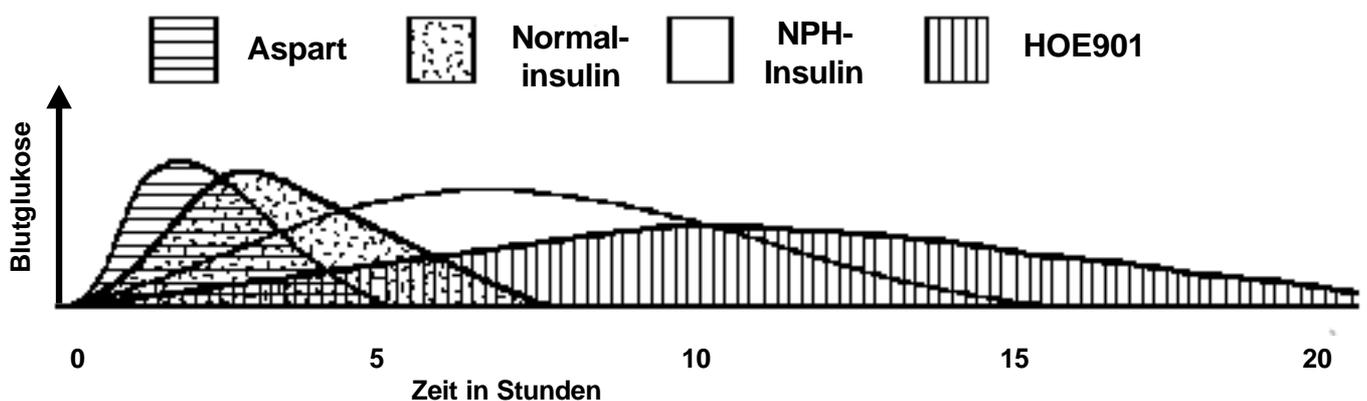


Abb.2.: Wirkungsprofil verschiedener Insulinpräparationen bzw. Insulinanaloge nach subkutaner Injektion (nach Heinemann et al., 1996, 1998).

So nahe diese Therapie den physiologischen Verhältnissen auch kommt, lässt sich dennoch eine optimale Nachahmung der normalen endogenen Insulinsekretion mit

den zur Zeit im Handel verfügbaren Präparaten nicht realisieren (Galloway, 1993; Galloway & Chance, 1994; Heinemann et al., 1996). Das Normalinsulin, das als kurzwirkendes Insulin für die Deckung des prandialen Insulinbedarfs bei der intensivierten Substitutionstherapie eingesetzt wird, weist einen langsameren Wirkungseintritt (ca. 15-30 min nach der Injektion) und eine längeranhaltende Wirkungsdauer (6-8 h) als die physiologische postprandiale Insulinsekretion auf (siehe Abb. 2).

NPH Insulin-Präparationen (Neutral-Protamin Hagedorn), die am häufigsten bei der intensivierten Therapie zur Deckung des basalen Insulinbedarfs verwendeten langwirkende Insuline (Verzögerungsinsuline), weisen eine für die basale Substitution relativ kurze Wirkungsdauer (ca. 17 h) und ein Wirkungsprofil, dessen Verlauf nicht flach und gleichmäßig ist, wie man es sich von einem idealen Insulinpräparat zur basalen Substitution wünschen würde, auf (siehe Abb. 2). Zusätzlich treten beim NPH-Insulin eine hohe Variabilität der Wirkung und immunogene Nebenwirkungen des Protamins als weitere negative Faktoren auf (Heinemann et al., 1996).

Zur Durchführung einer sicheren und effektiven Insulintherapie besteht also dringender Bedarf an neuen Insulin-Präparaten mit veränderten pharmakokinetischen und -dynamischen Eigenschaften, die zu einer besseren Nachahmung der physiologischen endogenen Insulinsekretion und Regulation der metabolischen Effekte dienen können. Als limitierender Faktor steht hier die Abhängigkeit des Wirkungsprofils vom zeitlichen Verlauf der Absorption von subkutan injiziertem Insulin im Vordergrund. Die Absorptionsrate von Insulin aus dem subkutanen Depot wird durch die verdünnungs- und damit zeitabhängige Dissoziation der Hexamere, dem stabilsten und vorherrschenden Assoziationsstatus in den kommerziellen Insulinpräparationen, bestimmt. Die Hexamere können

aufgrund ihrer Größe schlecht durch die Poren in der Kapillarwand permeieren und weisen deshalb drei bis vierfach niedrigere Resorptionsraten als Dimere bzw. Monomere auf (Hildebrandt et al., 1985; Mosekilde et al., 1989).

Die heutzutage durch gentechnologische Methoden wesentlich leichter zugänglichen Strukturvariationen haben unter anderem das Ziel, die derzeit noch üblichen Insulin-Präparate durch Zubereitungen mit einem vorteilhafteren Wirkungsprofil zu ersetzen. Durch Veränderung der Aminosäuresequenz des Insulinmoleküls mittels rekombinanter DNA-Technik, können neue modifizierte Insuline (Insulinanaloga) mit verbesserter Pharmakokinetik, die sich in einer gesteigerten bzw. erniedrigten Absorptionsrate äußert, synthetisiert werden (Galloway, 1993).

Modifikationen in der B-Kette des Insulinmoleküls, insbesondere Substitution von Aminosäuren mit geladenen Seitengruppen an den Assoziationsstellen, führen zu einer Abschwächung der intermolekularen Bindungskräfte und ermöglichen somit die Synthese einer Reihe von Insulinanaloga, die eine geringere Tendenz zur Selbstassoziation aufweisen und konsekutiv als Monomere bei den pharmakologischen Konzentrationen vorliegen. Diese Präparate werden von der Injektionsstelle 2-3 mal schneller absorbiert als Normalinsulin und können dadurch das normale prandiale Plasma-Insulinprofil besser nachahmen (Brange et al., 1999). Dies wurde auch klinisch beim AspB10-Insulin, eines der ersten gentechnologisch entwickelten Insulinanaloga, demonstriert (Heinemann et al., 1990). Das AspB10-Insulin wies anfänglich vielversprechende therapeutische Aspekte auf, jedoch wurde seine klinische Erprobung sofort abgebrochen, als durch Langzeit-Toxizitätsuntersuchungen mit diesem Analogon bei weiblichen Ratten eine dosisabhängige Entwicklung von Mammakarzinomen bzw. -adenomen festgestellt wurde (Jorgensen et al., 1992; Drejer et al., 1992).

Die kürzlich als Medikamente zugelassenen kurzwirksamen Analoga [LysB28, ProB29]-Insulin, Lispro, (Howey et al., 1994) und AspB28-Insulin, Aspart, (Heinemann et al., 1998) weisen einen rascheren Wirkungseintritt und eine kürzere Wirkungsdauer (siehe Abb. 2) bedingt durch eine schnellere Absorptionsrate auf. Die Ergebnisse einer Reihe von klinischen Studien bezüglich der Wirksamkeit dieser Analoga auf einer zufriedenstellenden Substitution des prandialen Insulinbedarfs ohne hohe Inzidenz von Hypoglykämien und einer daraus resultierenden Verbesserung der Stoffwechseleinstellung sind kontrovers (Übersichtsartikel: Bolli et al., 1999; Vajo & Duckworth, 2000) und solange der Stellenwert dieser schnellwirkenden Insuline in der Diabetestherapie nicht abschließend geklärt ist, bleibt der Bedarf an einem idealen kurzwirksamen Präparat für die Optimierung der postprandialen Kontrolle des peripheren Glukose-metabolismus bestehen.

Auf der anderen Seite existiert auch eine signifikante klinische Notwendigkeit für ein langwirksames Insulinanalogon zur Simulation der basalen Insulinsekretion, ohne den Zusatz von Retardanten, welche oft mit dem Auslösen allergischer Reaktionen verbunden sind (Galloway, 1993). Mehrere klinische Studien belegen zusätzlich, daß die zur Zeit im Handel verfügbaren Protamin-Zink-Insulinpräparationen eine sichere und effektive Therapie nicht gewährleisten können, da sie häufig bei hoher Dosierung entsprechend ihrer längeren Wirkungsdauer zu protrahierten Hypoglykämien und zu Hyperinsulinämie führen, welche ein Risikofaktor für Atherosklerose darstellt.

Durch Verschiebung des isoelektrischen Punktes des Insulinmoleküls in Richtung neutralem pH, bedingt durch Modifikationen der Aminosäuresequenz, können Insulinanaloga hergestellt werden, welche eine langsamere Absorption und eine entsprechend verlängerte Wirkung aufweisen (Roskamp & Park, 1999). Dies führte zu der Entwicklung von NovoSolBasal (Jorgensen et al., 1989) und Diarginylinsulin

(Zeuzem et al., 1990; Monti et al., 1992). Klinische Studien berichten, daß beide Analoga die an Verzögerungsinsuline gestellten Anforderungen erfüllen. Doch ihre potentielle klinische Anwendung wird durch eine beschränkte Bioverfügbarkeit stark limitiert.

Von den vielfältigen und langjährigen Bemühungen in diese Richtung konnte bisher nur [GlyA21, ArgB31, ArgB32]-Insulin (Glargin/HOE901) bis zur Markteinführung entwickelt werden. Bei diesem biosynthetischen Humaninsulinanalogon wurde durch Einfügung von 2 Arginin-Molekülen am Ende der B-Kette und dem Austausch der letzten Aminosäure am Ende der A-Kette, der isoelektrische Punkt von 5,4 zum neutralen pH Wert verschoben. Dadurch kommt es erst nach der Injektion bei dem physiologischen pH Wert im subkutanen Depot zu einem Ausfällen von schlecht löslichen Insulinkristallen, welche eine langsamere Absorptionsrate und entsprechend eine längere Wirkungsdauer des Analogons bewirken (Dreyer et al., 1994). Tierexperimentelle Untersuchungen berichten, daß dieses langwirksame Analogon, welches eine erhöhte Bioverfügbarkeit zeigt, ein gleichmäßigeres und 2fach längeres Wirkungsprofil (siehe Abb. 2) als NPH-Insulin aufweist. Die Ergebnisse der laufenden klinischen Erprobung bestätigten die Erwartung, daß HOE901 einen idealen Kandidaten für die Deckung des basalen Insulinbedarfs über 24h hinweg mit einer einmaligen täglichen Injektion darstellt (Übersichtsartikel: Vajo & Duckworth, 2000).

Zur Zeit laufen Bemühungen, langwirkende Insulinpräparationen herzustellen, die auf neuartigen Verzögerungsmechanismen beruhen. Die verlängerte Wirkung solcher Insulinanaloga basiert auf der Kopplung einer freien Fettsäure am Ende der B-Kette, welche nach Injektion des löslichen Insulins an die Bindungsstellen für freie Fettsäuren an Albuminmolekülen im Blut bindet und dadurch die Freisetzung des Insulins verzögert (Übersichtsartikel: Vajo & Duckworth, 2000).

Die Synthese gentechnologisch manipulierter Insulinanaloga eröffnet eine neue Perspektive der Insulintherapie und es ist zu erwarten, daß der Einsatz von kurz- und langwirksamen Insulinen zu einer deutlich verbesserten metabolischen Kontrolle sowohl bei Typ 1- als auch bei Typ 2-Diabetikern beiträgt. Die Verwendung modifizierter Insuline ist jedoch mit potentiellen Risiken verbunden. Strukturelle Veränderungen des Insulinmoleküls beeinflussen seine dreidimensionale Struktur und bedingen eine Modifikation des zellulären Wirkungsspektrums, wobei die mitogenen Effekte der Analoga besondere Beachtung erfordern.

Umfangreiche Studien belegen, daß die veränderten Wirkungsspektren von Insulinanaloga auf eine veränderte Interaktion und Signalauslösung sowohl am Insulinrezeptor als auch am strukturell homologen IGF-I Rezeptor zurückgeführt werden können, wobei der jeweilige Anteil der beiden Rezeptorsysteme variabel und gewebespezifisch ist (DeMeyts et al., 1993). Nach den Daten von Hansen et al. (1996) bedingt eine erhöhte Halbwertszeit des Ligand/Rezeptor-Komplexes eine verstärkte Signalauslösung am Insulinrezeptor, die zu einer erhöhten Phosphorylierung von Shc und einer gesteigerten mitogenen Aktivität führt. Neben dem Insulinrezeptor ist der IGF-I Rezeptor für die Vermittlung von Wachstum, Differenzierung und Auslösung mitogener Effekte von primärer Bedeutung. Hierbei ist zu betrachten, daß die mitogenen Effekte des Insulins über die schwache Wechselwirkung mit dem IGF-I Rezeptor, durch Hybridrezeptoren oder durch Interphosphorylierung des IGF-I Rezeptors durch die Insulinrezeptorkinase ebenfalls ausgelöst werden können (Beguinot et al., 1988; Bailyes et al., 1997). Neuere Literaturdaten belegen, daß das karzinogene Analogon AspB10-Insulin seine mitogenen Effekte und phänotypischen Veränderungen in menschlichen Brust-Epithelzellen im wesentlichen über den IGF-I Rezeptor vermittelt (Milazzo et al., 1997). Darüber hinaus wurde gezeigt, daß Modifikationen der B-Kette des

Insulinmoleküls primär die Bindungsaffinität zum IGF-I Rezeptor und in einem geringeren Ausmaß zum Insulinrezeptor verändern (Sliker et al., 1997). Der IGF-I Rezeptor vermittelt jedoch auch metabolische Effekte (Baudry et al., 2001) und es ist gegenwärtig unklar, durch welche molekularen Mechanismen mitogene und metabolische Effekte differentiell angesteuert werden können und welche Bedeutung in diesem Kontext den verschiedenen Insulinanaloga zukommt. Vor diesem Hintergrund sind Studien zur IGF-I Rezeptor Signaltransduktion modifizierter Insulinpeptide dringend erforderlich. Somit war Zielsetzung der vorliegenden Arbeit die detaillierte Charakterisierung der Signaltransmission durch die zwei neuen Analoga [LysB3, GluB29]-Insulin (HMR1964) und [LysB3, Ile B28]-Insulin (HMR1153) an intakten Myoblasten. Der Austausch der Aminosäure in der dritten Stelle der B-Kette gegen Lysin, sowie die Substitution von LysB29 gegen die negativ geladene Glutaminsäure bei HMR1964 bzw. der Ersatz von ProB28 durch die neutrale Aminosäure Isoleucin bei HMR1153 führte zur Synthese dieser neuen schnellwirksamen Insuline, deren Moleküle sich durch eine geringere Selbstassoziation und einer dadurch bedingten schnelleren Resorptionsrate von der Injektionsstelle auszeichnen. Diese modifizierten Insuline wurden von der Firma Aventis (Frankfurt a.M.) produziert und für die hier dargestellten Studien zur Verfügung gestellt. Die mitogene und metabolische Wirkung dieser Peptide und die hiermit verknüpften Signalwege sollten im direkten Vergleich zu Humaninsulin und dem supermitogenen AspB10-Insulin evaluiert werden. Die molekulare Analyse der differentiellen Signalweiterleitung durch diese neuen modifizierten Insuline war auf drei Stufen angelegt. Die Erfassung der initialen Signalauslösung am Rezeptor, die Untersuchung der abwärts gelegenen Signalträger der mitogenen und metabolischen Wirkung in Bezug auf ihre Aktivierung und letztlich die Bestimmung der Wirkung auf die DNA-Synthese sollten einen fundierten Einblick in die vom Insulin- bzw. IGF-I-

Rezeptor vermittelten Effekte der Analoga HMR1964 und HMR1153 verschaffen. Die Untersuchungen sollten an intakten Myoblasten durchgeführt werden. Der Vorteil des ausgewählten Zellsystems besteht darin, daß Zellen im Myoblastenstadium einen hohen Expressionsgrad an IGF-I Rezeptoren und nur eine geringe Menge an Insulinrezeptoren aufweisen und dadurch eine verhältnismäßig selektive Analyse des IGF-I Rezeptors ermöglichen.

2. Material und Methoden

2.1. Zellkultur Methoden

2.1.1. Kultivierung von H9c2- und K6-Zellen

Die H9c2 Zellen, adhärenente Herzmuskelzellen der Ratte im Myoblastenstadium, wurden in kryokonserviertem Zustand von der Firma American Type Culture Collection bezogen. Die K6-Zellen stammen von der H9c2 Zelllinie und wurden in unserer Arbeitsgruppe von Lämmerhirt (1995) mittels stabiler Transfektion des Glukosetransporters GLUT4 und Klonselektion hergestellt.

Die langfristige Lagerung von Zell-Aliquoten in DMSO-haltigem Einfriermedium erfolgte in flüssigem Stickstoff. Der Auftauvorgang bestand aus dem Erwärmen eines Aliquots in einem 37°C warmen Wasserbad und der darauf unmittelbaren Überführung der Zellsuspension in eine mit vorgewärmten Medium (DMEM-Medium von Gibco) gefüllte Kulturflasche (175 cm², Falcon). Nach einer Inkubation der Zellen bei 37°C und einer Atmosphäre von 5% CO₂ im Brutschrank (Heraeus, Hanau) für 24 h wurde das Kulturmedium erneuert, um die adhärenenten Zellen von DMSO-Resten zu befreien. Für die weitere Kultivierung der Zellen war ein Mediumwechsel alle 2-3 Tage erforderlich, wobei dem Wachstumsmedium für die K6-Zellen das Antibiotikum Geneticin zugesetzt wurde .

Die Subkultivierung der Zellen erfolgte in der späten logarithmischen Phase, ca. 6 Tage nach Aussat, nach Erreichen ausreichender Konfluenz, durch proteolytisches Ablösen und anschließendem Neuaussäen in Kulturflaschen. Hierzu wurden nach Entfernen des Mediums und Waschen der Zellen mit sterilem PBS 6 ml vorgewärmter Trypsin/EDTA-Lösung zugegeben und die Kultur unter optischer, mikroskopischer Kontrolle 3-5 min bis zur Zellablösung bei 37°C inkubiert. Nach anschließender Inhibierung von Trypsin durch Zusatz der doppelten Menge an Kulturmedium erfolgte das Überführen der zuvor sorgfältig resuspendierten

Zellsuspension in ein steriles Zentrifugenröhrchen und eine Zentrifugation der Zellen für 10 min mit 1500 rpm bei Raumtemperatur. Das Zellsediment wurde erneuert in Wachstumsmedium resuspendiert und die Zellzahl in einer Fuchs-Rosenthalkammer unter Zusatz von Trypanblau ermittelt. Es schloß sich eine erneute Zellaussaat in geeigneter Zellzahl an.

Hinsichtlich des Einfriervorgangs der Zellen, der ebenfalls in der späten logarithmischen Wachstumsphase stattgefunden hat, wurde analog verfahren. Hierbei erfolgte jedoch die Resuspension des Zellpellets in Einfriermedium mit einer Zelldichte von $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml. Folgend wurde in Kryo-Röhrchen aliquotiert und zunächst bei -70°C eingefroren, anschließend in flüssigem Stickstoff langfristig gelagert. Durch Verwendung eines speziellen Kryoeinfriergeräts der Firma Nalgene, das eine Temperaturabnahme von $1^\circ\text{C}/\text{min}$ gewährleistet, wurde ein schonender Ablauf des aufgrund von Kristallbildung in den Zellen, kritischen Einfriervorgangs ermöglicht.

2.1.2. Kultivierung humaner Skelettmuskelzellen (SkMC)

Die menschlichen Skelettmuskelzellen wurden in proliferierendem Zustand von der Firma Promo Cell geliefert. Sie stammen aus dem Musculus rectus abdominis eines männlichen, nicht diabetischen Patienten und wurden in der Form noch nicht ausdifferenzierter Muskellzellen, also im sogenannten Myoblastenstadium isoliert.

Die Kultivierung dieser adhärent wachsenden Zellen erfolgte durch Aussäen von Myoblasten mit einer Zelldichte von 4-5000 Zellen/cm² in Zellkulturflaschen und anschließender Inkubation bei 37°C unter Begasung von 5% CO₂ im Brutschrank. Das Kulturmedium (Skeletal Muscle Cell Growth Medium von Promo Cell), das u.a. FCS (5%), EGF, FGF und Insulin enthielt, wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Nach

etwa einer Woche in Kultur wurden die schon konfluenten Zellen einer Subkultivierung unterzogen.

Hierbei erfolgte nach vorherigem Waschen der Zellen mit sterilem PBS-Puffer die Ablösung von der Oberfläche der Zellkulturflasche durch Zugabe von $100 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ einer vorgewärmten Trypsin/EDTA-Lösung und Inkubation der Kultur bei 37°C für ca. 5-7 min unter gleichzeitiger optischer Kontrolle des Ablösevorgangs, um Zellschädigungen zu vermeiden. Nach Inhibierung von Trypsin durch Zugabe von $50 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ Trypsinneutralisierungslösung wurde die Zellsuspension in Zentrifugationsröhrchen überführt und die Zellen durch eine 4 minütige Zentrifugation bei 2500 rpm sedimentiert. Nach Resuspension des Zellpellets in Wachstums- oder Einfriermedium und der Bestimmung der Zellzahl wurde eine neue Aussat in geeigneter Zelldichte in Kulturflaschen bzw. das Einfrieren der Zellen in Kryo-Röhrchen vorgenommen.

Für sämtliche Experimente der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Aliquots aus nach der zweiten Passage eingefrorenen Zellen verwendet.

2.2. Untersuchung der initialen Signalauslösung mittels ^{125}I -Insulin

2.2.1. Insulin-Bindung

Für die Bindungsstudien wurden K6-Myoblasten in 6-Well-Platten mit einer Dichte von 2×10^5 Zellen/Well ausgesät und für 24 h in DMEM ergänzt mit 10% FCS, 1% nicht essentielle Aminosäuren, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin und 100 U/ml Penicillin (DMEM komplett) bei 37°C kultiviert. Die konfluenten Zellen wurden dann 2 mal mit vorgewärmtem, sterilem PBS gewaschen und anschließend für 1 h bei 37°C in serumfreien DMEM (ohne FCS), das mit 2% BSA ergänzt wurde, inkubiert. Nach gleichzeitiger Zugabe von 5×10^{-11} M des radioaktiv markierten Insulins, Tracerkonzentration 0,1 $\mu\text{Ci}/\text{Well}$ (Aventis) und des entsprechenden unmarkierten Peptids (10^{-8} M) erfolgte die Bindung in parallel durchgeführten Inkubationen für die

jeweiligen Hormone für 10 min bei 37°C. Nach Entfernen des Mediums und 2 maligem Waschen der markierten Zellen mit eiskaltem PBS erfolgte die Lyse in 0,1% SDS und die Bestimmung der Radioaktivität in einem γ -Counter.

Die Ermittlung der unspezifischen Bindung wurde in parallelen Ansätzen in der Anwesenheit von einem Überschuß der entsprechenden unmarkierten Insulinen (10^{-5} M) durchgeführt. Für jede Situation wurden jeweils dreifache Ansätze (Triplikate) vorgenommen und daraus die Mittelwerte errechnet. Nach Abzug der entsprechenden unspezifischen Bindungswerten wurde schließlich die spezifische Bindung der verschiedenen Insuline ermittelt.

2.2.2. Insulin-Internalisierung

Für die hier dargestellte Analyse wurden K6-Myoblasten in DMEM-komplett in 6- Wells für 24 h bei 37°C kultiviert (3×10^5 Zellen/Well). Nach einer 30 minütigen serumfreien Inkubation in DMEM, ergänzt mit 0,5% BSA, wurden die Zellen mit ^{125}I -Insulin (0,1 $\mu\text{Ci/Well}$) für 1 h bei 37°C markiert. Der Anteil der ungebundenen radioaktiven Liganden wurde durch Waschen der Zellen mit eiskaltem PBS (2x) entfernt. Daraufhin erfolgte ein 3 faches Waschen mit eiskaltem PBS ergänzt mit 0,1% BSA und einem pH Wert von 2,75 (Acid Wash), der die Abspaltung von noch an der Zelloberfläche gebundenem Insulin ermöglichte (Chow et al., 1998). Anschließend wurden die Zellen in 0,1 N NaOH + 1% SDS solubilisiert und die Radioaktivität, die ein Maß für die Internalisationsrate darstellt, im γ -Counter gemessen.

2.2.3. Insulin-Degradierung

Für die Abbauprobungen wurden K6-Myoblasten, wie unter 2.2.2. beschrieben, behandelt. Nach einer 1 stündigen Inkubation der Zellen mit den radioaktiv markierten Insulinen (0,1 $\mu\text{Ci}/\text{Well}$) bei 37°C wurde die intrazelluläre Degradierung der verschiedenen Peptide mittels TCA-Fällung bestimmt (Eckel & Reinauer, 1988). Dazu wurden nach der Lysis der Zellen 200 μl des Mediums in 500 μl 50 mM Tris/Cl-Puffer (pH 7,0) ergänzt mit 0,5% BSA vorgelegt und mit 500 μl einer eiskalten 25%igen TCA-Lösung versetzt. Während einer 15 minütigen Inkubation der so behandelten Proben bei 4°C wurden die intakten markierten Proteine präzipitiert und anschließend durch eine 5 minütige Zentrifugation bei 14000 rpm und 4°C von den TCA löslichen Abbauprodukten abgetrennt. Die Radioaktivität der erhaltenen Überstände und jeweiligen Pellets wurde in einem γ -Counter ermittelt und die daraus resultierende Degradierungsrate der verschiedenen Insuline berechnet.

2.3. Immunopräzipitation

2.3.1. Immunopräzipitation in K6-Myoblasten

K6-Myoblasten wurden in Petrischalen mit einer Zelldichte von 3×10^6 Zellen/Schale ausgesät und in DMEM Wachstumsmedium für 24 h bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Nach Entfernung des Mediums und 2 faches Waschen der Zellen mit vorgewärmtem, sterilem PBS, um FCS-Reste zu entfernen, erfolgte eine serumfreie Inkubation in DMEM-Medium ergänzt mit 0,5% BSA für 2 h bei 37°C, um den unspezifischen Bindungsanteil zu minimieren. Hierauf wurden die Zellen mit Humaninsulin bzw. den verschiedenen Analoga (Endkonzentration 5×10^{-7} M) für 10 min bei 37°C stimuliert. Die Stimulation wurde dann durch Absaugen des Mediums unmittelbar gestoppt und durch 2 faches Waschen mit eiskaltem PBS wurden Insulinreste entfernt. Nach Zugabe von 1 ml eiskaltem RIPA-Puffer wurden die

adhärenten Zellen durch Abkratzen mit einem Zellschaber (Falcon, Essen) von der Oberfläche der Kulturschalen abgelöst.

Durch die nachfolgende zweistündige Inkubation der Zellsuspension bei 4°C in einem Überkopfschüttler wurden die Zellen durch die im RIPA-Puffer enthaltenen Detergentien solubilisiert. Die anschließende Zentrifugation für 15 min bei 15.000 rpm und 4°C in einer Kühlzentrifuge (Eppendorf 5420, Hamburg) trennte die unlöslichen Zellbestandteile ab. Der die cytosolischen- und Membranproteine enthaltende Überstand wurde abgenommen, mit PBS auf eine Proteinkonzentration von 1 µg/µl eingestellt und mit den entsprechenden Antikörpern (5 µl anti IRS1/IRS2 bzw. 10 µl anti Shc) bei 4°C im Überkopfschüttler über Nacht inkubiert. Im Anschluß wurden diese Immunokomplexe mit 20 µl in PBS vorgewaschenem Protein A-Trisacryl bei den IRS-Proteinen bzw Protein G-Agarose Partikel beim Shc-Protein für 2 h bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert und auf diese Weise an die Trägerpartikel adsorbiert. Die Immunpräzipitate wurden schließlich durch Zentrifugieren bei 4°C und 14.000 rpm für 30 sec und darauffolgendem Waschen mit eiskaltem PBS (3x kurz) erhalten. Sie wurden mit SDS-Probenpuffer (Laemmli,1970) versetzt und bei -20°C gelagert oder einer anschließenden SDS-Gelelektrophorese unterzogen (siehe 2.6.1).

Das oben beschriebene Protokoll wurde für die Immunopräzipitation des IGF-I Rezeptors leicht modifiziert. Hierfür erfolgte zunächst eine Vorreinigung der Lysate durch Inkubation mit einer Mischung aus 10 µl Protein A-Trisacryl- und 10 µl Protein Agarosepartikeln für 1 h im Überkopfschüttler bei 4°C um unspezifisch an die Partikel bindende Proteine zu entfernen. Parallel dazu wurde eine Vorkopplung des IGF-I Rezeptor Antikörpers (20 µl) in 500 µl RIPA an einer Mischung aus Protein A-Trisacryl und Protein G-Agarose (1:1) durch eine 2 stündige Inkubation bei 4°C vorgenommen.

Nach Waschen mit PBS wurden die Antikörper-Partikel zu den vorgereinigten Lysaten gegeben und über Nacht bei 4°C unter Überkopfschüttlung inkubiert. Nach anschließendem Zentrifugieren bei 14.000 rpm für 30 sec und waschen mit PBS wurden die erwünschten Immunpräzipitate erhalten.

PBS-Puffer	RIPA-Puffer
167 mmol/l NaCl	1% (v/v) NP-40
16 mmol/l Na ₂ HPO ₄	0,25% (v/v) Na-Deoxycholat
1,7 mmol/l NaH ₂ PO ₄	150 mmol/l NaCl
pH 7,4	1 mmol/l EGTA
	1 mmol/l PMSF
	1 µg/ml Aprotinin
	1 µg/ml Leupeptin
	1 µg/ml Pepstatin
	1 mmol/l Na ₃ VO ₄
	1 mmol/l NaF
	50 mmol/l Tris, pH 7,4

2.3.2. Immunopräzipitation in adulten Kardiomyozyten

Zur Präparation wurden männliche Wistarratten (Harlan Winkelmann, Borcheln) mit einem Alter von 12 bis 16 Wochen verwendet. Kalzium-tolerante Kardiomyozyten wurden mittels retrograden in situ Perfusion des Herzens mit Kollagenase-Puffer isoliert (Eckel et al., 1983).

Auf diese Weise frisch isolierte adulte Kardiomyozyten wurden für 10 min mit 5×10^{-7} M der verschiedenen Insuline bei 37°C im Rundschüttler inkubiert (4×10^5 Zellen pro Situation). Nach der Stimulation erfolgte die Lysis der vorher abzentrifugierten Zellen in jeweils 450 µl eiskaltem RIPA Puffer durch Inkubation für 2 h bei 4°C im Überkopfschüttler. Nach einer darauffolgenden zweiminütigen Zentrifugation bei

15.000 rpm und 4°C erhielt man die Lysate, aus denen dann die Immunopräzipitation der IRS-Proteine nach dem in 2.3.1 beschriebenen Protokoll erfolgte.

2.3.3. Immunopräzipitation und Inhibition des Insulin- bzw. IGF-I-Rezeptors in menschlichen Skelettmuskelzellen

Menschliche Myoblasten vom Skelettmuskelgewebe wurden in Petrischalen ausgesät und in Medium, das unter anderem Serum und Insulin enthielt, für 2 Tage bei 37°C kultiviert (1 Million Zellen/Schale)

Nach sorgfältigem Waschen der Zellen mit sterilem PBS, um Reste von Wachstumsfaktoren zu entfernen, erfolgte eine 4 tägige Inkubation in einem serum- und insulinfreiem Medium bei 37°C. Direkt im Anschluß wurde das Medium erneuert und zusätzlich mit 0.5% BSA versetzt und eine weitere Inkubation der Muskelzellen für 1 h durchgeführt. Schließlich erfolgte die Stimulation mit den Hormonen (5×10^{-7} M) für 10 min, die Lysis der Zellen in 350 µl RIPA-Puffer und die Immunpräzipitation der IRS-Proteine nach der in 2.3.1 dargestellten Methode. Für die Inhibitionsexperimente in menschlichen Myoblasten wurde analog verfahren, jedoch wurden die Zellen unmittelbar vor der Stimulation mit Antiseren gegen den IGF-I- bzw. Insulinrezeptor (1:200) für 2 h bei 37°C inkubiert.

2.4. MAP-Kinase Aktivierung

Zu diesem Zweck wurden K6-Myoblasten in 6-Well-Platten ausgesät und in DMEM-komplett für 24 h bei 37°C kultiviert (3×10^5 Zellen/Well).

Nach einer anschließenden 2 stündigen serumfreien Inkubation der Zellen in DMEM, das zusätzlich 0,5% BSA enthielt, erfolgte die Stimulation mit 5×10^{-7} M der verschiedenen Insuline für 10 min bei 37°C. Daraufhin wurden die Zellen nach

Entfernen des Mediums und Waschen mit eiskaltem PBS in jeweils 100 µl RIPA-Puffer durch Inkubation für 2 h bei 4°C unter Überkopfschüttlung solubilisiert. In den durch Zentrifugation erhaltenen Lysaten wurde dann nach Western Blotting mit Phospho-MAP-Kinase spezifischen Antiseren (1:1000) detektiert (New England Biolabs).

2.5. Messung der DNA-Synthese

Für die hier dargestellten Experimente wurden K6-Myoblasten in 24-Well-Mikrotiterplatten (ELISA Platten, schwarz mit transparentem Boden zur lichtmikroskopischen Kontrolle) ausgesät und in 100 µl DMEM-komplett für 24 h bei 37°C kultiviert (1×10^4 Zellen/Well). Dieser Erholungsphase schloß sich eine serumfreie Inkubation der Zellen für 30 h bei 37°C (Hungerphase) an. Unmittelbar danach erfolgte die Stimulation mit den verschiedenen Hormonen (5×10^{-7} M) und der gleichzeitige Einbau von Bromdesoxy-Uridin, BrdU (Boehringer), über einen Zeitraum von 16 h bei 37°C. Nach dem Fixieren der Zellen durch Zugabe von jeweils 200 µl Fix-Denat für 30 min, wurden sie mit jeweils 100 µl anti-BrdU-POD-Antikörper versetzt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach anschließender Zugabe von jeweils 100 µl Substratlösung (1:100 Mischung von Substratkomponenten B und A) konnte die Chemilumineszenz auf einem LUMI Imager System gemessen werden. Für jede Situation wurden jeweils dreifache Ansätze (Triplikate) vorgenommen und daraus die Mittelwerte errechnet.

2.6. Phosphorylierung der intakten Myoblasten mit [³³P]-Orthophosphat

Die für dieses Experiment eingesetzten H9-Myoblasten wurden zunächst in 6-Well-Platten ausgesät und für 24 h in DMEM-komplett kultiviert bei 37°C (5x10⁵ Zellen/Well). Nach dem Waschen mit vorgewärmtem, sterilem PBS (2x) wurden die Zellen für 30 h in serumfreien Medium, komplementiert mit 0.5% BSA, inkubiert. Daraufhin wurde das Medium erneuert um abgestorbene Zellen zu entfernen und anschließend nach Zugabe von 250 µCi [³³P]-Orthophosphat (ICN) über einen Zeitraum von 24 h markiert. Gleichzeitig erfolgte die Stimulation der Zellen mit 5x10⁻⁷ M der Insuline über 24 h. Nach dieser Markierungs- und Stimulationsphase wurde das Medium entfernt und die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen, um überschüssige, nicht gebundene Radioaktivität zu beseitigen.

Anschließend wurden die Zellen in jeweils 300 µl von einem Triton X-100-haltigen Lysispuffer solubilisiert und die Zellysate durch zweidimensionale Elektrophorese, wie unter 2.6.2 erläutert, aufgetrennt,

Lysis-Puffer

1% (v/v)	Triton X-100
150 mmol/l	NaCl
10 mmol/l	EDTA
0,3 mmol/l	PMSF
10 mmol/l	Benzamidin
15 µmol/l	Pepstatin
1 mmol/l	Na ₃ VO ₄
20 mmol/l	NaF
50 mmol/l	Tris, pH 7,4

wobei die Phosphoproteine durch Autoradiographie mit Hilfe eines FUJI X BAS 1000 BioImage Systems (Fuji, Tokyo) detektiert wurden (Kessler et al., 1998).

2.7. Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen

2.7.1. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Bei dieser Methode erfolgte die Auftrennung der Proteine in einer Horizontalelektrophoresekammer (LKB 2117 Multiphor II, Amersham Pharmacia, Freiburg) in 0,5 mm dicken, diskontinuierlichen, foliengebundenen SDS-Polyacrylamid Gelen (Excel Gel SDS Gradient 8-18%, Amersham Pharmacia) aufgrund ihrer Masse. Als Pufferträger wurden Excel Pufferstreifen (Anode: 0,3 mol/l Tris/Acetat; 0,4% SDS; pH 6,4. Kathode: 0,08 mol/l Tris; 0,8 mol/l Tricin; 0,4% SDS; pH 7,1) von Amersham Pharmacia eingesetzt.

Die Lysate wurden entsprechend ihrer Vorbehandlung mit modifiziertem 2x Laemmli-Probenpuffer (Laemmli, 1970) auf eine einheitliche Proteinkonzentration (20 µg Protein) eingestellt bzw. Immunobeads mit

20 µl dieses Puffers versetzt und anschließend für 10 min bei 95°C im Thermoblock unter ständigem Schütteln denaturiert. Nach dem Auftragen der so behandelten Proben sowie

2 x Laemmli-Probenpuffer		
20 %	(v/v)	Glycerin
4 %	(w/v)	SDS
0,01%	(w/v)	Bromphenolblau
5 %	(v/v)	β-Mercaptoethanol
125	mmol/l	Tris, pH 6,8

Referenzproteinen auf das Gel, erfolgte die Elektrophorese bei 15°C mit einer konstanten Stromstärke von 30 mA und bei variabler Spannung bis maximal 600 V über ca. 2,5 h. Als Molekulargewichtsmarker wurden Proteinmischungen aus verschiedenen Referenzproteinen verwendet (High Molecular Weight-Marker, Amersham Pharmacia: Myosin aus Kaninchenmuskel, 212 kDa; α₂-Makroglobulin aus Rinderplasma, 170 kDa; β-Galactosidase aus E.coli, 116 kDa; humanes Transferrin, 76 kDa; Glutamat Dehydrogenase aus Rinderleber, 53 kDa. 10 kDa Protein Ladder; Life Technologies, Eggenstein: 12 Proteinbanden von 10 bis 120 kDa in 10 kDa Inkrementen und eine 200 kDa Bande).

2.7.2. Zweidimensionale Gelelektrophorese

Das hier zugrunde liegende Prinzip besteht in einer Trennung der Proteine zunächst in der ersten Dimension mit Hilfe der isoelektrischen Fokussierung aufgrund ihres isoelektrischen Punktes und anschließend in der zweiten Dimension durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgrund ihres Molekulargewichts bzw. Masse (O'Farrell, 1975). Zur isoelektrischen Fokussierung wurden foliengebundene Immobiline DryStrips mit einem linearen pH-Gradienten von 3-10 verwendet. Zunächst wurden die DryStrips in einem Immobiline DryStrip Reswelling Tray, das 170 µl Rehydratisierungslösung sowie 50 µl der mit [³³P]-Orthophosphat markierten Probe enthielt, für mindestens 18 h bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei wirkte die DryStrip Cover Fluid-Lösung, mit der die Strips überschichtet wurden, gegen Verdunstungen und Auskristallisieren des Harnstoffs während der Rehydratisierungsphase. Für die Durchführung der isoelektrischen Fokussierung wurden die rehydratisierten und mit Proben beladenen Strips in ein System überführt, das in einer Horizontalelektrophoresekammer installiert worden war. Wassergetränkte Filterpapierstreifen wurden zwischen den Elektroden und den Strips positioniert und stellten so den elektrischen Kontakt her. Anschließend erfolgte nach erneutem Überschichten der Strips mit ausreichend Cover Fluid die 18 stündige isoelektrische Fokussierung, die sich in die folgenden 3 Stufen gliederte.

Phase	V	mA	W	Zeit (h)	Vh
1	300	1	5	3	900
2	300	1	5	5	5750
3	300	1	5	10	20000
total				18	26650

Nach Beendigung der ersten Dimension wurde die Äquilibration der DryStrips in zwei Stufen durchgeführt. Sie wurden zunächst für 10 min in Äquilibration I und anschließend für 20 min in Äquilibration II bei Raumtemperatur inkubiert, wobei der Zusatz von Iodacetamid beim zweiten Schritt dem Abfangen von überschüssigem Reduktionsmittel diente. Daraufhin wurden die DryStrips mit der Gelseite auf 8-18% diskontinuierliche SDS-Gele gelegt und die schon nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennte Proteine nun in der zweiten Dimension einer SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese unterzogen. Das gesamte hierfür verwendete Material, einschließlich Apparaturen wurden von Pharmacia bezogen.

Rehydratisierungslösung	
8 mol/l	Urea
2%	CHAPS
1:50	Pharmalyte pH3 -10
0,3%	DTT
<10 mg	Bromphenolblau

Äquilibration I	
50 mmol/l	Tris/HCL, pH 7,4
6 mol/l	Harnstoff
30 % (v/v)	Glycerin
0,08 mmol/l	EDTA
2% (w/v)	SDS
52 mmol/l	DTT

Äquilibration II	
siehe Lösung I	
+ 0,28 mol/l Iodacetamid	
+ 0,01% (w/v) Bromphenolblau	

2.8. Proteintransfer auf Membranen (Westernblot)

Der Transfer der nach der SDS-Polyacrylamid Elektrophorese aufgetrennten Proteine auf Nitrocellulose-Filter (Schleicher & Schuell, Dassel) oder PVDF-Membran (Sigma, Deisenhofen) erfolgte in einer Semidry-Blotapparatur mit Graphitelektroden (NovaBlot, Amersham Pharmacia). Hierbei wanderten die Proteine entlang der Feldlinien des zwischen den Elektrodenplatten angelegten elektrischen Feldes und wurden so aus dem Gel auf die Membran transportiert. Zu diesem Zweck wurde ein diskontinuierliches Puffersystem, bestehend aus Anodenlösung I und II und

Kathodenlösung, sowie insgesamt 18 Filterpapiere (Mukoll) verwendet. Zunächst wurden 6 Filterpapiere in Anodenlösung I getränkt und auf der Anodenplatte plaziert. Nach einer 5minütigen Äquilibration des Gels in Anodenlösung II wurde die Trägerfolie abgetrennt. Auf das Gel wurden die vorher ebenfalls in Anodenlösung II getränkte Membran und drei weitere Filterpapiere positioniert und im Anschluß wurde dieses Paket auf den bereits auf der Anodenplatte sich befindendem Filterstapel gelegt. Nach Entfernen der bereits vom Gel abgetrennten Folie wurden die restlichen 9 Filterpapiere in Kathodenlösung getränkt, auf das oben liegende Gel überführt und schließlich mit der Kathodenplatte abgedeckt. Der Proteintransfer erfolgte bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 40 min wobei die hierfür ausgewählten Parameter durch eine Stromstärke von $0,8 \text{ mA/cm}^2$ Gel, einer variablen Spannung bis maximal 20 V und einer variablen Leistung bis maximal 5 W definiert waren.

Anodenlösung I

300 mmol/l Tris
20% (v/v) Methanol

Anodenlösung II

25 mmol/l Tris
20% (v/v) Methanol

Kathodenlösung

40 mmol/l 6-Aminohexansäure
0,01% (v/v) SDS
20% (v/v) Methanol

2.9. Färbetechniken

2.9.1. Ponceau S-Färbung

Nach Beendigung des Proteintransfers wurde die Membran 2x mit destilliertem Wasser jeweils für 5 min gewaschen und anschließend für ca. 15 min in Ponceau S-Färbelösung (0,1% (w/v) Ponceau S in 3% (v/v) Trichloressigsäure) bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem die Proteinbanden sichtbar waren, wurde die Membran 2x kurz mit destilliertem Wasser gewaschen und schließlich an der Luft getrocknet. Hierbei handelt es sich um eine reversible Färbetechnik.

2.9.2. Silberfärbung

Die Anfärbung der zweidimensionalen Gele erfolgte nach dem Verfahren von Heukeshoven und Dernick (1985), das eine Nachweisgrenze von 4 ng Protein aufweist. Mit Hilfe dieses Protokolls wurden die aufgetrennten radioaktiven Phosphoproteine sowie die Markerproteine sichtbar gemacht.

2.10. Immunodetektion

2.10.1. Detektion mit verstärkter Chemilumineszenz (ECL)

Die Blotmembranen wurden unmittelbar nach dem Proteintransfer bzw. nach dem Strippen (2.11.) in 30 ml Blockierlösung (TBS/Tween 0,05% (v/v); Magermilchpulver 5% (w/v)) für 1 h bei Raumtemperatur unter

ständigem Schütteln inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Es folgte dann eine Inkubation der Membranen mit den in Blockierlösung gelösten, spezifischen Antisera, bei 4°C über Nacht. Daraufhin wurden die Membranen mit TBS/Tween durch mehrfaches Wechseln des Puffers 1 h lang gewaschen und anschließend mit

TBS-Puffer	
10 mmol/l	Tris, pH 7,5
0,1 mol/l	NaCl

einem sekundären Antikörper (Ziege anti-Kaninchen IgG, gekoppelt an Meerrettich Peroxidase, 1:3000) in Blockierlösung für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die Blotmembranen erneut für 1 h mehrfach gewaschen mit TBS/Tween-Puffer und schließlich für 10 min in einer Mischung aus ECL-Substrat- und Verstärkerlösung (Pierce, USA) inkubiert. Die Analyse und Quantifizierung erfolgte mit Hilfe eines LUMI Imagers und entsprechender Software (Boehringer, Mannheim).

2.10.2. Phosphotyrosinnachweis

Die Detektion der Tyrosinphosphorylierung der verschiedenen Proteinen nach Insulinstimulation erfolgte mit Hilfe des rekombinanten, monoklonalen Antikörpers RC20 (Transduction Laboratories, Lexington, USA).

Bei Verwendung dieses Antikörpers entfiel die Inkubation mit einem sekundären Antikörper, weil ersterer direkt mit der Horseradish Peroxidase konjugiert ist. Im Anschluß an den Proteintransfer wurden die Blotmembranen in Blockierlösung (TBS/Tween 0,05% (v/v); BSA 1% (w/v)) für 1 h bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Darauf folgte eine Inkubation mit dem in Blockierlösung gelösten RC20 (1:2500) über Nacht bei 4°C. Nach 1 h Waschen durch mehrfaches Wechseln des TBS/Tween-Puffers wurden die Membranen, wie unter 2.10.1. beschrieben, für 10 min in ECL-Substrat/Verstärkerlösung inkubiert und anschließend die Signale durch Detektion mit ECL-System visualisiert.

2.11. Strippen der Blotmembran

Ein „Western Blot Recycling Kit“ (Biotrend, Köln) ermöglichte die Wiederverwendung von bereits mit Hilfe des ECL-Systems detektierten Membranen durch Abtrennung des primären Antikörpers von den auf die Membran transferierten Proteinen. Hierfür erfolgte eine Inkubation der Blotmembranen in einer mit destilliertem Wasser

verdünnten speziellen Antikörper-Strip-Lösung (10:1) für 15 min bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln. Anschließend wurden die Membranen 2x für jeweils 10 min mit Blockierlösung (TBS/Tween 0,05% (v/v); Magermilchpulver 5% (w/v)) gewaschen und einer weiteren Immunodetektion mittels ECL, wie in Abschnitt 2.10.1. bereits erläutert, unterzogen.

2.12. Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration der Zelllysate wurde durch Verwendung eines auf der Methode von Bradford (1976) beruhenden Bio-Rad-Proteinassays (Bio-Rad, München) bestimmt. Das hierbei zugrunde liegende Prinzip basiert auf der Verschiebung der maximalen Extinktion des Coomassie Brilliant Blue G250-Farbstoffs von 465 nm auf 595 nm nach Proteinkomplexbildung. Als Proteinstandardlösung diente in destilliertem Wasser gelöstes Rinderserumalbumin (reinst, Behring). Sowohl die Proben als auch die Standardlösung wurden mit destilliertem Wasser verdünnt und mit je 0,2 ml Bio-Rad Farbstoffreagenz versetzt. Nach einer Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 595 nm photometrisch bestimmt und die daraus resultierende Proteinkonzentration berechnet.

2.13. Auswertung der Daten und Statistik

Die Daten wurden grundsätzlich als Mittelwert \pm S.E.M (Standardabweichung der Mittelwerte) von jeweils mehreren unabhängigen Experimenten dargestellt. Die statistischen Signifikanzen wurden mit Hilfe des Computerprogramms „t-ease“ (ISI, Philadelphia, USA) ermittelt, welches auf dem t-test nach Student für gepaarte bzw. ungepaarte Daten beruht. Die Signifikanzgrenze wurde mit $p < 0,05$ festgelegt.

2.14. Antiseren

Anti-IGF-I Rezeptor (1): Monoklonales Maus IgG_{1K} (Klon α IR-3), gerichtet gegen die α - und β -Untereinheiten des IGF-I Rezeptors (Kull et al., 1983), Calbiochem, Bad Soden.

Anti-IGF-I Rezeptor (2): Monoklonales Maus IgG1 (Klon 24-57), gerichtet gegen die α -Untereinheiten des menschlichen IGF-I Rezeptors (Soos et al., 1992), Cambridge, UK.

Anti-IR: Monoklonales Maus IgG1 (Klon 47-9), gerichtet gegen die α -Untereinheiten des menschlichen Insulinrezeptors (Soos et al., 1986), Cambridge, UK.

Anti IRS-1 (1): Polyklonales Kaninchen Antiserum (Klon K6b), gerichtet gegen ein rekombinantes Peptid (AS:581-857) des Ratten IRS-1 (Ouwens et al., 1994), Leiden University, Leiden, Niederlande.

Anti IRS-2 (1): Polyklonales Kaninchen Antiserum (Klon K4), gerichtet gegen ein rekombinantes Peptid entsprechend der C-terminalen Region zwischen Ser1003 und Leu324 des Maus IRS-2 (Telting et al., 2001 in press), Leiden University, Leiden, Niederlande.

Anti-IRS-1 (2): Polyklonales Kaninchen anti-Ratte IgG, gerichtet gegen ein synthetisches Peptid entsprechend 12 carboxyterminalen Resten der Ratte IRS-1 (Lamphere & Lienhard, 1992), Upstate Biotechnology, Lake Placid, USA.

Anti-IRS-2 (2): Polyklonales Kaninchen anti-Maus IgG, gerichtet gegen ein GST-Fusionsprotein (AS:976-1094) des Maus IRS-2 (Sun et al., 1995), Upstate Biotechnology, Lake Placid, USA.

Anti p44/42 MAPK: Polyklonales Kaninchen IgG, gerichtet gegen ein synthetisches Peptid (AS 350-360) der humanen p44 MAP-Kinase (Marschall, 1995) New England BioLabs, Schwalbach.

Anti-phospho MAPK: Polyklonales Kaninchen IgG, gerichtet gegen ein synthetisches Phosphotyrosinpeptid (AS: 196-209) der humanen p44 MAP-Kinase (Marschall, 1995), New England BioLabs, Schwalbach.

Anti-Phosphotyrosin: (RC20) Rekombinante und in E.coli exprimierte variable Regionen der leichten und schweren Ketten des anti-Phosphotyrosin Antikörpers PY20, gekoppelt an Meerrettich Peroxidase (Ruff-Jamison et al., 1991), Transduction Laboratories, Lexington, USA.

Anti-Rabbit IgG: Polyklonales Ziege anti-Kaninchen IgG, gerichtet gegen die schweren und leichten Ketten des Kaninchen IgG, gekoppelt an Meerrettich Peroxidase, Promega, Mannheim.

Anti-Shc: Polyklonales Kaninchen anti-Maus IgG, gerichtet gegen ein rekombinantes GST-Fusionsprotein (AS: 366-473) des Menschen Shc-SH₂ (Pelicci et al., 1992), Upstate Biotechnology, Lake Placid, USA.

Die polyklonalen Kaninchen anti-IRS-1 und anti-IRS-2 Antiseren stellte freundlicherweise Dr. J.A. Maassen (Leiden, Niederlande) zur Verfügung und die monoklonalen Maus anti-IGF-IR- und anti-IR Antiseren stammten von Prof.Dr. Ken Siddle (Cambridge, UK).

2.15. Zellsysteme

H9c2-Zelllinie: Adhärente Kardimyozyten der Ratte im Myoblastenstadium
American Type Culture Collection, Maryland, USA

H9c2-K6-Zelllinie: Adhärente Kardimyozyten der Ratte im Myoblastenstadium mit stabiler GLUT4-Überexpression (Lämmerhirt, 1995)

Humane Muskel-

zellen (SkMC): Adhärente Myozyten aus menschlichem Skelettmuskelgewebe im Myoblastenstadium, Promo Cell, Heidelberg

Die H9c2-K6-Zellen stellen eine in unserer Arbeitsgruppe etablierten insulin-sensitive Muskelzelllinie mit stabiler Expression des Glukosetransporters GLUT4, die von Lämmerhirt (1995) mittels Klonselktion hergestellt wurden, dar (Dransfeld et al., 2000).

2.16. Kulturmedien

für H9c2-Zellen: DMEM (1000 mg/l D-Glukose mit L-Glutamin, Na⁺-Pyruvat, 26mM HEPES)

+ FCS 10% (v/v)

+ Nichtessentielle Aminosäuren 1%

+ Penicillin (100 U/ml)

+ Streptomycin (100 µg/ml)

für H9c2-K6-Zellen: siehe oben

+ Geneticin (0,6 mg/ml)

für SkMC : Basal Medium (modifiziertes MCDB 120) mit 28 mM Hepes
(Promo Cell)

+ Fetal Calf Serum 5%

+ Fetuin 50 µg/ml

+ Basic Fibroblast Factor 1 ng/ml

+ Epidermal Growth Factor 10 ng/ml

+ Insulin 10 ng/ml

+ Dexamethasone 0,4 µg/ml

+ Amphotericin B 50 ng/ml

+ Gentamicin 50 µg/ml

2.17. Kit-Systeme

Bio-Rad Protein Assay

Bio-Rad, München

Cell Proliferation ELISA,

Boehringer, Mannheim

BrdU (Chemiluminescence)

SuperSignal Chemiluminescent Substrate

Pierce, Rockford, USA

Western Blot Recycling Kit

Biotrend, Köln

2.18. Radioisotope

[³³P]-Orthophosphat (trägerfrei; >4000 Ci/mmol)

ICN, Eschwege

¹²⁵J-Humaninsulin (363 mCi/mg)

Aventis, Frankfurt a.M.

¹²⁵J-AspB10-Insulin (365 mCi/mg)

¹²⁵J-HMR 1964 (362 mCi/mg)

Aventis, Frankfurt a.M.

¹²⁵J-HMR 1153 (361 mCi/mg)

2.19. Chemikalien

Humaninsulin (HR 1799)

Aventis, Frankfurt a.M.

AspB10-Insulin (I 92 4885)

HMR 1964

HMR 1153

Rinderserum Albumin (lyophilisiert, reinst)

Behring, Marburg

Rinderserum Albumin (fettsäurefrei, Fraktion V)

Boehringer, Mannheim

Leupeptin

Fluka, Neu-Ulm

Pepstatin

PBS Dulbecco`s,steril

Gibco, Berlin

Trypsin (0,5 g/l) / EDTA (0,2 g/l)-Lösung

Milchpulver, fettarm

Neuform, Fink GmbH,

Herrenberg

Protein A Trisacryl (GF-2000)

Pierce, Oud Beijerland, NL

Protein G Agarose

Trypsinneutralisierungslösung

PromoCell, Heidelberg

Aprotinin

Sigma, München

DTT

Iodacetamid

PMSF

Ponceau S

Tween 20

Die Reagenzien für die 2D-Elektrophorese und die SDS-PAGE stammten von Amersham Pharmacia (Freiburg) und Sigma (München). Alle weiteren Chemikalien wurden in p.A. Qualität von den Firmen Merck (Darmstadt), Fluka (Neu-Ulm) und Sigma bezogen.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung der K6-Myoblasten

Das Peptidhormon Insulin steuert über komplexe intrazelluläre Signalkaskaden eine Vielzahl metabolischer und mitogener Effekte (White, 1997). Das Entfalten der Insulinwirkung wird durch die Bindung des Hormons an spezifische Rezeptoren auf der Plasmamembran der Zielzellen ermöglicht. Diese Interaktion stellt eine kritische regulatorische Determinante dar. Umfangreiche Untersuchungen belegen, daß die veränderten Wirkungsspektren gentechnologisch modifizierter Insuline, sowohl dem Insulinrezeptor als auch dem strukturell homologen IGF-I Rezeptor zugeordnet werden müssen (Hansen et al., 1996; Milazzo et al., 1997). Die Expression der beiden Rezeptorsysteme ist jedoch gewebespezifisch, wobei im differenzierenden Muskelgewebe der IGF-I Rezeptor dominiert. Studien an H9-, C2- und BC3H-1 Muskelzelllinien konnten einen hohen Besatz mit IGF-I Rezeptoren, dagegen keine detektierbare Menge an Insulinrezeptoren im Myoblastenstadium nachweisen (Bähr et al., 1997; Brunetti et al., 1989; Standaert et al., 1984).

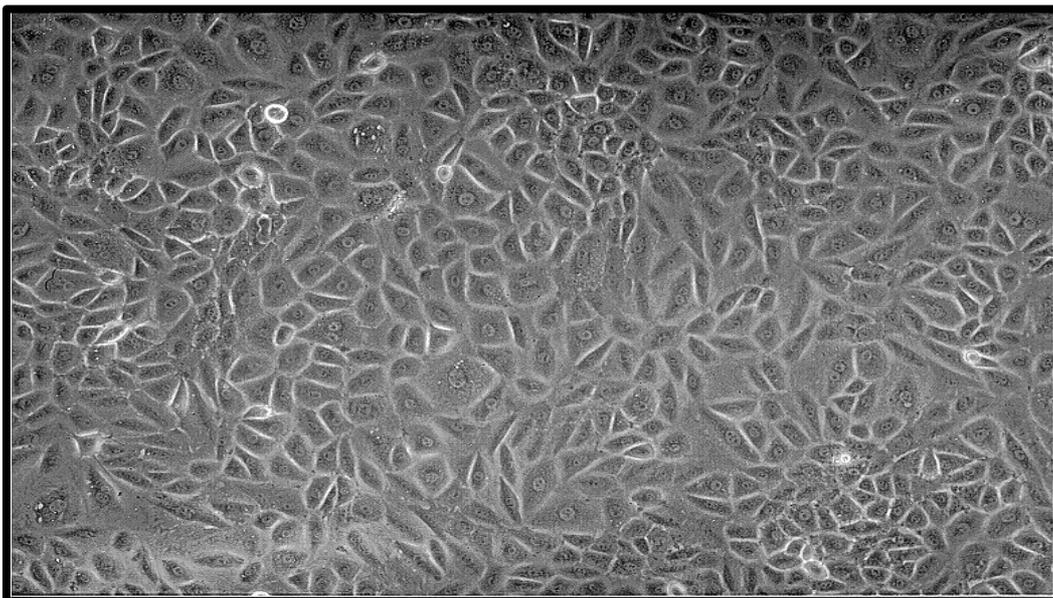


Abb.3.: Lichtmikroskopische Aufnahme von K6-Myoblasten im konfluenten Wachstumsstadium (Vergrößerung: 40fach).

Zur molekularen Analyse der Signaltransduktion durch die neuen Insulinanaloga wurden K6-Myoblasten gewählt, eine in unserer Arbeitsgruppe etablierte und charakterisierte insulinsensitive Muskelzelllinie (Dransfeld et al., 2000). Der Vorteil dieses Zellsystems besteht darin, daß die differenzierenden Zellen einen hohen Expressionsgrad an IGF-I Rezeptoren, jedoch nur einen geringen Anteil an Insulinrezeptoren aufweisen. Obwohl eine Überlappung der Wirkung der beiden Rezeptoren nicht auszuschließen ist, kann angenommen werden, daß die im Myoblastensystem beobachteten Insulinsignaleffekte im wesentlichen über den dominierenden IGF-I Rezeptor vermittelt werden. Desweiteren stellt die kontinuierliche, adhärente K6-Zelllinie ein gut kultivierbares Zellsystem mit einer schnellen Generationszeit (ca.30 h) dar. Die Myoblasten erreichen nach ca. 1 Woche einen konfluenten Zustand (siehe Abb.3). Im Verlaufe der Kultivierung ist weder eine Beeinträchtigung der Vitalität der Zellen noch morphologische Veränderungen zu beobachten. Schließlich ist die Lebensdauer der primären Zellen nicht durch eine bestimmte Anzahl von Subkultivierungen begrenzt und somit repräsentiert diese insulinsensitive Herzmuskelzelllinie ein geeignetes Modellsystem für Langzeitstudien der Insulinwirkung, wobei hier die über den IGF-I Rezeptor vermittelten Effekte im Vordergrund stehen.

3.1.1. Bindungscharakteristik von Insulinanaloga

Strukturelle Modifikationen des Insulinmoleküls bewirken eine Veränderung der dreidimensionalen Struktur und somit der Interaktion mit den Rezeptoren. Literaturstudien mit Insulinanaloga in verschiedenen Zellsystemen belegen, daß Substitutionen in der C-terminalen Region der B-Kette insbesondere die Bindungsaffinität zum IGF-I Rezeptor beeinflussen (Sliker et al., 1997). In Abb. 4 ist das Bindungspotential der beiden neuen Insulinanaloga 1964 und 1153 in intakten

K6-Zellen im Vergleich zum nativen Humaninsulin und zum supermitogenen AspB10-Insulin dargestellt. Nach einer 1 stündigen serumfreien Vorinkubation wurden die K6-Myoblasten mit 5×10^{-11} M der ^{125}J -markierten Insuline in Anwesenheit der entsprechenden unmarkierten Peptide (10^{-8} M) für 10 min bei 37°C in parallel für jede Situation durchgeführten Ansätzen inkubiert. Die gezeigten Daten sind korrigiert um die unspezifische Bindung, die in der Anwesenheit eines Überschusses von unmarkierten Insulinen (10^{-5} M) ermittelt wurde. In Übereinstimmung mit anderen Arbeiten zur Bindungsaffinität des supermitogenen AspB10-Insulins (Drejer et al., 1991; Milazzo et al., 1997) zeigte dieses auch in unserem Zellsystem eine stark erhöhte spezifische Bindung von $4,2 \pm 0,05$ fmol/ 2×10^5 Zellen. Das Insulinanalogon 1153 wies mit $4,4 \pm 0,1$ fmol/ 2×10^5 Zellen ein mit AspB10-Insulin ähnlich starkes Bindungspotential, wohingegen das Analogon 1964 eine signifikant schwächere spezifische Bindung ($2,2 \pm 0,1$ fmol/ 2×10^5 Zellen) zeigte, die mit der des nativen Humaninsulins ($2,8 \pm 0,06$ fmol/ 2×10^5 Zellen) vergleichbar war.

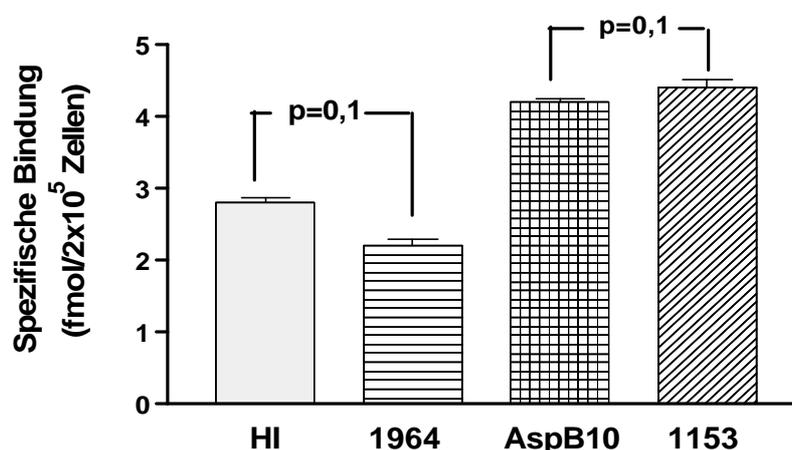


Abb.4.: Bindung von ^{125}I -markierten Insulinen an K6-Myoblasten. Konfluente K6-Myoblasten (2×10^5 Zellen/Well) wurden zunächst für 1 h bei 37°C in serumfreien DMEM mit 2% BSA inkubiert. Nach gleichzeitiger Zugabe von 5×10^{-11} M der radioaktiv markierten Insulinliganden ($0,1 \mu\text{Ci/Well}$) und 10^{-8} M der entsprechenden unmarkierten Peptide erfolgte die Bindung für 10 min bei 37°C und anschließend ihre Bestimmung in den radioaktiven Lysaten mittels einem gamma-Counter. Alle Daten wurden um die unspezifische Bindung korrigiert, die in Anwesenheit von 10^{-5} M unmarkierter Peptidhormone ermittelt wurde. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. aus 4 unabhängigen Experimenten.

3.1.2. Rezeptorvermittelte Internalisierung und intrazelluläre Degradierung von Insulinanaloga

Die Insulinbindung am Rezeptor löst die schnelle Endocytose des Ligand/Rezeptor-Komplexes aus (Carpentier et al., 1978; Gorden et al., 1978). Die Internalisierung des Insulin/Rezeptor-Komplexes stellt den wichtigsten Mechanismus der Insulindegradierung sowie der Down-Regulierung der Rezeptordichte an der Zelloberfläche dar (McClain, 1992; Yamada et al., 1995). Die molekulare Mechanismen des Internalisierungsprozesses sind jedoch bisher im wesentlichen unklar.

Um einen Einblick in die initialen Signalvorgänge und die Prozessierung der verschiedenen Analoga durch die Myoblasten zu gewinnen, wurden K6-Zellen nach einer 1 stündigen serumfreien Vorinkubation mit den ^{125}J -markierten Insulinen ($0,1 \mu\text{Ci/Well}$) für 1 h bei 37°C markiert und im Anschluß durch Waschen in saurem pH (Acid Wash) bzw. mittels TCA-Fällung die rezeptorvermittelte Internalisierung und der intrazelluläre Abbau der Analoga ermittelt.

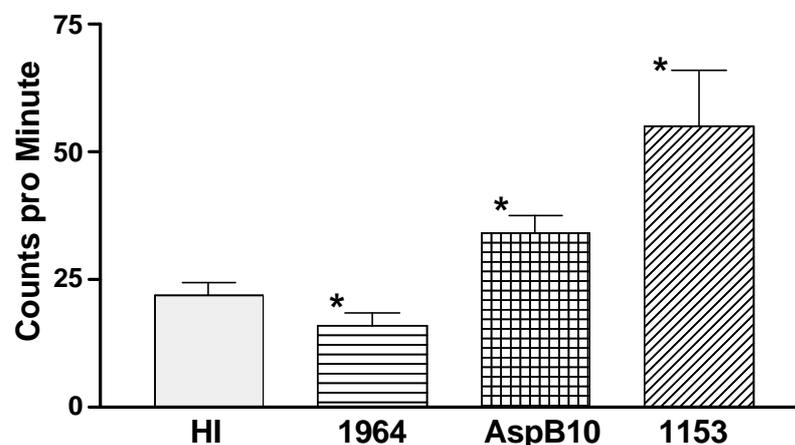


Abb.5.: Internalisierung von ^{125}I -markierten Insulinen in K6-Myoblasten. Je 3×10^5 K6-Myoblasten wurden nach einer 1 stündigen serumfreien Vorinkubation in DMEM, ergänzt mit 0,5% BSA, mit 5×10^{-11} M des nativen ^{125}I -Humaninsulins bzw. ^{125}I -markierter Insulinanaloga ($0,1 \mu\text{Ci/Well}$) für 1 h bei 37°C versetzt. Die jeweiligen internalisierten Insulinmengen wurde durch einen Acid Wash der adhärenen Zellen, wie im entsprechenden Methodenteil erläutert, und nachfolgender Messung der Radioaktivität in den K6-Lysaten mit Hilfe eines gamma-Counters ermittelt. Auf der Ordinate sind die Counts pro Minute als Maß für die Internalisationsrate angegeben. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. aus 5 verschiedenen Experimenten. * Signifikant verschieden vom nativen Humaninsulin mit $p < 0,05$.

In Abb. 5 ist die im gamma-Counter gemessene zellassoziierte Radioaktivität, ausgedrückt als Counts pro Minute dargestellt, welche ein Maß für den Internalisierungsgrad der Insuline repräsentiert. Es ist deutlich zu erkennen, daß das Analogon 1153 die schnellste Internalisierungsrate (55 ± 11 Counts pro Minute) aufwies, während das AspB10-Insulin mit 34 ± 4 Counts pro Minute einer deutlich langsameren Internalisierung unterlag. Der langsamste rezeptorvermittelte Internalisierungsprozeß wurde für das Analogon 1964 beobachtet, das mit 16 ± 3 Counts pro Minute sogar noch unter dem für Humaninsulin ermittelten Wert (22 ± 3) lag.

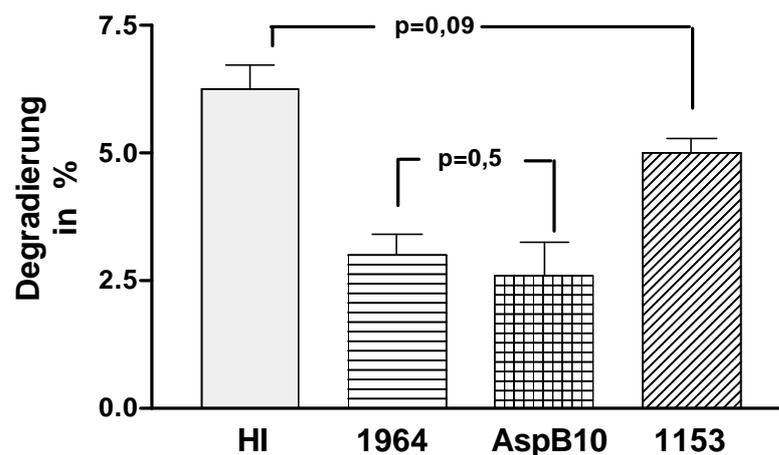


Abb.6.: Intrazelluläre Degradierung von ^{125}I -markierten Insulinen in K6-Myoblasten. Konfluente K6-Myoblasten (3×10^5 Zellen/Well) wurden analog zu den Internalisationsversuchen, wie bereits in Abb.5 beschrieben, vorbehandelt und mit den radioaktiv markierten Peptiden ($0,1 \mu\text{Ci/Well}$) für 1 h inkubiert. Direkt im Anschluß wurde der Abbau der einzelnen internalisierten Insuline aus den Solubilisaten mittels TCA-Fällung und nachfolgender Messung der Radioaktivität in einem gamma-Counter ermittelt. Auf der Ordinate ist die prozentuale Abbaurrate angegeben. Die gezeigten Daten repräsentieren Mittelwerte \pm S.E.M. aus 4 separaten Versuchen.

Der schnelle intrazelluläre Abbau des Analogons 1153 ($5\% \pm 0,3$) im Vergleich zu den anderen Insulinen (siehe Abb. 6) steht in guter Übereinstimmung mit seinem hohen Internalisierungsgrad. Der beobachtete Abbauvorgang der Analoga 1964 und

AspB10 verlief signifikant langsamer ($3\% \pm 0,4$ bzw. $2,6\% \pm 0,7$) im Vergleich zu 1153 und steht ebenfalls in guter Korrelation mit ihrem langsameren Internalisierungsprozeß. Hingegen war der für Humaninsulin ermittelte Degradierungsgrad ($6,3\% \pm 0,5$) in Anbetracht seiner langsamen Internalisierung, überraschend hoch.

Diese Daten deuten darauf hin, daß die Internalisierung des Insulinmoleküls nicht immer mit dem nachfolgenden Abbauprozeß des Hormons korreliert. Um die Divergenz in der Rezeptorinteraktion der einzelnen Insulinpeptide weiter zu charakterisieren wurde im Folgenden eine Untersuchung der initialen Signalauslösung auf der Ebene der Tyrosinphosphorylierung des IGF-I Rezeptors vorgenommen.

3.1.3. Autophosphorylierung des IGF-I Rezeptors

Der IGF-I Rezeptor, der eine hohe strukturelle Homologie zum Insulinrezeptor aufweist, ist ein heterotetrameres Glykoprotein, das sich aus zwei extrazellulären hormonbindenden α -Ketten und zwei transmembranen β -Untereinheiten mit intrinsischer Tyrosinkinase-Aktivität aufbaut (Ullrich & Schlessinger, 1990). In Analogie zum Insulinrezeptor führt die Hormonbindung über eine allosterische Konformationsänderung des IGF-I Rezeptors zur Aktivierung der Tyrosinkinase im cytosolischen Anteil der β -Untereinheiten, die mit der Autophosphorylierung bestimmter Tyrosinreste in verschiedenen Regionen der β -Ketten einhergeht (Treadway et al., 1991; Frattali et al., 1992; White & Kahn, 1994). Aufgrund umfangreicher Untersuchungen ist es allgemein akzeptiert, daß die Aktivierung der Rezeptortyrosinkinase eine wesentliche Voraussetzung für die Ligand-vermittelte Rezeptorinternalisation und die intrazelluläre Weiterleitung des Insulinsignals darstellt (McClain et al., 1987; Backer et al., 1990; Carpentier et al., 1993).

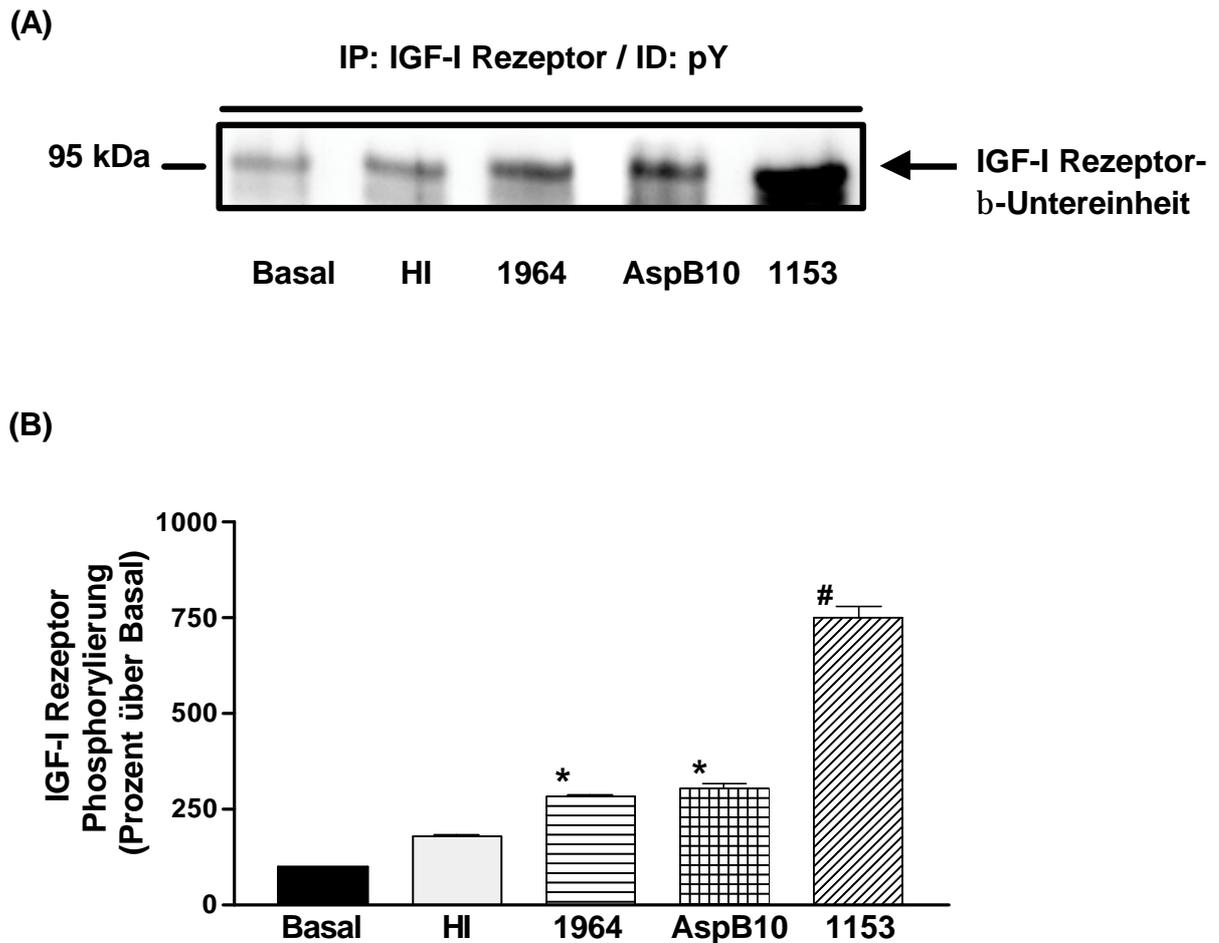


Abb.7.: Einfluß von Humaninsulin bzw. Insulinanaloga auf die Autophosphorylierung des IGF-I Rezeptors in K6-Myoblasten. (A) Konfluente Myoblasten (3×10^6 Zellen/Petrischale) wurden nach einer 2 stündigen serumfreien Inkubation in DMEM (+0,5% BSA) für 10 min mit nativem Humaninsulin(HI) bzw. Analoga in einer finalen Konzentration von 500 nmol/l stimuliert und anschließend der IGF-I Rezeptor aus den Zellysaten (je 1 mg Protein), wie im Abschnitt Material und Methoden erläutert, immunpräzipitiert (IP). Die Immunodetektion (ID) der mittels SDS-Page (8-18%iges Gel) aufgetrennten und nachfolgend auf PVDF-Filter transferierten Immunokomplexe erfolgte mit Hilfe eines an Meerretich-Peroxidase gekoppelten Anti-Phosphotyrosin (pY) Antiserums und ECL-Methode. Als Kontrolle dienten IGF-I Rezeptor Immunpräzipitate unbehandelter Zellen. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment. Das Molekulargewicht der b-Untereinheit des IGF-I Rezeptors ist links angegeben. (B) Die Quantifizierung der Phosphotyrosinsignale erfolgte mit Hilfe des LUMI Imagers unter Verwendung der zugehörigen Analysesoftware. Die Signalstärken sind in relativen Einheiten angegeben, wobei der Basalzustand gleich 100 gesetzt wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. aus 3 verschiedenen Versuchen. Signifikant verschieden vom nativem Humaninsulin, * $p < 0,006$; # $p < 0,001$.

Um eine reproduzierbare Bestimmung der Insulineffekte zu gewährleisten, war die Realisierung möglichst niedriger basaler Raten erforderlich. Darüber hinaus war es wichtig, Faktoren, die die Insulinwirkung modulieren, wie die unspezifische Bindung der Peptide, auszuschließen. Zu diesem Zweck wurden für die hier dargestellten Versuche die K6-Myoblasten zunächst für 2 h bei 37°C in serumfreiem Medium, das mit 0,5% BSA ergänzt wurde, inkubiert. Daraufhin folgte eine 10 minütige Stimulation mit den Insulinen (Endkonzentration: 500 nmol/l). Die IGF-I Rezeptor Immunpräzipitate aus unbehandelten und hormonstimulierten Zellsaten wurden im Anschluß an die gelelektrophoretische Auftrennung und dem Transfer auf eine Blotmembran einer Immunodetektion mit Anti-Phosphotyrosin Antiserum unterzogen. In Abb.7A ist ein repräsentatives Ergebnis dieser Experimente wiedergegeben. Wie der Western Blot veranschaulicht, ließ sich in den Immunpräzipitaten Insulin-behandelter Zellen eine deutliche Steigerung der Autophosphorylierung des Rezeptors im Vergleich zu den Kontrollzellen, sowie ein eindeutiger Unterschied in den Effekten der verschiedenen Peptide immunodetektieren. Das Analogon 1153 induzierte dabei eine sehr prominente Stimulation des IGF-I Rezeptors, während Humaninsulin nur eine schwache Wirkung zeigte, was auch gut mit den Bindungsdaten dieser Peptide korreliert. Trotz deutlich schwächerer Affinität zum IGF-I Rezeptor löste das Analogon 1964 eine mit AspB10-Insulin vergleichbare Autophosphorylierung des Rezeptors aus. Die Quantifizierung der in den IGF-I Rezeptor Immunpräzipitaten detektierten Phosphotyrosinsignale ist in Abb. 7B dargestellt. In Bezug auf den Basalzustand ergab sich nach 10minütiger Stimulation für das Analogon 1153 eine 7,5 fache Steigerung der IGF-I Rezeptor Autophosphorylierung, während Humaninsulin den geringsten Effekt bewirkte (1,8 fach). Auffällig ist dabei, daß die Wirkung von 1153 etwa 2,5 fach höher als die durch AspB10 induzierte Autophosphorylierung war, trotz der gleichen

Bindungsaffinität dieser Peptide. Bemerkenswert ist auch, daß AspB10-Insulin und 1964 eine vergleichbare Tyrosinphosphorylierung (3 fach) des Rezeptors trotz unterschiedlicher Bindungsaffinität induzierten. Diese Resultate deuten darauf hin, daß der Grad der Rezeptorbesetzung wichtig, jedoch nicht ausreichend für die Determinierung des Signalpotentials des Insulinmoleküls ist. Es läßt sich außerdem folgern, daß die initialen Signalprozesse für die Analoga 1153 und 1964 deutlich divergent sind. Es stellte sich somit die Frage, ob diese Unterschiede auch für die weiter abwärts gelegenen Signalwege zutreffen. Die im Folgenden dargestellten Untersuchungen zielten daher darauf ab, weitere Erkenntnisse über die IGF-I Rezeptor vermittelte differentielle Signaltransduktion dieser neuen Insulinanaloga zu gewinnen. Mit Hinblick auf die potentielle mitogene Wirkung dieser modifizierten Insuline war die Ras/MAP- Kinase Kaskade hier vorrangig zu analysieren.

3.2. Molekulare Untersuchungen zum Mechanismus der Signaltransduktion durch Insulinanaloga auf Postrezeptor-Ebene

3.2.1. Untersuchung zur Aktivierung der MAP- Kinase Kaskade

Die MAP-Kinasen (Mitogen-aktivierte Proteinkinase) oder auch als extrazellulär-aktivierte Kinasen (ERK) bezeichnet, sind zentrale Signalgeber für Wachstums - und Differenzierungsprozesse, sowie Auslösung mitogener Effekte. Diese Kinasen werden durch ein breites Spektrum unterschiedlicher proliferations- und differenzierungsinduzierender Faktoren reguliert und empfangen das Signal in Form einer aktivierenden Phosphorylierung an einem Threonin- und einem Tyrosinrest in der Sequenz TXY durch die vorgeschaltete zweifach spezifische MAP-Kinase-Kinase (MAPKK). Die Phosphorylierung beider Reste ist essentiell für die Weiterleitung des Signals. Den MAP-Kinasen wird eine bedeutende Rolle für die Diversifizierung der Signalübertragung zugeschrieben. Eine zentrale Funktion der MAP-Kinase-Kaskade

besteht in der Regulation und Aktivierung der Genexpression, die durch Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren, wie etwa Elk-1 vermittelt wird (Übersichtsartikel: Blenis, 1993; Seger & Krebs, 1995).

Wegen dieser grundlegenden Bedeutung der MAP-Kinase wurde der Einfluß der verschiedenen Insuline auf die Aktivierung der beiden Isoformen dieses Proteins, ERK1 und ERK2, mit Hilfe phosphospezifischer Antiseren analysiert. Dazu wurden K6-Myoblasten für 10 min mit 500 nmol/l der verschiedenen Peptidhormone bei 37°C inkubiert. Lysate basaler und insulinstimulierter Zellen wurden anschließend in einer Immunoblotanalyse mit einem Antiserum detektiert, welches die p44-(ERK1) und p42-(ERK2) Isoformen der MAP-Kinase nur in ihrer phosphorylierten Form erkennt. Desweiteren wurde nach Strippen der Blotmembranen und erneuter Immunodetektion mit einem Antiserum, das die MAP-Kinase unabhängig vom Phosphorylierungszustand erkennt, die Expression der beiden Kinase-Isoformen in dem vorliegenden Zellsystem untersucht. Das Ergebnis einer solchen Untersuchung ist in Abb. 8 wiedergegeben. Es konnte das Vorkommen beider MAP-Kinase Isoformen in den K6-Zellen nachgewiesen werden, wobei die Expression der ERK2 (42 kDa) hierbei dominierte (siehe Abb. 8B). Beide Isoformen wurden nach Insulin-Behandlung aktiviert, jedoch war der stimulierende Effekt der Peptide auf die stärker exprimierte ERK2 deutlich höher. Wie aus der Abb. 8A zu entnehmen ist, produzierten die Analoga 1153 und AspB10 die stärkste MAP-Kinase Aktivierung, sowohl für ERK1 als auch für ERK2, während Humaninsulin in seiner Wirkung deutlich schwächer war. Das Analogon 1964 übte den geringsten Effekt auf die Phosphorylierung der ERK Proteine aus und ließ sich dadurch von der Wirkung der restlichen Insuline signifikant unterscheiden.

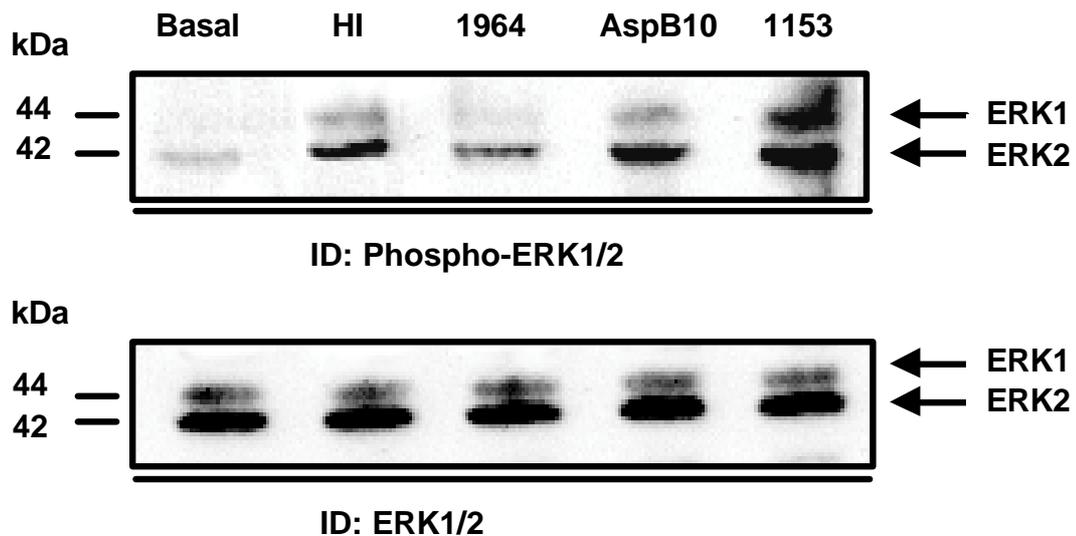


Abb.8.: Aktivierung der p44/p42 MAP-Kinase durch Humaninsulin bzw. Analoga in K6-Myoblasten. Lysate (je 20 µg Protein) basaler und mit den verschiedenen Hormonpeptiden stimulierter (500 nmol/l, 10 min) K6-Myoblasten wurden in einem 8-18%igen SDS-Gel aufgetrennt, auf PVDF-Filter übertragen und mit einem phosphospezifischen anti-MAPK Antiserum (A) bzw. nach Strippen der Blotmembran mit einem anti-p44/42-MAPK Antiserum (B) immunodetektiert (ID). Die Proteinsignale konnten anschließend durch ECL mit Hilfe eines Lumi-Imager Analysesystems visualisiert werden. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse aus 4 separaten Experimenten.

Wie die Quantifizierung der p44- und p42-Signale in Abb. 9 veranschaulicht, ergab sich in Bezug auf den Basalzustand nach Stimulation mit dem Analogon 1153 im Mittel die stärkste MAP-Kinase Aktivierung (7,5 bzw. 5,5 fach) während AspB10-Insulin eine mittlere 3 bzw. 4 fache Stimulation der beiden Isoformen bewirkte. Bei HMR 1964 ließ sich eine etwa 1,4 fache Aktivierung der ERK Proteine beobachten, die signifikant schwächer war als die durch Humaninsulin induzierte Steigerung der Phosphotyrosinsignale (2,5 fach). Die in Abb. 8 und 9 präsentierten Daten zeigen, daß die Analoga 1153 und AspB10 die mitogene MAP-Kinase Signalkaskade signifikant stärker ansteuern als das native Humaninsulin und HMR 1964.

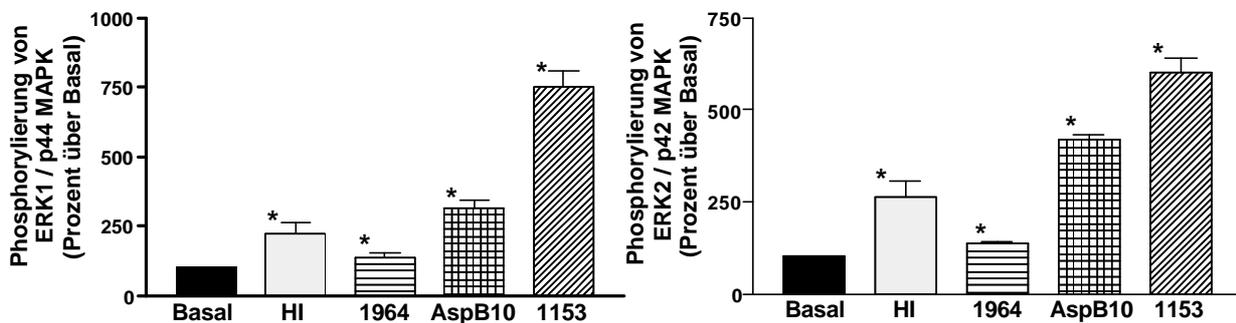


Abb.9.: Quantifizierung der Humaninsulin- bzw. Insulinanaloga-induzierten Phosphorylierung der p44/42 MAPK-Isoformen. Die ERK1/2 (p44/42)-Isoformen der MAP-Kinase wurden in ihrer phosphorylierten Form, wie in Abb. 8 beschrieben, immunodetektiert. Anschließend erfolgte die Quantifizierung des Phosphorylierungsgrades der ERK Proteine mittels der LUMI Imager Software. Die gezeigten Daten sind in prozentualer Relation zum Basalzustand angegeben und stellen die Mittelwerte \pm S.E.M. aus 4 unabhängigen Experimenten dar. *Signifikant verschieden von der basalen Kontrollgruppe und allen anderen Situationen mit Minimum $p < 0,05$.

Der Befund, daß die Analoga 1964 und AspB10 trotz gleicher Aktivierung des IGF-I Rezeptors, die sich in der Auslösung einer gleich starken Autophosphorylierung äußerte, ein so divergentes Signalmuster auf der Ebene der MAP-Kinase aufwiesen, erschien zunächst überraschend und führte zu der Annahme, daß die durch diese Insuline am IGF-I Rezeptor ausgelösten Signale über zwischengeschaltete Substrate dieser Kaskade amplifiziert werden.

Es ergab sich somit die Frage, auf welcher Postrezeptorstufe der Signalübertragung die Diversifizierung der durch die verschiedenen Peptidhormone ausgelösten Signale erfolgt. Aus diesem Grund wurde im Folgenden die durch die Insulinanaloga induzierte Signaltransduktion weiter oberhalb auf der Ebene der Tyrosinphosphorylierung spezifischer Proteine analysiert.

3.2.2. Untersuchungen zur Wirkung von Insulinanaloga auf das Adapterprotein Shc

Die Signalauslösung über den Insulin- bzw. IGF-I-Rezeptor involviert initial die Tyrosinphosphorylierung spezifischer Proteine (IRS, Shc, Grb) durch ihre aktivierte Tyrosinkinase. Für die Vermittlung der biologischen Effekte des Insulins ist, neben den IRS Proteinen, die Wechselwirkung des Insulin- bzw. IGF-I-Rezeptors mit dem Adapterprotein Shc von zentraler Bedeutung. Das Shc Protein (src-homologes Kollagen Protein) verfügt über spezielle Protein-Protein-Interaktionsdomänen, über die seine Assoziation mit den Rezeptoren und die daraus resultierende rezeptorvermittelte Tyrosinphosphorylierung ermöglicht wird, analog zu den IRS Proteinen. Das dadurch aktivierte Substratprotein Shc tritt dann über seine Phosphotyrosinreste mit einem weiteren Effektormolekül, das Grb2 Protein, in Wechselwirkung, wodurch der Ras/MAP-Kinase-Signalweg stimuliert wird (Pelicci et al., 1992; Kovacina & Roth, 1993, Skolnik et al., 1993).

Es wurde daher der Einfluß der verschiedenen Insulinanaloga auf die Stimulation des für die Vermittlung der mitogenen Aktivität zentralen Signalgebers Shc untersucht. Zunächst wurde die Ermittlung der Assoziation von Shc mit dem IGF-I Rezeptor vorgenommen. Hierfür wurden IGF-I Rezeptor Immunopräzipitate aus unbehandelten und hormonstimulierten K6-Lysaten einer Immunoblotanalyse mit einem anti-Shc Antikörper, welcher alle drei Shc Isoformen erkennt, unterzogen.

Aus dem in Abb. 10A dargestellten Blot wird ersichtlich, daß eine Kopräzipitation der drei Isoformen des Shc Proteins mit dem IGF-I Rezeptor nachgewiesen werden konnte, wobei das 66 kDa Shc Protein hierbei dominierte. Die Stimulation mit den Analoga 1153 und AspB10 führte zu der stärksten Assoziation der Shc Proteine mit dem IGF-I Rezeptor. Das Analogon 1964 und Humaninsulin ließen sich in dieser

Hinsicht nicht signifikant unterscheiden und induzierten eine viel schwächere Wechselwirkung des Rezeptors mit den Shc Proteinen.

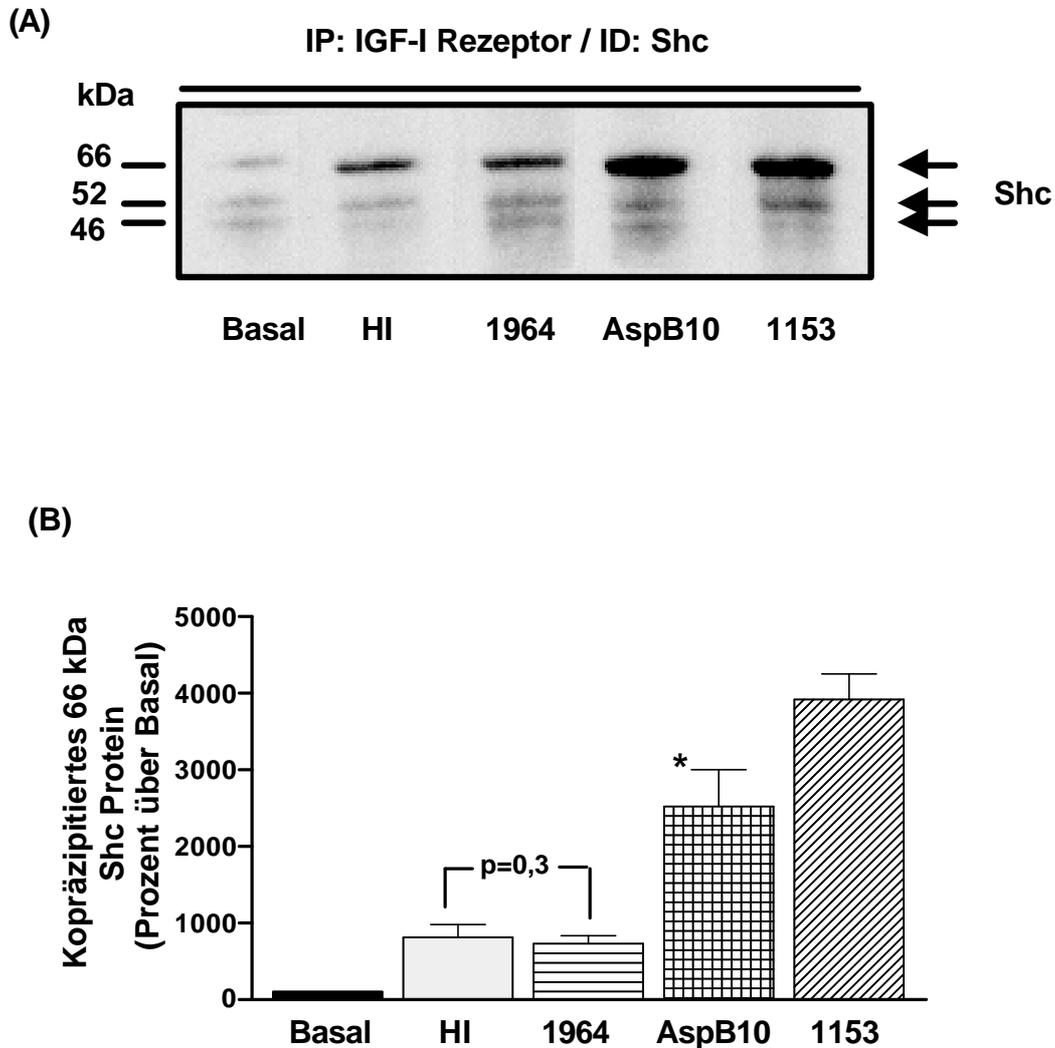


Abb.10.: Einfluß der Humaninsulin- bzw. Insulinanaloga-Stimulation auf die Assoziation der Shc Proteine mit der β -Untereinheit des aktivierten IGF-I Rezeptors in K6-Myoblasten. (A) Konfluente Myoblasten wurden mit Humaninsulin (HI) oder Insulinanaloga stimuliert, aus den jeweiligen Lysaten IGF-I Rezeptor Immunpräzipitate (IP) hergestellt und die weitere Behandlung der Immunokomplexe wie bereits in Abb. 7 beschrieben, durchgeführt, wobei die Immunodetektion (ID) der Blotmembranen mit Hilfe von anti-Shc Antikörper durch ECL erfolgte. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot. Die Molekulargewichte der drei Shc Isoformen sind auf der linken Seite angegeben. (B) Die Quantifizierung der kopräzipitierten 66 kDa Proteinbande erfolgte mit Hilfe des LUMI Imagers unter Verwendung der entsprechenden Analysesoftware. Die Signalstärken sind als prozentualer Anstieg gegenüber der Basalkontrolle angegeben und stellen die Mittelwerte \pm S.E.M. aus 3 separaten Experimenten dar. * Signifikant verschieden von allen anderen Situationen mit Minimum $p < 0,05$.

Die Quantifizierung der kopräzipitierten Shc-Signale wurde nur bei der hier dominant vorkommenden 66 kDa-Isoform durchgeführt (siehe Abb. 10B). Sie ergab in den Immunpräzipitaten aus mit 1153 bzw. AspB10-Insulin stimulierten Zellen eine gegenüber dem Basalzustand um 40% bzw. 25% gesteigerte Assoziation von Shc mit dem IGF-I Rezeptor. Bei den mit Humaninsulin und 1964 behandelten Zellen konnte jedoch nur eine 8%ige Steigerung der kopräzipitierten Shc-Menge, im Vergleich zu den Kontrollpräzipitaten beobachtet werden.

Bei dieser Untersuchung war die Maßgabe einer vollständigen und gleichmäßigen Präzipitation sowohl des IGF-I Rezeptors als auch der Shc Proteine in den verschiedenartig behandelten Lysaten eine wesentliche Voraussetzung. Um diese Ergebnisse weiter zu erhärten und die Zuverlässigkeit der erhaltenen Daten zu prüfen, wurde als nächstes der Einfluß der Insulinstimulation auf die Tyrosinphosphorylierung von Shc untersucht.

Zu diesem Zweck wurden die Shc Proteine nach 10 minütiger Stimulation mit den Hormonen und Inkubation der K6-Zelllysate mit anti-Shc Antikörper, der alle drei Isoformen des Proteins erkennt, immunpräzipitiert. Im Anschluß an die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte der Phosphotyrosinnachweis durch Immunoblotting mit Anti-Phosphotyrosin Antiserum. Die Menge der präzipitierten Proteine wurde durch Strippen der Blotmembranen und erneuter Immunodetektion mit anti-Shc Antikörper überprüft.

Wie Abb. 11B verdeutlicht, konnten durch Immunodetektion mit dem polyklonalen anti-Shc Antiserum in den Shc Präzipitaten aus K6-Myoblasten zwei Isoformen als prominente Banden im Bereich von 66 und 52 kDa identifiziert werden. Weiterhin beweist der abgebildete Blot, der als Kontrolle der Präzipitation diente, daß sich vergleichbare Shc-Mengen aus den Lysaten basaler und insulinstimulierter Zellen immunadsorbieren ließen. Die Daten in Abb. 11A zeigen, daß die Analoga 1153 und

AspB10 die stärkste Shc Phosphorylierung induzierten, wohingegen das Analogon 1964 sich wie Humaninsulin verhielt und eine viel schwächere Shc Aktivierung bewirkte.

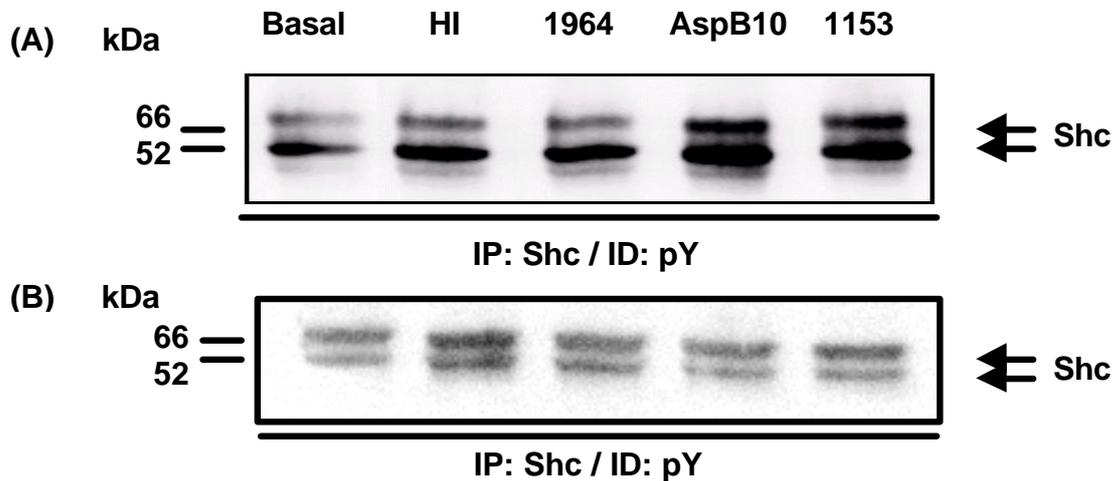


Abb.11.: Tyrosinphosphorylierung der Shc Proteine nach Stimulation mit Humaninsulin bzw. Insulinanaloga in K6-Myoblasten. Die konfluenten Myoblasten (3×10^6 Zellen/Schale) wurden mit den einzelnen Hormonpeptiden (Endkonzentration: 500 nmol/l) für 10 min stimuliert und die Shc Proteine, gemäß den Angaben im Methodenteil, aus den Solubilisaten immunadsorbiert (IP). Im Anschluß an die gelelektrophoretische Auftrennung (8-18%iges Gel) und den Transfer der präzipitierten Proteine auf Nitrocellulosefilter erfolgte die Immunodetektion (ID) mit Anti-Phosphotyrosin (pY) Antiserum **(A)** bzw. nach erfolgtem Strippen der Blotmembranen mit dem polyklonalen anti-Shc Antiserum **(B)** und ECL-Methode. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus 5 verschiedenen Versuchen. Die Molekulargewichte der präzipitierten Isoformen (66/52 kDa) von Shc sind auf der linken Seite angezeigt.

Die Quantifizierung der Phosphotyrosinsignale ist in Abb. 12 dargestellt. Nach der Stimulation mit dem Analogon 1153 bzw. AspB10 ergab sich gegenüber dem Basalzustand im Mittel eine etwa 7,1 fache bzw. 4,5 fache Steigerung der Tyrosinphosphorylierung beider Shc Isoformen. Humaninsulin und das Analogon 1964 zeigten keine signifikante Unterschiede und bewirkten durchschnittlich eine 2,3 bzw. 2,5 fache Zunahme der Shc-Phosphotyrosinsignale.

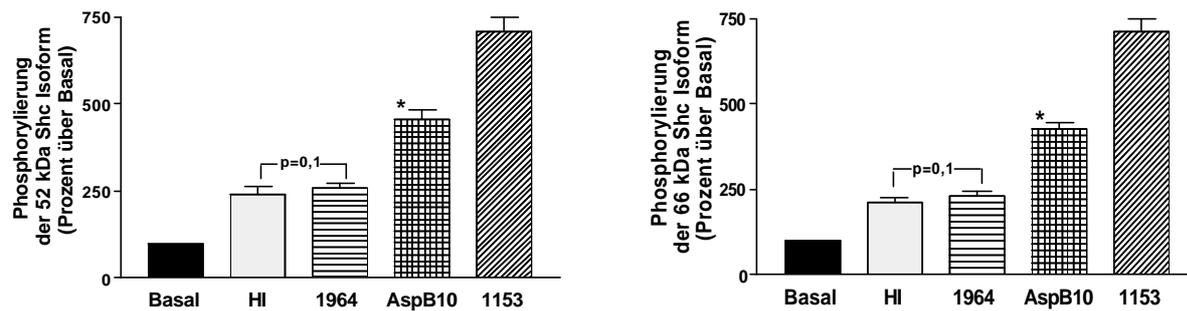


Abb.12.: Quantifizierung der Insulin- bzw. Insulinanaloga-induzierten Tyrosinphosphorylierung der 66 und 52 kDa Shc Proteine. Die aus K6-Lysaten präzipitierten 66/52 kDa Shc Isoformen wurden, wie in Abb. 11 beschrieben, immunodetektiert und die erhaltenen Phosphotyrosinsignale anschließend mit Hilfe des LUMI Imager Analysesystems quantifiziert. Die Signalstärken sind in relativen Einheiten angegeben, wobei der Basalzustand als 100 gesetzt wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. aus 5 separat durchgeführten Experimenten.

* Signifikant verschieden von allen anderen Situationen mit Minimum $p < 0,05$

Diese Ergebnisse stehen in völliger Übereinstimmung mit den erhaltenen Daten aus der Untersuchung der Assoziation von Shc mit dem IGF-I Rezeptor. Nach diesen Daten erfolgt eine deutliche Differenzierung der Insulinsignale auf der Ebene der Aktivierung von Shc, das hauptsächlich die wachstumsfördernden und mitogenen Aktivitäten des Hormons reguliert. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Analoga 1153 und AspB10 über eine prominente Wechselwirkung von Shc mit dem IGF-I Rezeptor, die Tyrosinphosphorylierung von Shc stark stimulieren und somit die Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade erheblich ansteuern. Demgegenüber wird nach Stimulation mit HMR1964 und Humaninsulin eine signifikant schwächere Aktivierung des mitogenen MAP-Kinase-Signalweges erzielt, offensichtlich bedingt durch die schwache Stimulation der Interaktion des Adapterproteins Shc mit dem IGF-I Rezeptor und seine daraus resultierende geringe Aktivierung.

Dies führte zu der Annahme, daß das Analogon 1964 und Humaninsulin möglicherweise andere Signalwege stärker ansteuern, die über die Interaktion des Insulin bzw. IGF-I-Rezeptors mit weiteren cytosolischen Substratproteinen aktiviert

werden. Aus diesem Grund wurde im Folgenden der Frage nach der Bedeutung der IRS-Signalkaskade beim Wirkungsprofil der verschiedenen Insulinen auf der Ebene der Insulinrezeptorsubstrate-1 und -2 nachgegangen.

3.2.3.1. Analyse der Aktivierung des IRS-Signalweges durch Insulinanaloga in K6-Myoblasten

Es ist allgemein akzeptiert, daß der IGF-I Rezeptor neben seiner zentralen Funktion bei der Vermittlung von Wachstum, Differenzierung und Auslösung mitogener Effekte, ebenfalls an der Regulation der insulininduzierten metabolischen Aktivität beteiligt ist (White, 1997; Baudry et al., 2001). Im Gegensatz zu dem gut charakterisierten Mechanismus des mitogenen Ras/MAP-Kinase-Signalweges ist über die Regulation der IGF-I Rezeptor-vermittelten metabolischen Signalkaskaden bisher nur sehr wenig bekannt. Es wird derzeit intensiv nach der Aufklärung der molekularen Mechanismen geforscht, die zu einer differentiellen Ansteuerung mitogener und metabolischer Effekte führen, sowie nach der Beteiligung der IRS Proteine in diesem Kontext.

Die am besten charakterisierten Vertreter dieser Gruppe sind die IRS-1 und IRS-2 Proteine, die als spezifische Substrate sowohl des Insulin- als auch des IGF-I-Rezeptors identifiziert worden sind. Sie zeichnen sich durch einen hohen Grad an Sequenzhomologie aus und enthalten zudem ähnliche funktionelle und strukturelle Domänen. Dennoch weisen mehrere Untersuchungen auf funktionelle Unterschiede zwischen den beiden IRS Proteinen hin, einerseits beruhend auf ihrer unterschiedlichen zellulären Verteilung und andererseits bedingt durch ihre differentielle Interaktion mit den nachgeschalteten Effektorproteinen (Übersichtsartikel: White, 1997; Taha & Klip, 1999).

Vor diesem Hintergrund und im Hinblick auf eine weitere molekulare Abgrenzung der Wirkungsspektren der einzelnen Insulinanaloga wurden die IRS Proteine auf ihre Bedeutung bei der Signaltransduktion dieser Peptide hin untersucht. K6-Myoblasten wurden dazu zunächst 2 stündig serumfrei inkubiert (DMEM ohne FCS + 0,5% BSA) und anschließend für 10 min mit den Insulinen in einer finalen Konzentration von 500 nmol/l stimuliert. Nachfolgend wurden IRS-1 bzw. IRS-2 mit Hilfe der entsprechenden polyklonalen Antiseren (Ouwens et al., 1994; Telting et al., 2001 in press) aus Lysaten basaler und hormonbehandelter Zellen immunadsorbiert. Die Tyrosinphosphorylierung der präzipitierten Proteine konnte anschließend in einer Immunoblotanalyse mittels Anti-Phosphotyrosin Antiserum detektiert werden. Desweiteren wurden zur Kontrolle der Präzipitationseffizienz die Blotmembranen gestrippt und nach erneuter Immunodetektion mit den jeweiligen spezifischen Antiseren (Lamphere & Lienhard, 1992; Sun et al., 1995) auf die präzipitierte Proteinmenge überprüft.

Wie das repräsentative Versuchsergebnis in Abb. 13B und D zeigt, konnte unter den vorgegebenen Bedingungen und mit den zur Verfügung stehenden spezifischen Antiseren eine reproduzierbare, gleichmäßige Immunpräzipitation der beiden IRS Proteine aus den Lysaten basaler und insulinstimulierter K6-Zellen gewährleistet werden. Aus den in Abb. 13A und C dargestellten Blots ist leicht zu erkennen, daß die Stimulation mit Humaninsulin die stärkste Steigerung sowohl der IRS-1 als auch der IRS-2 Tyrosinphosphorylierung bewirkte, während die Analoga AspB10 und 1153 eine schwächere Stimulation beider IRS Proteine erzeugten. Sehr auffällig war dabei, daß das Analogon 1964 fast keinen Einfluß auf die Aktivierung von IRS-1 hatte, während es eine prominente, mit Humaninsulin vergleichbare IRS-2 Phosphorylierung hervorrief.

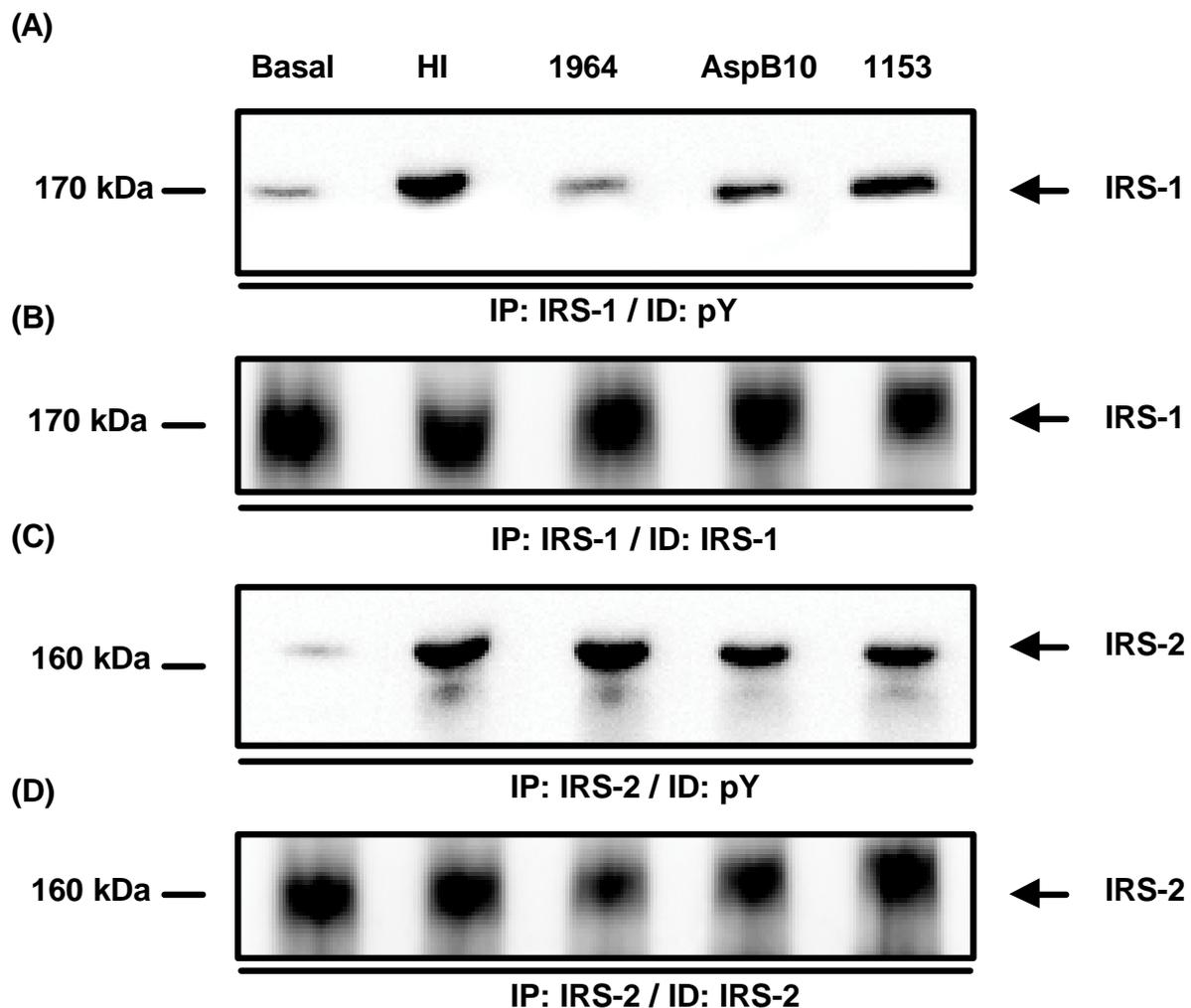


Abb.13.: Einfluß von Humaninsulin bzw. Insulinanaloga auf die Tyrosinphosphorylierung der IRS Proteine in K6-Myoblasten. IRS-1/2 Immunpräzipitate (IP) aus den Solubilisaten (je 1 mg Protein) unbehandelter und hormonstimulierter (500 nmol/l, 10 min) Zellen wurden durch SDS-Page (8-18%iges Gel) aufgetrennt und anschließend auf PVDF-Filter transferiert. Die Immunodetektion (ID) erfolgte mit Hilfe eines an Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Anti-Phosphotyrosin (pY) Antiserums (A,C) bzw. nach Strippen der Blotmembranen mit anti-IRS-1 (B) oder anti-IRS-2 (D) Antiserum und ECL-System. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse aus jeweils 3-4 unabhängigen Experimenten.

Aus der in Abb. 14 dargestellten Quantifizierung der Phosphotyrosinsignale ergab sich eine mittlere 35 fache IRS-1 und eine 22 fache IRS-2 Stimulation nach Behandlung der Zellen mit Humaninsulin im Vergleich zu den Kontrollzellen. In den IRS-1/2 Immunpräzipitaten aus mit den Analoga AspB10 und 1153 stimulierten

Zellen ließ sich eine deutlich schwächere Zunahme des Phosphotyrosinsignals nachweisen, verglichen mit der Wirkung durch Humaninsulin. Das Analogon 1964 wies nur einen marginalen ca. 2 fachen Effekt auf das IRS-1 Signal auf, es induzierte jedoch eine ca. 20 fache Steigerung der IRS-2 Tyrosinphosphorylierung und ließ sich somit in dieser Hinsicht von Humaninsulin nicht signifikant unterscheiden.

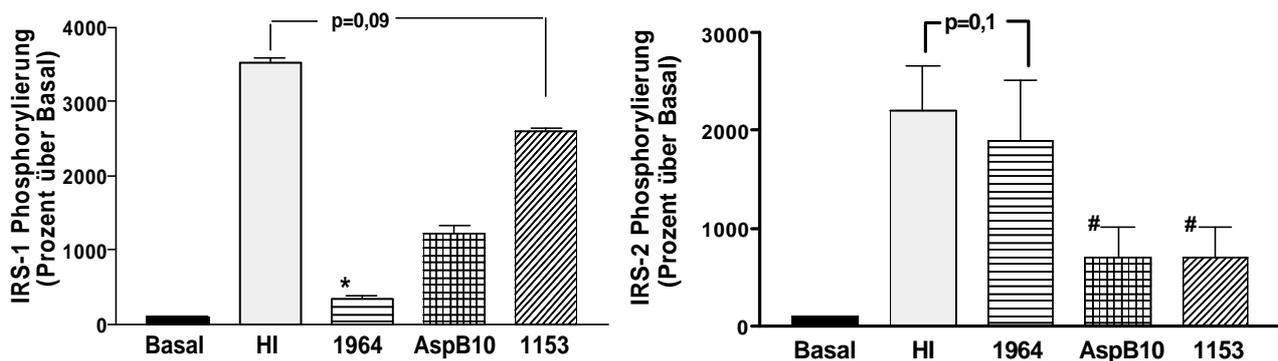


Abb.14.: Quantifizierung der Insulinpeptide-vermittelten Tyrosinphosphorylierung der IRS-1/2 Proteine in K6-Myoblasten. Die Stimulation der K6-Myoblasten mit den einzelnen Peptiden und die anschließende Immunopräzipitation von IRS-1 und IRS-2 aus den jeweiligen Lysaten erfolgte, wie bereits in Abb. 13 erläutert. Die bei der Immunoblotanalyse mittels Anti-Phosphotyrosin Antiserum detektierten IRS-1/2 Signale wurden mit Hilfe der LUMI Imager Software quantifiziert. Die gezeigten Daten sind als prozentualer Anstieg des Phosphorylierungsgrades über die Basalkontrolle dargestellt und repräsentieren Mittelwerte \pm S.E.M. aus 3-4 separaten Experimenten. *Signifikant verschieden von den Signalstärken der basalen und allen anderen stimulierten Situationen mit $p < 0,05$; #Signifikant verschieden von Humaninsulin und 1964 mit $p < 0,05$.

Durch diese Studien konnte eine weitere Differenzierung der durch die einzelne Insuline induzierten molekularen Wirkungsspektren demonstriert werden. Zusammenfassend weisen die erhaltenen Daten darauf hin, daß die beobachtete Divergenz der durch die verschiedenen Insuline hervorgerufenen Signalmuster zusätzlich auf die Auslösung einer differentiellen Interaktion des Insulin- bzw. IGF-I-Rezeptors mit den nachgeschalteten Signalgebern zurückgeführt werden kann. Insbesondere der überraschende Befund der deutlich bevorzugten

Signalweiterleitung durch das IRS-2 Protein beim Analogon 1964 unterstreicht die Annahme einer sehr spezifischen Signalauslösung auf der initialen Rezeptorebene durch die einzelne Hormonpeptide. Demnach war es von großem Interesse, die Übertragbarkeit dieser Beobachtungen auf ein anderes Zellsystem zu überprüfen.

3.2.3.2. Untersuchung der Effekte von Insulinanaloga auf die Aktivierung der IRS-Signalkaskade in adulten Kardiomyozyten der Ratte

Zur Verifizierung der unter 3.2.3.1. aufgestellten Hypothese und zur Aufklärung der Frage, ob sich die beim K6-Zellsystem erhaltenen Befunde bezüglich der differentiellen, spezifischen Aktivierung des IRS-Signalweges durch die einzelnen Insuline auch in anderen Zellsystemen nachweisen lassen, wurden adulte Kardiomyozyten verwendet. Diese primären, insulinsensitiven Muskelzellen stellen ein geeignetes Modell für Untersuchungen an isolierten Herzzellen dar, das in unserer Arbeitsgruppe entwickelt, weitestgehend charakterisiert und für Studien zur Insulinwirkung etabliert wurde (Eckel & Reinauer, 1985; Till et al., 2000; Kessler et al., 2001). Entscheidender Vorteil ist die Gewinnung einer homogenen Zellsuspension, die im wesentlichen frei von Fremdzellen ist und in der die Herzzellen keinen neuronalen oder hormonellen Einflüssen unterliegen. Ausdifferenzierte Myozyten zeichnen sich durch den Besitz eines sehr hohen Anteils an Insulinrezeptoren aus, während sie deutlich weniger IGF-I Rezeptoren exprimieren und sich so wesentlich von Myoblasten unterscheiden.

In Analogie zu den am K6-Zellsystem durchgeführten Untersuchungen wurden die frisch isolierten Kardiomyozyten unmittelbar nach der Präparation einer Inkubation mit den Insulinen in einer Endkonzentration von 500 nmol/l für 10 min unterworfen. Nachfolgend wurden IRS-1 bzw. IRS-2 Immunpräzipitate aus den Solubilisaten basaler und hormonbehandelter Kardiomyozyten hergestellt und diese in einer

anschließenden Immunoblotanalyse mit Hilfe eines Anti-Phosphotyrosin Antiserums auf ihren Phosphorylierungsgrad hin untersucht. Eine weitere Immunodetektion der vorher gestrippten Blotmembranen mit den entsprechenden spezifischen Antiseren sollte zur Präzipitationskontrolle dienen.

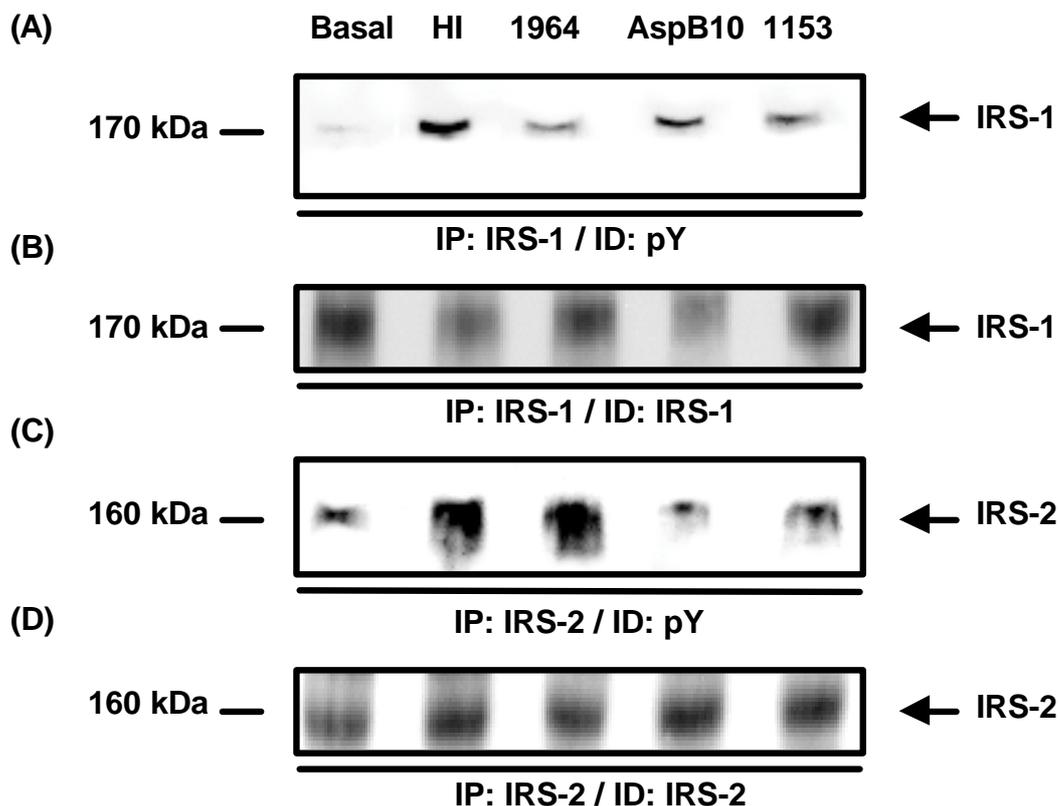


Abb.15.: Tyrosinphosphorylierung der IRS Proteine nach Stimulation mit Humaninsulin bzw. Insulinanaloge in adulten Kardiomyozyten der Ratte. Frisch isolierte Kardiomyozyten (4×10^5 Zellen) wurden für 10 min mit 500 nmol/l der einzelnen Hormonpeptide stimuliert, und anschließend in RIPA-Puffer lysiert. Die weitere Versuchsdurchführung der Immunopräzipitation (IP) von IRS-1 und IRS-2 aus den Solubilisaten und Immunodetektion (ID) der jeweiligen Phosphotyrosinsignale (A,C) bzw. Redetektion der gestrippten Blotmembranen auf die präzipitierte IRS Proteinmenge (B,D) erfolgte analog zu der im K6-Zellsystem durchgeführten Methode, die bereits in Abb. 13 beschrieben wurde. Dargestellt sind repräsentative Western Blots aus jeweils 4 verschiedenen Versuchen.

Die dargestellten Untersuchungsergebnisse stimmen mit den am K6-Zellsystem erhaltenen Beobachtungen sehr gut überein (siehe Abb. 15 und Abb. 13). So konnte auch in adulten Kardiomyozyten die stärkste IRS-1 und IRS-2 Tyrosinphospho-

rylierung nach Stimulation mit Humaninsulin erzielt werden, während die für AspB10 und 1153 beobachteten Effekte auf beide IRS-Signale deutlich schwächer waren. Schließlich ließ sich durch das Analogon 1964 nur ein marginaler Einfluß auf die Aktivierung von IRS-1 nachweisen, während es eine starke, mit Humaninsulin vergleichbare Wirkung auf die Tyrosinphosphorylierung von IRS-2 aufwies.

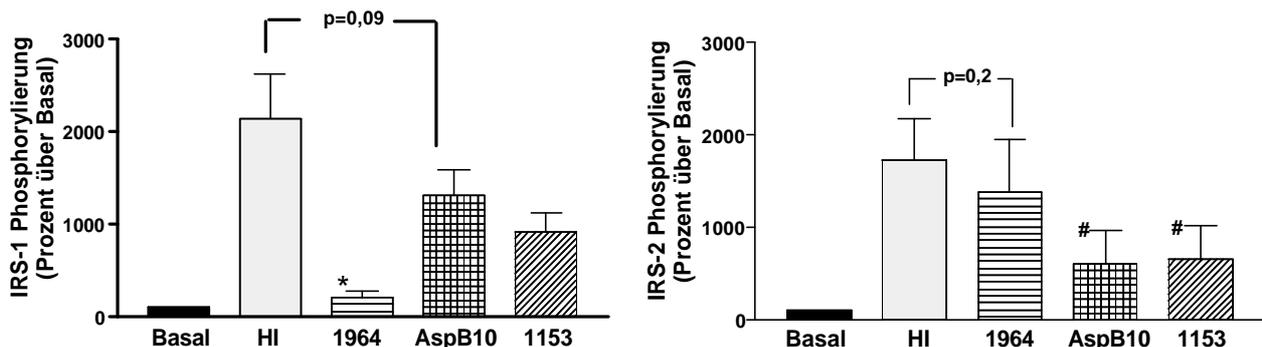


Abb.16.: Quantifizierung der durch die einzelnen Insulinpeptide induzierten Steigerung der IRS-1/2 Phosphotyrosinsignale in adulten Kardiomyozyten. Die nach einer Immunoblotanalyse mit Anti-Phosphotyrosin Antiserum in den IRS-1/2 Immunpräzipitaten basaler und hormonbehandelter Kardiomyozyten detektierten Signale wurden mit Hilfe des LUMI Imagers unter Verwendung der zugehörigen Software quantifiziert. Die ermittelten Insulineffekte sind als prozentuales Verhältnis bezogen auf den Basalzustand dargestellt. Die gezeigten Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm S.E.M. aus jeweils 4 unabhängigen Experimenten. *Signifikant verschieden von der basalen Situation sowie von allen anderen Insulinstimuli mit $p < 0,05$; #Signifikant verschieden von Humaninsulin und 1964 mit $p < 0,05$.

Die Quantifizierung der in den IRS-1 bzw. IRS-2 Immunpräzipitaten detektierten Phosphotyrosinsignale ist in Abb. 16 wiedergegeben. Die Tyrosinphosphorylierung von IRS-1 und IRS-2 wurde durch die Stimulation mit Humaninsulin im Mittel gleich stark um das 20 fache gesteigert, im Vergleich zu den Kontrollproben. Die Analoga AspB10 und 1153 induzierten hingegen nur eine schwache Aktivierung beider IRS Proteine im Vergleich zum nativen Insulin. In den IRS-1 Präzipitaten mit HMR1964 behandelten Zellen konnte nur ein marginaler 3 facher Effekt nachgewiesen werden,

jedoch bewirkte dieses Analogon einen 18 fachen und somit von Humaninsulin nicht signifikant unterscheidbaren Anstieg der IRS-2 Tyrosinphosphorylierung.

Durch Vergleich der Abb. 13 und 16 wird deutlich, daß die in den beiden Zellsystemen erhaltenen Daten in guter Korrelation zueinander stehen. Die hier an primären Muskelzellen erzielten Resultate bestätigen somit die bei den K6-Myoblasten gemachte Beobachtungen hinsichtlich der Aktivierung der IRS-Signalkaskade durch die einzelnen Peptide und stützen zugleich die These, daß modifizierte Insuline offensichtlich aufgrund ihres strukturellen Unterschiedes eine spezifische Signalauslösung am IGF-I- bzw. am Insulinrezeptor initiieren, die zu einer differentiellen Wechselwirkung mit den nachgeschalteten Zielproteinen und einer dadurch bedingten selektiven Weiterleitung des Signals führt. Desweiteren weisen die hier vorgestellten Befunde auf eine Beteiligung sowohl des IGF-I- als auch des Insulinrezeptors an der Vermittlung der Wirkungsspektren dieser Analoga hin.

Vor allem unter Berücksichtigung der Tatsache, daß Myoblasten auch einen geringen Anteil an Insulinrezeptoren exprimieren, ist die Möglichkeit einer Überlappung der Wirkung der beiden Rezeptoren an der Regulation der hier untersuchten Wirkungsmechanismen nicht auszuschließen. Daher war es von zentraler Bedeutung, die Wirkung der einzelnen Insulinanaloga über den Insulin- bzw. IGF-I-Rezeptor abzugrenzen und weiter zu charakterisieren.

3.3. Untersuchung zur molekularen Abgrenzung der Wirkung von Insulinanaloga über den Insulin- bzw. IGF-I-Rezeptor in humanen Skelettmuskellzellen

Es ist durch umfangreiche Untersuchungen in verschiedenen Zellgeweben, einschließlich unserer Studie, nachgewiesen, daß das Peptidhormon Insulin und seine Analoga sowohl den Insulin- als auch den IGF-I- Rezeptor aktivieren können. Der hier zugrunde liegende Mechanismus beruht auf einer direkten Wechselwirkung der Peptide mit den Rezeptoren, auf der Interaktion mit Hybridrezeptoren oder indirekt auf der gegenseitigen Interphosphorylierung der beiden Rezeptoren (Beguinot et al., 1988; Bailyes et al., 1997). Zu den wichtigsten gemeinsamen Substraten des Insulin- und IGF-I- Rezeptors zählen unter anderem die Proteine IRS-1 und IRS-2, die im Anschluß einer Aktivierung der Rezeptortyrosinkinasen über eine direkte Wechselwirkung mit den Rezeptoren in bestimmten Regionen des carboxyterminalen Anteils tyrosinphosphoryliert werden und durch diese Aktivierung die Weiterleitung des Signals ermöglichen (White, 1997). Das individuelle Ausmaß der Aktivierung der beiden Rezeptoren durch die einzelnen Insulinanaloga sowie die in diesem Kontext involvierte Beteiligung der IRS Proteine ist jedoch gegenwärtig unklar.

Daher hatten die im Folgenden angelegten Untersuchungen zum Ziel, die Wirkung der verschiedenen Insuline über den Insulin- bzw. IGF-I- Rezeptor abzugrenzen und zugleich die in diesem Zusammenhang individuelle Beteiligung der IRS-1 und IRS-2 Signalträger, durch Inhibition der Insulinbindung und Ermittlung der daraus resultierenden Auswirkung auf der Ebene der IRS Proteine, aufzudecken. Hierzu standen spezifische Antikörper gegen die α -Untereinheiten des menschlichen Insulin- bzw. IGF-I-Rezeptors zur Verfügung (Prof. Siddle, Cambridge). Aus diesem Grund wurden für die hier dargestellten Studien menschliche Myoblasten der

Skelettmuskulatur verwendet, die zudem einen hohen Expressionsgrad an IRS-1 und IRS-2 aufweisen. Diese primären insulinempfindlichen Zellen stammen aus dem Musculus rectus abdominis eines gesunden Patienten und werden zur Zeit in unserer Arbeitsgruppe intensiv untersucht und charakterisiert (Fleischer, 1999). Die nachfolgenden Untersuchungen wurden ausschließlich an nach der zweiten Subkultivierung erhaltenen, konfluenten Myoblasten durchgeführt (Abb. 17).

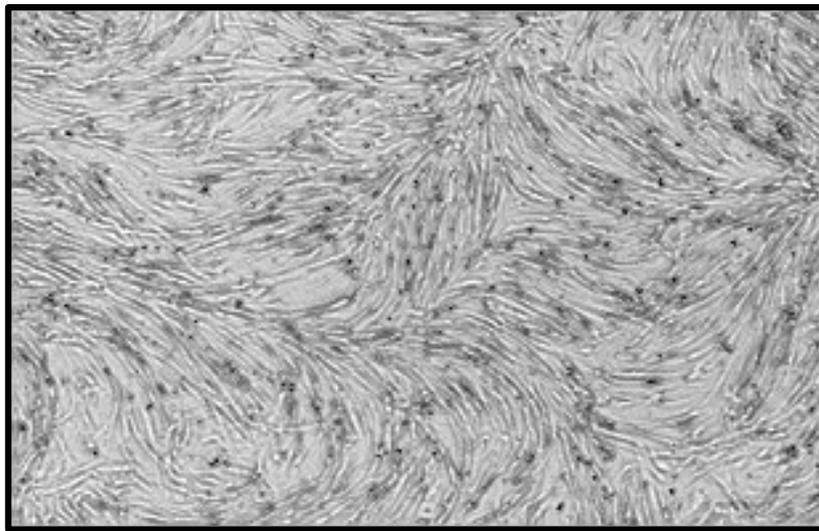


Abb.17.: Lichtmikroskopische Aufnahme von menschlichen Myoblasten aus der Skelettmuskulatur im konfluenten Zustand (Vergrößerung 40 fach).

3.3.1. Einfluß von Insulinanaloga auf die Tyrosinphosphorylierung der IRS-1/2

Proteine in menschlichen Skelettmuskelzellen

In dieser Versuchsserie wurden menschliche Myoblasten der Skelettmuskulatur in einem modifizierten Wachstumsmedium, das unter anderem Serum und Insulin enthielt, 2 Tage lang kultiviert. Nach anschließender 4 tägiger Inkubation in einem serum- und insulinfreien Medium wurden die Zellen in Analogie zu den vorherigen Studien für 10 min mit 500 nmol/l der Insuline stimuliert. Aus den Lysaten basaler und hormonbehandelter Zellen wurde IRS-1 bzw. IRS-2 mit Hilfe spezifischer

Antiseren (Ouwens et al., 1994; Telting et al., 2001) immunpräzipitiert und die Phosphorylierung in einer Immunoblotanalyse mit Anti-Phosphotyrosin Antiserum detektiert.

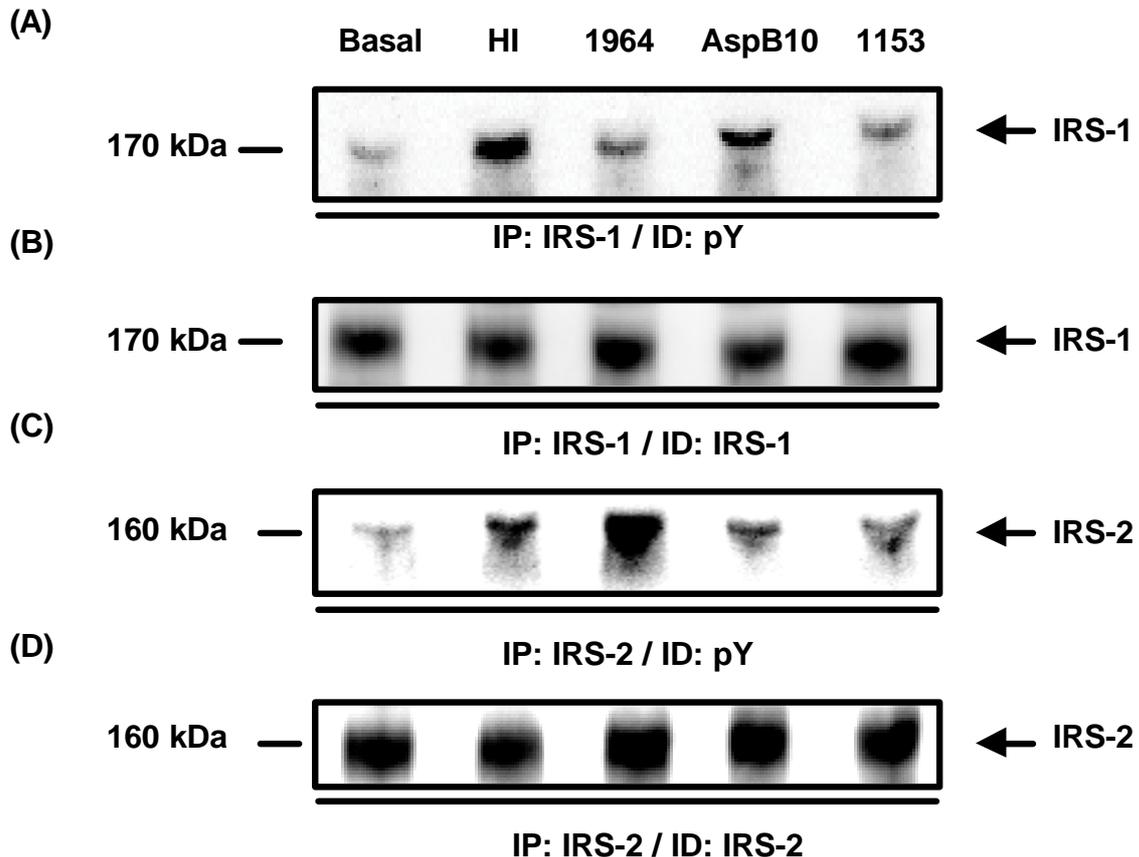


Abb.18.: Einfluß von Humaninsulin bzw. modifizierten Insulinpeptiden auf die Tyrosinphosphorylierung der IRS Proteine in proliferierenden menschlichen Skelettmuskelzellen. Myoblasten aus der Skelettmuskulatur (10^6 Zellen/Schale) wurden nach einer 4 tägigen serum- und insulinfreien Inkubation mit 500 nmol/l der verschiedenen Insulinpeptide für 10 min stimuliert. Aus den jeweiligen Zelllysaten wurden dann die IRS-1/2 Proteine immunpräzipitiert (IP) und nach einer Immunoblotanalyse mit einem Anti-Phosphotyrosin (pY) Antiserum die erhaltenen Signale detektiert (A,C) gemäß der schon in Abb.13 erläuterten Methode. Die nachfolgende Redetektion der gestrippten Blotmembranen mit anti-IRS-1/2 Antiseren (B,D) diente zur Prüfung der präzipitierten Proteinmengen. Dargestellt sind jeweils repräsentative Versuchsergebnisse.

In Abb. 18 ist der Einfluß der Insulinstimulation auf die Tyrosinphosphorylierung der präzipitierten IRS Proteine dargestellt. Die gestrippten und nachfolgend auf Proteinmenge redetektierten Blotmembranen erlauben die Aussage, daß die Präzipitation der IRS Proteine in den Solubilisaten basaler und insulinstimulierter Zellen gleichmäßig und mit hoher Effizienz verlief (Abb. 18B und D).

Die gezeigten repräsentativen Versuchsergebnisse (siehe Abb. 18A und C) machen deutlich, daß der Stimulus mit Humaninsulin und AspB10-Insulin eine prominente Steigerung der Phosphorylierung beider IRS Proteine zur Folge hatte, wohingegen das Analogon 1153 eine signifikant schwächere Zunahme der Phosphotyrosinsignale bewirkte. In völliger Übereinstimmung mit den von K6-Zellen und adulten Kardiomyozyten erhaltenen Daten, zeigte das Analogon 1964 auch in menschlichen Myoblasten fast keinen Einfluß auf die Phosphorylierung von IRS-1, während es eine starke Ansteuerung des IRS-2 Weges induzierte, die sogar in dem hier untersuchten menschlichen Zellsystem signifikant höher als die Wirkung von Humaninsulin war.

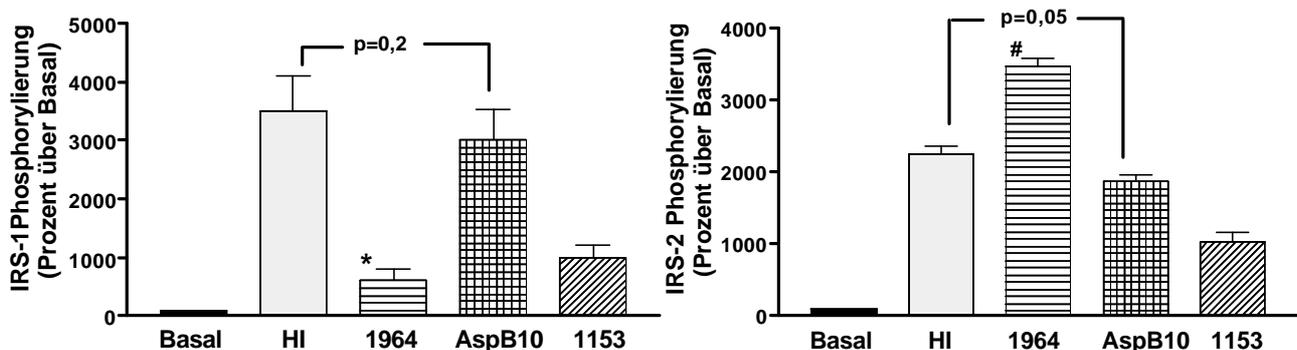


Abb.19.: Quantifizierung der durch die verschiedenen Insulinstimuli induzierten Tyrosinphosphorylierung der IRS-1/2 Proteine in menschlichen Skelettmuskelzellen. Die Phosphotyrosinsignale in den, wie bereits in Abb. 18 beschrieben, erhaltenen IRS-1/2 Immunopräzipitaten basaler und insulinstimulierter menschlicher Myoblasten wurden mit Hilfe der LUMI Imager Software quantifiziert und sind hier als prozentualer Anstieg über den Basalwert, der gleich 100 gesetzt wurde, dargestellt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. aus 4-5 separaten Experimenten. * Signifikant verschieden von Basal sowie allen anderen Insulinstimuli ($p < 0,05$); #Signifikant verschieden von Humaninsulin ($p < 0,05$).

Die Quantifizierung der detektierten Phosphotyrosinsignale (Abb. 19) ergab eine im Mittel um das 35 bzw. 30 fache gesteigerte IRS-1 und eine um das 23 bzw. 19 fache höhere IRS-2 Stimulation durch Humaninsulin und AspB10-Insulin entsprechend, im Vergleich zum Basalzustand. Die Wirkung von 1964 auf die Tyrosinphosphorylierung von IRS-1 war marginal (4 fach), jedoch übte dieses Analogon einen starken, signifikant größeren Effekt auf IRS-2 im Vergleich zu Humaninsulin aus (35 fach).

3.3.2. Hemmung der Tyrosinphosphorylierung der IRS-1/2 Proteine durch die Blockade des IGF-I- bzw. Insulinrezeptors in menschlichen Skelettmuskelzellen

Die Studien zur Wirkung der Insulinanaloge auf die Aktivierung des IRS-Signalweges in allen drei untersuchten Zellsystemen standen in guter Korrelation zueinander und wiesen auf ein deutlich divergentes Signalmuster der Hormone auf der Ebene der Tyrosinphosphorylierung von IRS-1 und IRS-2 hin. Besonders auffällig war hierbei das beobachtete Wirkungsprofil des Analogons 1964, das sich durch eine deutlich bevorzugte Ansteuerung des IRS-2 Signalweges auszeichnete und sich dadurch vom Wirkungsspektrum des nativen Humaninsulins differenzieren ließ.

Vor diesem Hintergrund und mit Hinblick auf eine weitere Abgrenzung der molekularen Wirkungsmechanismen des Humaninsulins und des modifizierten Insulins HMR1964 wurde im Folgenden der Frage nach der individuellen Beteiligung des IGF-I- bzw. Insulinrezeptors an der Vermittlung der Signaltransduktion dieser Peptide nachgegangen. Zum Vergleich wurde bei dieser Studie das gut charakterisierte AspB10-Insulin herangezogen, dessen supermitogene Wirkung neben einer erhöhten Signalauslösung am Insulinrezeptor, im wesentlichen durch

eine deutlich verstärkte Signaltransduktion über den IGF-I Rezeptor begründet wird (Hansen et al., 1996; Milazzo et al., 1997).

Zur molekularen Abgrenzung zwischen dem IGF-I- und dem Insulinrezeptor wurde bei der hier dargestellten Studie der Einfluß der Blockade der beiden Rezeptoren auf die Tyrosinphosphorylierung der IRS Proteine analysiert. Zur Inhibition der jeweiligen Rezeptoren wurden spezifische monoklonale Antikörper gegen die α -Untereinheiten der menschlichen Rezeptorformen, die keine Kreuzreaktion mit den heterologen Antigenen aufweisen (Soos et al., 1986 & 1992), eingesetzt (Prof. Siddle, Cambridge). Die beiden Antiseren wurden zunächst hinsichtlich ihrer Spezifität und Inhibitionseigenschaften getestet und charakterisiert. Zu diesem Zweck wurden IRS-1/2 Immunpräzipitate aus Lysaten basaler und mit unterschiedlichen Konzentrationen der Antiseren behandelter menschlicher Muskelzellen hergestellt und im Anschluß an die gelelektrophoretische Auftrennung und den Transfer der präzipitierten Proteine, die Blotmembranen einer Immunodetektion mit Anti-Phosphotyrosin Antiserum unterzogen. Durch eine Reihe solcher Voruntersuchungen wurden die optimalen Versuchsbedingungen ermittelt und zugleich sichergestellt, daß die blockierende Antiseren keinen Einfluß auf die basale Phosphorylierungsrate der IRS Proteine aufweisen. Auf diesem Weg wurde eine Methode etabliert, mit deren Hilfe die Rezeptoren der menschlichen Myoblasten unter Verwendung dieser hochspezifischen Antiseren effektiv blockiert und die daraus resultierenden Effekte auf die Aktivierung der IRS Proteine erfaßt werden konnten.

Analog zu den Untersuchungen der Wirkung der Insuline auf die Tyrosinphosphorylierung der IRS Proteine (3.3.1.) wurden hier menschliche Myoblasten zunächst einer 4 tägigen Inkubation in einem serum- und insulinfreien Medium unterworfen. Daraufhin wurden die Zellen mit den spezifischen Antiseren

gegen den IGF-I- bzw. Insulinrezeptor für 2 h blockiert. Im Anschluß an diese Vorbehandlung erfolgte die Stimulation mit den Insulinen in einer finalen Konzentration von 500 nmol/l für 10 min. Nachfolgend wurde IRS-1 bzw. IRS-2 aus Lysaten basaler, insulinstimulierter und mit den Antiseren vorbehandelter Zellen immunadsorbiert und anschließend die Tyrosinphosphorylierung der präzipitierten Proteine in einer Immunoblotanalyse mit Hilfe eines Anti-Phosphotyrosin Antiserums überprüft. Zur Kontrolle der Präzipitation diente eine erneute Immunodetektion der vorher gestrippten Blotmembranen mit spezifischen Antiseren gegen die immunadsorbierten Proteine.

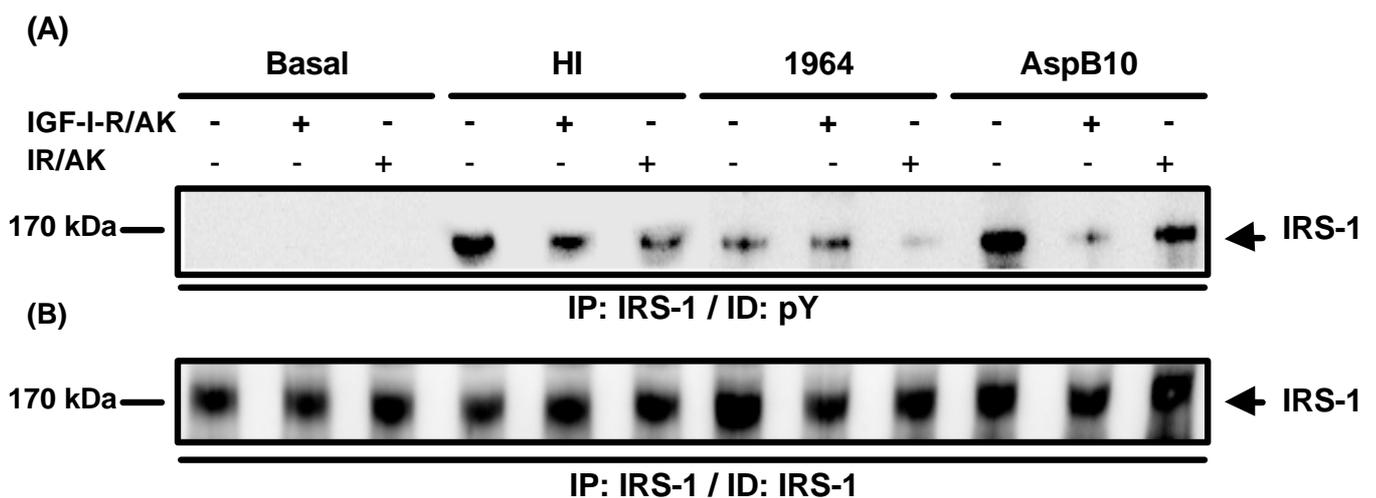


Abb.20.: Hemmung der Insulineffekte auf die Tyrosinphosphorylierung von IRS-1 durch das Blockieren des IGF-I bzw. Insulinrezeptors in menschlichen Skelettmuskelzellen. Nach einer 4 tägigen serum- und insulinfreien Inkubation wurden die menschlichen Myoblasten (10^6 Zellen/Schale) mit monoklonalen Antikörper gegen die α -Untereinheiten des menschlichen IGF-I bzw. Insulinrezeptors für 2 h blockiert, und direkt im Anschluß mit 500 nmol/l der einzelnen Hormonpeptide für 10 min stimuliert. IRS-1 Immunpräzipitate (IP) aus Lysaten vorblockierter, basaler und insulinstimulierter Zellen wurden dann einer SDS gelelektrophoretischen Auftrennung (8-18%iges Gel) unterzogen, auf PVDF-Membran transferiert und mit Hilfe von Anti-Phosphotyrosin (pY) Antiserum immunodetektiert (ID). IRS-1 Präzipitate aus Lysaten, basaler und hormonbehandelter, nicht mit den blockierenden Antikörper vorbehandelter Zellen dienten als Kontrollen (A). Die Blotmembran wurde nach dem Strippen einer erneuten Immunodetektion mit anti-IRS-1/2 Antikörper zur Präzipitationskontrolle unterzogen (B). Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment.

In Abb. 20 ist ein repräsentatives Versuchsergebnis wiedergegeben. Es wird ersichtlich, daß sich vergleichbare IRS-1 und IRS-2 Mengen aus den Solubilisaten der verschiedenartig behandelten Skelettmuskelzellen präzipitieren ließen (Abb. 20B). Aus dem in Abb. 20A dargestellten Blot ist zu entnehmen, daß die beobachtete Hemmung der Tyrosinphosphorylierung der IRS Proteine nicht auf eine Beeinflussung des basalen Phosphorylierungsgrades durch die blockierenden Antisera zurückzuführen war. Darüber hinaus ist deutlich zu erkennen, daß das Blockieren der Rezeptoren eine unterschiedliche Auswirkung auf die Phosphorylierung von IRS-1 durch die verschiedenen Insuline hatte. Beim nativen Insulin wies die Inhibition der IRS-1 Phosphorylierung eine gleich hohe Sensitivität gegenüber der Blockade der beiden Rezeptoren auf. Das Blockieren des IGF-I Rezeptors hatte hingegen bei den mit 1964 stimulierten Zellen keinen signifikanten Einfluß auf das IRS-1 Phosphotyrosinsignal, während es beim AspB10-Insulin eine sehr starke Hemmung der IRS-1 Phosphorylierung hervorrief. Das Ausschalten des Insulinrezeptors bewirkte einen genau entgegengesetzten Effekt bei den Analoga 1964 und AspB10, verglichen mit der Hemmung durch den IGF-I Rezeptor.

Wie die Quantifizierung der Daten aus solchen Experimenten in Abb. 21 veranschaulicht, wurde in den IRS-1 Präzipitaten mit Humaninsulin stimulierter Zellen die Phosphorylierung durch das Blockieren der Rezeptoren gleich stark, jeweils um 50% herabgesetzt. Bei den mit dem Analogon 1964 behandelten Zellen wurde die IRS-1 Tyrosinphosphorylierung durch das Ausschalten des Insulinrezeptors signifikant reduziert, wohingegen die Blockade des IGF-I Rezeptors hierbei keinen meßbaren Einfluß aufwies. Beim AspB10-Insulin schließlich resultierte die Hemmung des IGF-I Rezeptors in einer 50%igen Abnahme des IRS-1 Phosphotyrosinsignals, während die Inhibition des Insulinrezeptors keinen signifikanten Effekt im Vergleich zu der Kontrolle ausübte.

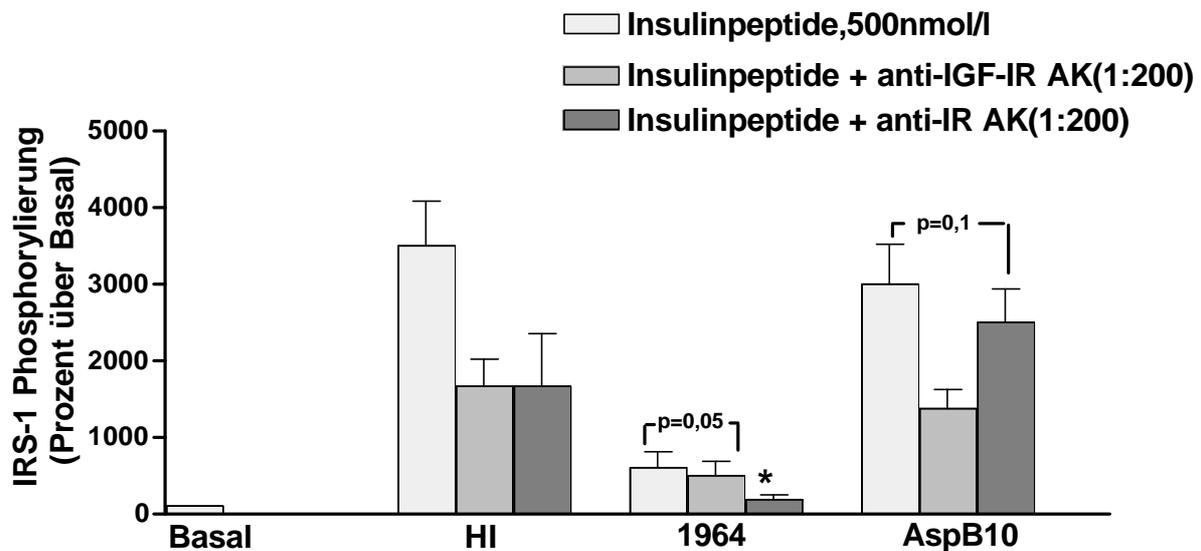


Abb.21.: Quantifizierung der Inhibitionseffekte der Blockade des IGF-I- bzw. Insulinrezeptors auf die Insulin- und Insulinanaloga-vermittelte IRS-1 Stimulation. IRS-1 Immunpräzipitate basaler und hormonstimulierter menschlicher Myoblasten, die jeweils einer vorherrigen Vorbehandlung mit anti-IGF-I Rezeptor bzw. anti-Insulinrezeptor Antikörper unterzogen waren, wurden wie in Abb. 20 beschrieben, hergestellt und immunodetektiert. Anschließend erfolgte die Quantifizierung der Signale mit Hilfe des LUMI Imager Analysesystems. Die Signalstärken sind als prozentualer Ausdruck relativ zum Basalzustand angegeben und repräsentieren Mittelwerte \pm S.E.M. aus 4 unabhängigen Versuchen. *Signifikant verschieden von der 1964-Insulinkontrolle mit $p < 0,05$.

Aus dem in Abb. 22 wiedergegebenen Western Blot ist hinsichtlich der Auswirkung der Blockade der Rezeptoren auf das IRS-2 Protein ein sehr einheitliches Bild für die einzelnen Insuline zu erkennen. Die IRS-2 Phosphorylierung wurde bei allen drei getesteten Hormonpeptiden durch die Inhibition des IGF-I Rezeptors sehr stark gehemmt, während das Ausschalten des Insulinrezeptors einen schwachen, nicht signifikanten Effekt aufwies.

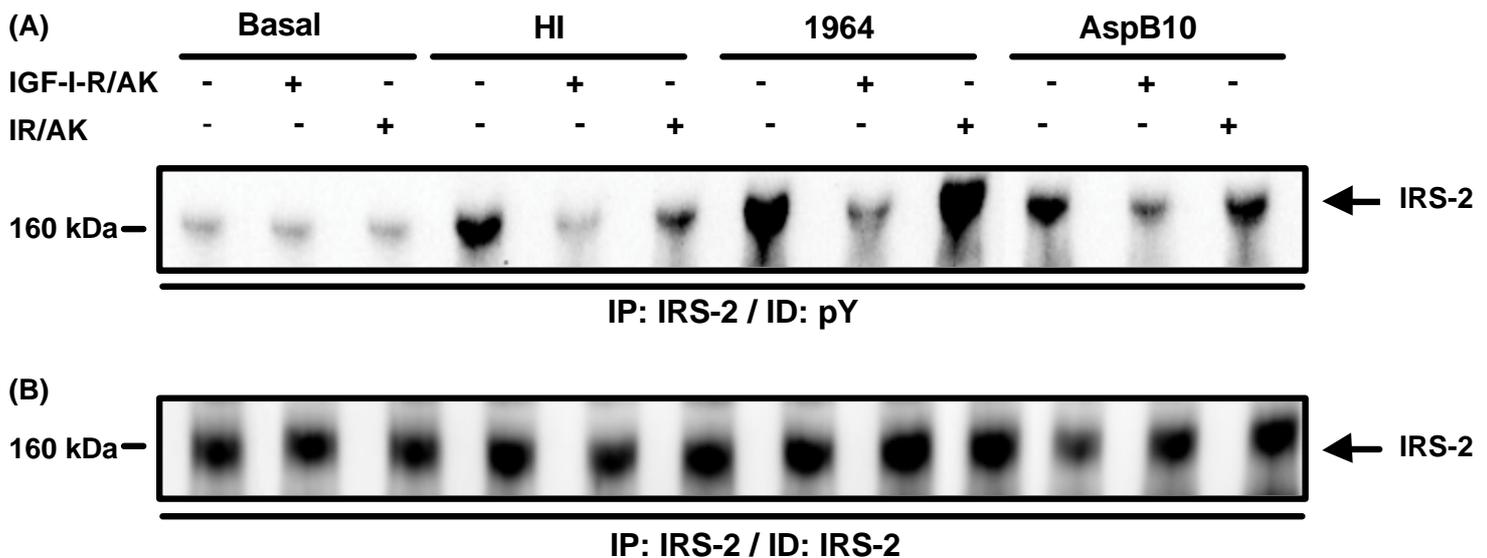


Abb.22.: Hemmung der Insulineffekte auf die IRS-2 Tyrosinphosphorylierung durch das Blockieren des IGF-I- bzw. Insulinrezeptors in menschlichen Skelettmuskelzellen. Das Blockieren des IGF-I- bzw. Insulinrezeptors und die anschließende Stimulation der menschlichen Myoblasten mit den einzelnen Insulinpeptiden erfolgte wie in Abb. 20 beschrieben. Analog hierzu wurden IRS-2 Präzipitate (IP) aus vorblockierten, basalen und hormonbehandelten Zelllysaten hergestellt und mittels Anti-Phosphotyrosin (pY) Antiserum (A) bzw. nach Strippen der Blotmembran mit anti-IRS-1/2 Antikörper (B) immunodetektiert (ID), während die entsprechenden nicht vorblockierten Präzipitate als Kontrolle dienten. Dargestellt ist ein repräsentatives Versuchsergebnis.

Die Quantifizierung der detektierten Signale (Abb. 23) ergab eine mittlere Hemmung der IRS-2 Phosphorylierung von ca. 70-80% bei allen Insulinen durch das Blockieren des IGF-I Rezeptors, während die Abnahme des Phosphotyrosinsignals durch das Ausschalten des Insulinrezeptors mit ca. 5-10% keine Signifikanz zeigte, verglichen mit den jeweiligen Kontrollen.

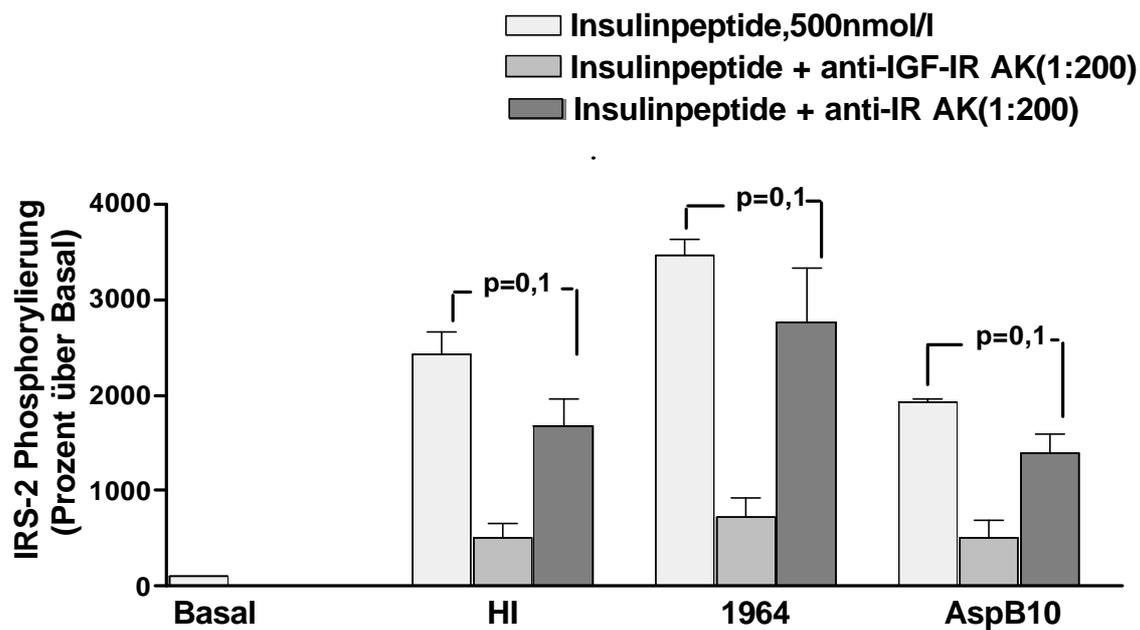


Abb.23.: Quantifizierung der Inhibitionseffekte der Blockade des IGF-I- bzw. Insulinrezeptors auf die Insulin- und Insulinanaloga-vermittelte IRS-2 Stimulation. Die Phosphotyrosinsignale in den, wie schon in Abb. 22 erläutert, erhaltenen IRS-2 Präzipitaten aus Lysaten mit den blockierenden Antikörper gegen die jeweiligen Rezeptoren vorbehandelter, basaler und insulinstimulierter menschlicher Skelettmuskelzellen wurden mittels LUMI Imager unter Verwendung der zugehörigen Analysesoftware quantifiziert. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte \pm S.E.M. aus 4 separaten Experimenten, hier als prozentualer Anstieg des Phosphotyrosinsignals über Basal ausgedrückt.

Diese Daten deuten darauf hin, daß die einzelnen Insuline ihre Wirkung sowohl über den IGF-I- als auch über den Insulinrezeptor entfalten, jedoch ist das Ausmaß der Beteiligung der beiden Rezeptoren unterschiedlich und für jedes Peptid individuell. Darüber hinaus läßt sich vermuten, daß in proliferierenden Myoblasten das IRS-1 Protein als ein gemeinsames Substrat für beide Rezeptoren agiert, während IRS-2 präferentiell über den IGF-I Rezeptor phosphoryliert wird.

3.4. Wirkung der Insulinanaloga auf die DNA-Synthese

Die bisher erzielten Befunde wiesen auf ein deutlich divergentes Signalmuster der einzelnen Insuline sowohl auf der Ebene der initialen Signalauslösung als auch auf der Stufe der Aktivierung abwärts gelegenen Signalgeber der mitogenen und metabolischen Wirkung. Es stellte sich somit die Frage, ob diese sehr deutlichen Unterschiede in der Signaltransduktion durch die modifizierten Peptide auch auf der Ebene der DNA-Synthese, die für die Regulation von Zellwachstum und Proliferation von zentraler Bedeutung ist und somit ein direktes Maß für die Mitogenese darstellt, zutreffen.

Es war also von großem Interesse den Einfluß der Insulinanaloga auf die DNA-Synthese zu erfassen und somit Erkenntnisse über die Langzeitwirkung der Peptide zu gewinnen. Zu diesem Zweck wurden K6-Myoblasten zunächst einer 30 stündigen Hungerphase (Serumentzug) unterworfen. Danach erfolgte die Stimulation mit 500 nmol/l der verschiedenen Insuline oder IGF-I bzw. 10% FCS und der gleichzeitige Einbau von Bromdesoxy-Uridin (BrdU) in die DNA über eine Phase von 16 h. Die Zellen wurden anschließend fixiert und die DNA-Synthese durch Reaktion mit einem BrdU-Antiserum und ECL-Methode erfaßt.

In Abb. 24A ist ein repräsentatives Versuchsergebnis wiedergegeben. Es ist deutlich zu erkennen, daß IGF-I und FCS die stärkste Stimulation der DNA Synthese induzierten, während die durch AspB10 und 1153 beobachteten Effekte deutlich schwächer waren. Humaninsulin und 1964 bewirkten die geringste Stimulation des BrdU-Einbaus in die DNA Synthese der K6-Myoblasten. In Abb. 24B ist die Quantifizierung der Signale derartiger Experimente dargestellt. Insgesamt wurde nur eine relativ geringe Stimulation der DNA-Synthese erreicht, selbst FCS und IGF-I induzierten nur eine 3,9 bzw 3,5 fache Aktivierung. Demzufolge waren die erzielten Effekte der Insuline auf die DNA-Synthese gering und die erwarteten Unterschiede

ließen sich vom absoluten Betrag her auf dieser Ebene nicht erfassen. Das Analogon 1964 zeigte einen 1,7 fachen Effekt auf die Aktivierung der DNA-Synthese und war somit vergleichbar mit der Wirkung von Humaninsulin (1,8 fach), während 1153 und AspB10 eine hierzu signifikant stärkere Stimulation (2,9 bzw. 2,7 fach) bewirkten.

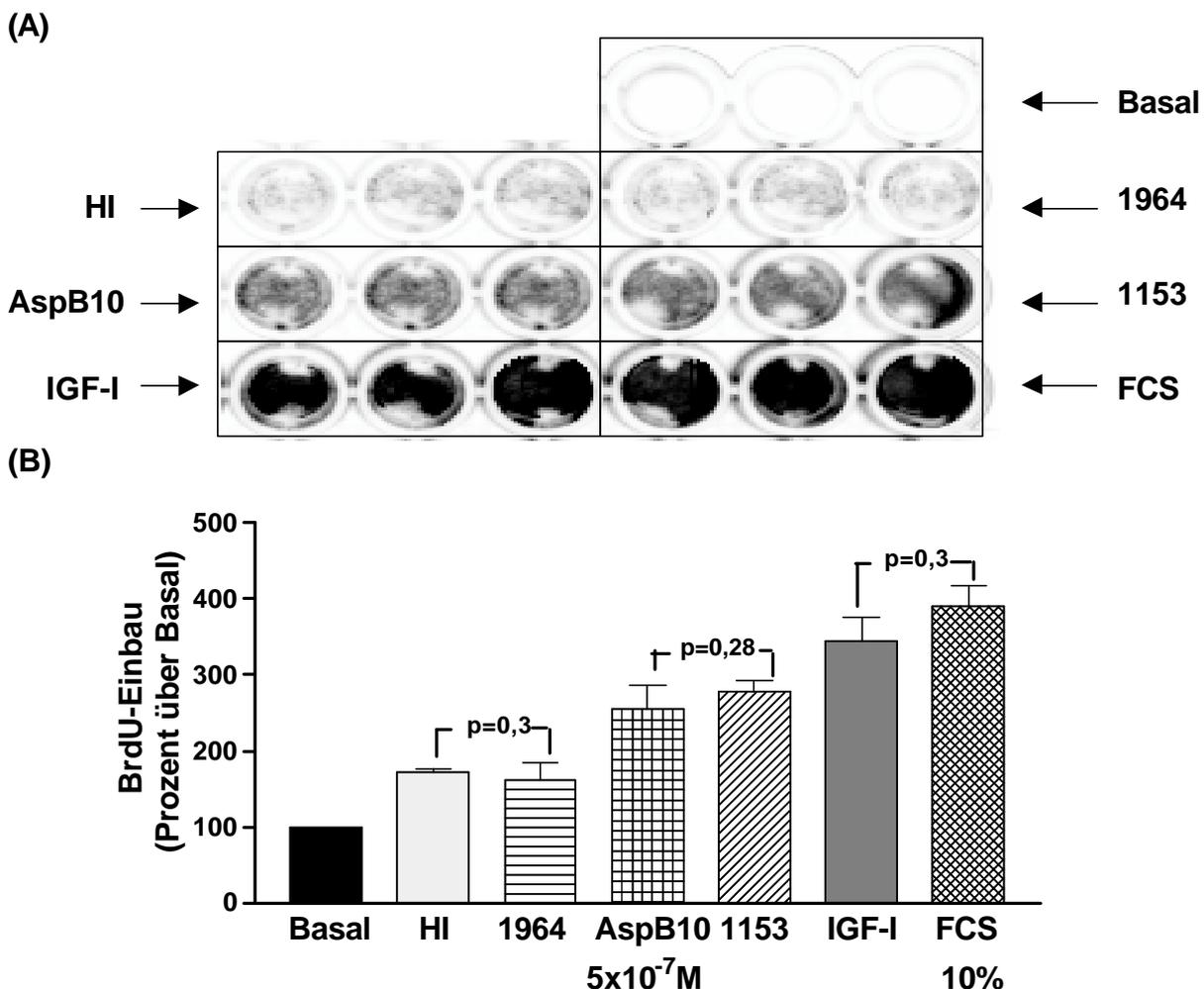


Abb.24.: Effekte von Humaninsulin, Insulinanaloge, IGF-I und FCS auf den Einbau des 5-Brom-2'-desoxyuridins (BrdU) in die DNA in K6-Myoblasten. Konfluente Myoblasten wurden nach 30 h Serumentzug für 16 h mit BrdU jeweils in der Abwesenheit (Basal) oder Anwesenheit der verschiedenen Hormonpeptide (500 nmol/l) bzw. 10% FCS inkubiert. Anschließend wurden die markierten Zellen fixiert, denaturiert und der BrdU-Einbau in die neusynthetisierte DNA mittels einem anti-BrdU Antiserums und ECL-Detektion, wie im Material und Methodenteil erläutert, erfaßt. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis, jeweils Triplikate. (A). Die Quantifizierung der detektierten Signale erfolgte mit Hilfe der LUMI Imager Analyse Software. Die gezeigten Daten sind als prozentualer Anstieg des BrdU-Einbaus über Basal ausgedrückt und stellen Mittelwerte \pm S.E.M. aus 4 unabhängigen Experimenten dar (B).

Somit ließ sich die deutliche Differenzierung in der Shc/MAPK-Signalübertragung durch die einzelne Analoga auch auf der Ebene distal vom Rezeptor bestätigen, jedoch deuteten die erhaltenen Daten darauf hin, daß die Gesamt-DNA-Synthese neben der aktivierten MAPK-Kaskade zusätzlich durch weitere Faktoren reguliert wird.

3.5. Wirkung der Insulinaloga auf die Proteinphosphorylierung

Die Signalauslösung des Insulins über den Insulin- bzw. IGF-I-Rezeptor involviert initial die Tyrosinphosphorylierung spezifischer Effektorproteine, die weitere Signalweiterleitung und Differenzierung über komplexe intrazelluläre Kaskaden führt dann zur Aktivierung verschiedener Serin/Threonin-Kinasen und Phosphatasen. Die hierbei entstehenden Phosphoproteine sind letztlich an der terminalen Regulation der Effektoren auf metabolischer und mitogener Ebene beteiligt (Lawrence, 1992; Saltiel, 1994).

Kessler und Mitarbeiter (1998) konnten die Kurzzeiteffekte (2 bzw. 15 min) des Insulins auf die Aktivierung abwärts gelegener Serin/Threonin-Kinasen und Phosphatasen mittels einer zweidimensionalen Phosphoanalyse in adulten Kardiomyozyten nachweisen, die sich durch deutliche Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsereignisse mehrerer Proteine im niedermolekularen Bereich zwischen 20 und 40 kDa gegenüber den unbehandelten Zellen auszeichneten.

Um eine molekulare Abgrenzung der Wirkungsspektren der Insuline auf dieser Ebene distal vom IGF-I Rezeptor zu erreichen, wurde eine zweidimensionale Analyse von Phosphoproteinen durchgeführt, die nach längerer Inkubation der Zellen mit den Insulinen darstellbar sind. In Analogie zu den Untersuchungen der DNA-Synthese wurden H9-Myoblasten einer 30 stündigen serumfreien (DMEM ohne FCS +0,5% BSA) Vorinkubation unterzogen. Unmittelbar nach dieser Hungerphase

wurden die Zellen mit [^{33}P]-Orthophosphat markiert und gleichzeitig mit den Insulinen (500 nmol/l) über einen Zeitraum von 24 h stimuliert.

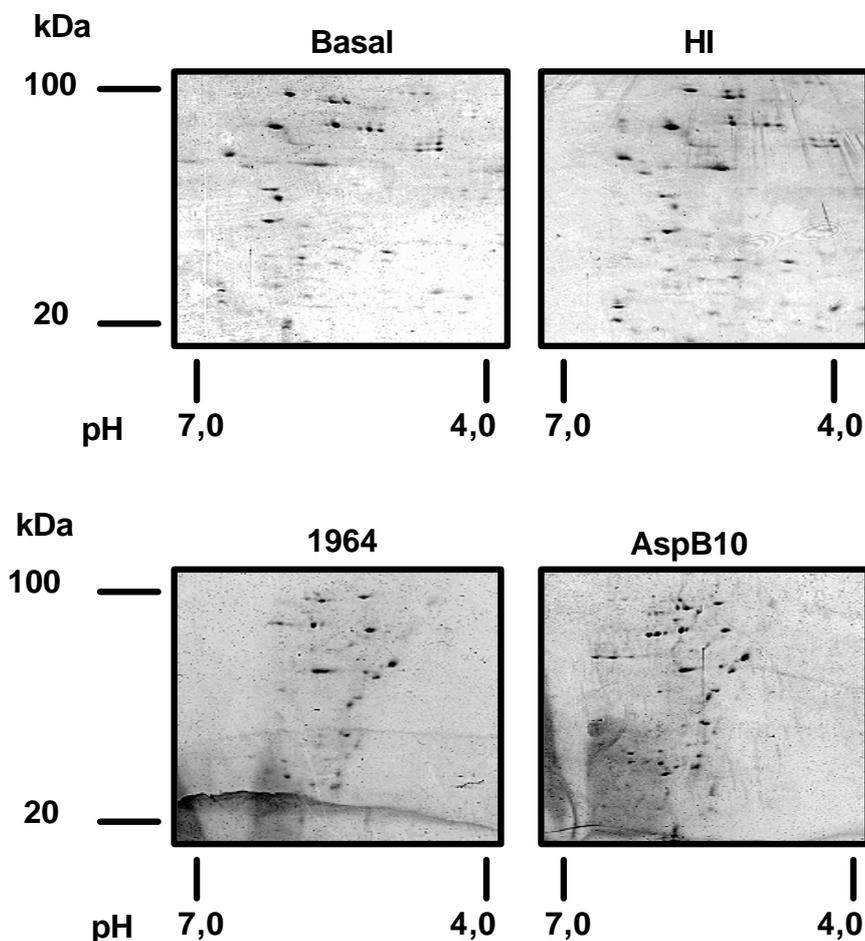


Abb.25.: Silbergefärbte Gele nach zweidimensionaler Elektrophorese der mit [^{33}P]-Orthophosphat markierten Proteinen aus H9-Lysaten von unbehandelten und mit Insulinanaloga behandelten Zellen. H9-Myoblasten wurden, gemäß den Angaben im Methodenteil, kultiviert, nachfolgend 30 h serumfrei inkubiert und anschließend mit 250 μCi [^{33}P]-Orthophosphat für 24 h markiert. Gleichzeitig erfolgte die Stimulation mit den Insulinen (500 nmol/l) über 24 h. Die Zelllysate wurden dann durch 2D-Elektrophorese aufgetrennt und die Gele nach dem Protokoll von Heukeshoven silbergefärbt. Gezeigt sind die Proteinmuster aus Lysaten basaler und mit den verschiedenen Insulinen behandelte H9-Zellen als repräsentatives Ergebnis aus 5 separaten Experimenten. Auf der Ordinate sind die Molekulargewichte der Referenzproteine angegeben, während auf der Abszisse der pH Bereich des linearen pH Gradienten der isoelektrischen Fokussierung abgebildet ist.

Im Anschluß wurden die Lysate basaler und hormonbehandelter Zellen durch eine zweidimensionale Gelelektrophorese aufgetrennt und nach der Silberfärbung wurden die Phosphoproteine durch Autoradiographie mittels eines Bio Imager Systems

visualisiert. In Abb. 25 sind die silbergefärbten Gele dargestellt, die eine Qualitätsbeurteilung der Proteinauftrennung sowie eine Einschätzung über die Menge und die Molekulargröße der dargestellten Proteine erlauben.

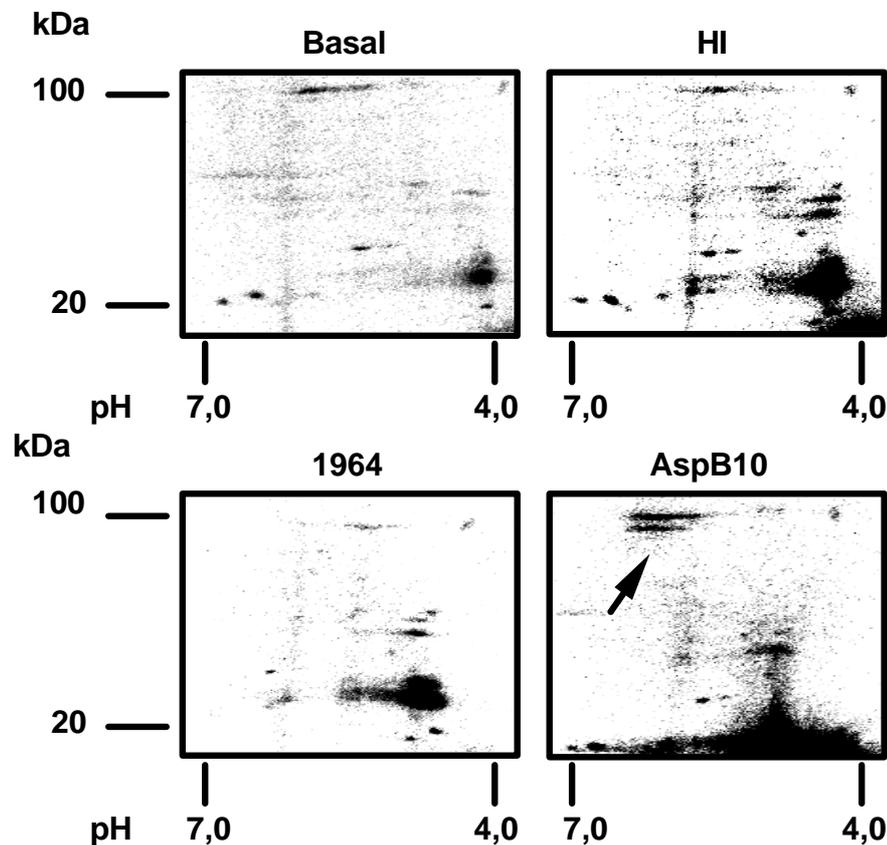


Abb.26.: Zweidimensionale Analyse von Phosphoproteinen in H9-Myoblasten nach Stimulation mit Humaninsulin bzw. Insulinanaloge. Nach Markierung der H9-Myoblasten mit 250 μCi [^{33}P]-Orthophosphat und gleichzeitiger Stimulation mit den Insulinen (500 nmol/l) über einen Zeitraum von 24 h und anschließender Lysis wurden die Phosphoproteine zweidimensional aufgetrennt und silbergefärbt, wie bereits in Abb. 25 beschrieben. Die Signale der mit [^{33}P]-Orthophosphat markierten Proteine aus Lysaten unbehandelter und hormonstimulierter Zellen wurden dann durch Autoradiographie mittels einem Bio Imager Systems visualisiert. Die gezeigten Phosphorylierungsmuster stellen repräsentative Autoradiogramme aus 5 unabhängigen Versuchen dar. Am unteren Bildrand ist der lineare pH Gradient dargestellt, während die Molekulargewichte der Referenzproteine auf der linken Seite abgebildet sind.

Es war eine Vielzahl von silbergefärbten Proteinen im Molekularbereich zwischen 20 und 100 kDa zu erkennen. Wegen der Komplexität und Vielfältigkeit der dargestellten Signale waren Unterschiede in der Proteinmenge schwer detektierbar und somit eine

Aussage über die Aktivierung der Proteinexpression nach Stimulation mit den Peptiden nicht möglich. Wie deutlich zu erkennen ist, verlief die Proteinauftrennung mit hoher Effektivität, während leichte Verschiebungen im Proteinmuster der verschiedenen Zelllysate durch kleine Schwankungen des Gelverlaufs zu erklären waren. In Abb. 26 sind repräsentative Ergebnisse der Wirkung der einzelnen Peptide auf die Proteinphosphorylierung wiedergegeben. Ein Vergleich der Autoradiogramme zeigt deutliche Veränderungen im durch die unterschiedlich stimulierten Zellen induzierten Phosphorylierungsmuster. In Basalzellen wurden mehrere Phosphoproteine zwischen 20 und 100 kDa im pH Bereich zwischen 4,5 und 5,8 nachgewiesen. Bei den eng benachbarten Proteinen kann es sich unter Umständen um verschieden phosphorylierte Formen desselben Proteins handeln. Der für Humaninsulin deutlich zu beobachtende Effekt bestand in einer prominenten Steigerung der Phosphorylierung dieser Proteine. Aus dem Autoradiogramm der mit dem Analogon 1964 stimulierten Zellen war ein mit Humaninsulin vergleichbares Phosphorylierungsmuster zu entnehmen, das sogar eine etwas schwächere Intensität aufwies. Demgegenüber induzierte das supermitogene AspB10-Insulin zusätzlich eine gesteigerte Phosphorylierung weiterer Proteine im pH Bereich von ca. 6,5 und ließ sich dadurch vom durch Humaninsulin erhaltenen Muster deutlich unterscheiden. In Übereinstimmung zu diesen Resultaten konnte in einer früheren Studie aus unserer Arbeitsgruppe eine ähnliche Differenzierung der Wirkungsspektren von Humaninsulin und AspB10 auf der Ebene der Proteinphosphorylierung in H9-Myoblasten nachgewiesen werden (Daten nicht publiziert). Unsere Befunde zeigen, daß das native Humaninsulin und das Analogon 1964 auch auf der Ebene der Phosphoproteine eine sehr ähnliche Signalweiterleitung auslösen, während das AspB10-Insulin einen hiervon deutlich unterschiedlichen Signalfluß ansteuert.

4. Diskussion

4.1. Zentrale Bedeutung der Insulinanaloga für die Insulintherapie beim Diabetes mellitus

Der Diabetes mellitus stellt ein Kollektiv aus Dysfunktionen dar, die auf einem relativen oder absoluten Mangel an Insulin beruhen und pathogenetisch durch eine bestehende Hyperglykämie und Glukosetoleranzstörung gekennzeichnet sind.

Seit geraumer Zeit ist bekannt, daß das grundlegende Konzept einer adäquaten und bedarfsgerechten Glukoseregulation, mit dem Ziel der Aufrechterhaltung einer konstanten arteriellen Blutglukosekonzentration im Säugetierorganismus durch ein fein abgestimmtes Hormonsystem gewährleistet wird, in dem die stoffwechselregulatorischen Pankreashormone Insulin und Glukagon eine zentrale Rolle einnehmen (Banting et al., 1922). Zwangsläufig ergeben sich durch das absolute bzw. relative Versagen der Insulinsekretion bei Typ 1 und Typ 2 Diabetes tiefgreifende Auswirkungen für die Glukosehomöostase. Diese Erkenntnisse verdeutlichen, daß eine strikte glykämische Kontrolle essentiell für die Minimierung der bei Diabetes auftretenden Komplikationen ist, was auch durch klinische Studien belegt wird, die nach intensiver Behandlung von Typ 1 Diabetespatienten eine deutliche Abnahme in der Häufigkeit und Progression von Spätfolgen, wie Neuropathie, Nephropathie und Retinopathie nachweisen konnten (The Diabetes Control & Complications Trial Research Group, 1993). Auf eine ähnliche Korrelation zwischen guter Blutzuckereinstellung und Verhinderung von mikro- und makrovaskulären Komplikationen in Typ 2 Diabetikern wird durch die Ergebnisse einer 6 jährigen prospektiven Untersuchung (Okkubo et al., 1995) und der „Wisconsin Epidemiologischer Studie“ (Klein, 1995) hingedeutet.

Eine normnahe Blutzuckereinstellung und eine daraus resultierende optimale Stoffwechsellage bedarf, aufgrund der durch die β -Zelldysfunktion bzw. -destruktion

verminderten Sekretion des körpereigenen Insulins bei Diabetespatienten, die exogene Zufuhr des Hormons. Somit ist Ziel der gegenwärtig sowohl bei Typ 1 als auch bei Typ 2 Diabetes eingesetzten intensivierten Substitutionstherapie, die Simulation einer normalen physiologischen Insulinsekretion durch die Substitution des basalen und prandialen Insulinbedarfs (White & Campbell, 1996).

Jedoch ist der Einsatz der kommerziell verfügbaren schnell- und langwirkenden Insulinpräparationen bei der Diabetestherapie durch subkutane Injektion des Hormons weit davon entfernt, dessen Freisetzung aus dem Pankreas in idealer Weise nachzuahmen, wobei die Ursache dafür in dem komplexen Aggregationsverhalten des Insulins zu Hexameren liegt, deren Solubilisierung und Dissoziation den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Absorptionskinetik und somit den limitierenden Faktor des Wirkungsprofils des subkutan injizierten Hormons darstellt (Hildebrandt et al., 1985; Mosekilde et al., 1989).

Die Entwicklung neuer gentechnologischer Methoden im letzten Jahrzehnt eröffnete die neue Ära des gezielten Proteindesigns und somit die Möglichkeit neue Insuline zu schaffen, deren Wirkungsprofile den Anforderungen eines optimalen Therapiekonzeptes bereits sehr weitreichend nachkommen (Bolli et al., 1999; Brange & Volund, 1999; Vajo & Duckworth, 2000). Die selektive Modifizierung des nativen Insulins erfordert ein detailliertes Wissen über die Konformation des Moleküls und seinem Interaktionsmodus innerhalb und zwischen den Untereinheiten auf molekularer Ebene. Das Grundprinzip für die gezielte Veränderung der Aminosäuresequenz besteht in der Beeinflussung von Ladungseffekten und hydrophoben Interaktionen oder der Induktion einer sterischen Hinderung an den für die Assoziation der Untereinheiten verantwortlichen Kontaktstellen im Insulinhexamer. So ist es gelungen mit Hilfe der rekombinanten DNA-Technologie, den therapeutischen Forderungen entsprechend, Insulinanaloga mit raschem oder

deutlich langsamerem Übertritt von der subkutanen Injektionsstelle in die Blutbahn zu synthetisieren, welche eine wesentliche therapeutische Bereicherung darstellen.

Derzeit sind in Deutschland zwei schnellwirksame Insulinanaloga für die Therapie des Diabetes mellitus verfügbar, bei denen durch gentechnologische Modifikation die gewünschte Verringerung der Selbstassoziationskräfte der Moleküle erreicht worden ist. Das Insulin Lispro (Humalog, Fa. Eli Lilly & Co.) entstand durch den gegenseitigen Austausch der beiden Aminosäuren Prolin und Lysin an Position B28 und B29 der B-Kette des Insulinmoleküls und das Insulin Aspart (Novo-Rapid, Fa. NovoNordisk) durch den Ersatz der Aminosäure Prolin an der Position B28 durch die negativ geladene Asparaginsäure. In umfangreichen Untersuchungen zur Pharmakokinetik und Bioverfügbarkeit konnten für die Insuline Lispro und Aspart die Beschleunigung der Absorption aus der Subkutanschicht und somit des Wirkungseintritts sowie eine Verkürzung der Wirkdauer im Vergleich zu Normalinsulin nachgewiesen werden. Die Befunde der pharmakokinetischen Untersuchungen stehen größtenteils im Einklang mit den Ergebnissen aus einer Reihe von klinischen Studien, die belegen können, daß die zwei kurzwirkende Analoga eine effektivere und raschere Senkung des postprandialen Blutzuckerspiegels mit einer verringerten Inzidenz von hypoglykämischen Effekten im Vergleich zu Normalinsulin ermöglichen (Übersichtsartikel: Vajo & Duckworth, 2000).

Vor der Einführung neuartiger, genmanipulierter Insuline in die Diabetesbehandlung, sind umfangreiche Überprüfungen hinsichtlich ihrer klinischen Verwendbarkeit erforderlich, unter besonderer Berücksichtigung ihrer Bindung, Affinität und Dissoziation an den Insulin- und den IGF-I-Rezeptor, ihrer unterschiedlichen biologischen Eigenschaften in vitro und ihrer toxikologischen Wirkungen in Relation zu Humaninsulin. Im Rahmen solcher Untersuchungen mit dem Insulin Lispro ergab sich, daß während seine Bindung an den Insulinrezeptor vergleichbar mit der von

Humaninsulin blieb, bewirkte die gentechnologisch herbeigeführte Modifizierung der Aminosäuresequenz bei diesem Analogon eine Erhöhung der Affinität zum IGF-I Rezeptor um den Faktor 2, die aber nicht ausreichend ist, um eine Steigerung der zellwachstums-stimulierenden Aktivität des Peptids hervorzurufen (Sliker et al., 1994). Entsprechende präklinische Studien mit Insulin Aspart haben demonstriert, daß seine Interaktionskinetik mit den beiden Rezeptoren äquivalent zu der von Humaninsulin ist (Drejer, 1992) und somit seine metabolische und mitogene Wirkung. Umfassende in vitro Untersuchungen hinsichtlich der über den Insulinrezeptor vermittelten metabolischen und mitogenen Aktivität des seit kurzem auf dem Markt verfügbaren langwirkenden Insulins Glargin lieferten keine Unterschiede im Vergleich zum nativen Humaninsulin (Berti et al., 1998), trotz einer leicht schwächeren Affinität des Analogons zum Insulinrezeptor (Home, 1999), die durch den Austausch der Position A21 verursacht wird. Bähr et al. (1997) berichteten von einer leicht erhöhten Affinität des Insulins Glargin zum IGF-I Rezeptor aufgrund der zusätzlichen basischen Aminosäurereste am Carboxylende der B-Kette, die jedoch seine wachstumsstimulierende Eigenschaften in vivo nicht zu beeinflussen scheint. Im Gegensatz dazu publizierten Kurtzhals et al. (2000) eine erheblich gesteigerte Affinität von Insulin Glargin zum IGF-I Rezeptor und eine daraus resultierende verstärkte Induktion der DNA-Synthese in menschlichen Osteosarcoma-Zellen.

Die hier aufgeführten Daten verdeutlichen, daß Modifikationen des nativen Insulinmoleküls an verschiedenen Stellen ganz unterschiedliche Auswirkungen auf Bindung und initiale Signalauslösung am Rezeptor durch die einzelnen Analoga hervorrufen. In Übereinstimmung dazu konnte in der vorliegenden Arbeit eine stark divergierende Signaltransduktion durch die zwei neuen kurzwirksamen Insulinanaloga HMR1964 und HMR1153 trotz eines einzigen Unterschieds in ihrer Aminosäuresequenz beobachtet werden.

4.2. Regulation der durch Humaninsulin bzw. Insulinanaloga induzierten initialen Signalauslösung

4.2.1. Initiale Rezeptorinteraktion: Bindung, Internalisierung, Degradierung

Es ist allgemein akzeptiert, daß die Primärstruktur interagierender Moleküle ihr Bindungspotential determiniert, wobei bestimmte Regionen der Aminosäuresequenz für die hohe Spezifität der Wechselwirkung eine entscheidende Rolle spielen. Studien zur Struktur und Funktion durch gezielte Mutagenese des Insulinmoleküls haben einen Einblick in die spezifischen Bindungsdeterminanten des Insulinmoleküls geschaffen, wobei den Aminosäureresten GlyA1, GlnA5, TyrA19, AsnA21, ValB12, TyrB16 und PheB24-TyrB26 eine essentielle Rolle bei der Bindung am Insulinrezeptor zukommt (Gammeltoft, 1984). Andererseits belegen neuere Literaturdaten, daß die Schlüsselregionen des strukturell homologen IGF-I, die eine hohe Selektivität für den IGF-I Rezeptor induzieren, in der C-Domäne und im C-terminalen Bereich der B-Untereinheit lokalisiert sind (Zhang et al., 1994).

Diese Erkenntnisse verdeutlichen, daß die Region B26-30 der Insulinsequenz nicht verantwortlich für die spezifische Erkennung des Insulinrezeptors ist, jedoch trägt sie möglicherweise zur spezifischen Interaktion mit dem IGF-I Rezeptor bei. Bekanntlich übernehmen diese Aminosäurereste eine zentrale Funktion bei der Vermittlung der Selbstassoziation der Insulinmoleküle (Bi et al., 1984; Baker et al., 1988) und dementsprechend ermöglichen strukturelle Modifikationen innerhalb dieser Region die Synthese von Insulinanaloga mit reduzierter Hexamerenbildung ohne signifikanten Einfluß auf ihre Insulinrezeptor-Bindungsaffinität, jedoch mit potentiellem Risiko einer veränderten IGF-I Rezeptor-Interaktion.

Dies konnten auch Sliker et al. (1997) in einer Studie zur Affinität einer Serie von monomeren Insulinanaloga bestätigen, indem sie eine hohe Sensitivität des IGF-I Rezeptors im Gegensatz zum Insulinrezeptor gegenüber Modifikationen im C-

terminalen Bereich der B-Kette des Insulinmoleküls, insbesondere im Fall herbeigeführter Ladungsunterschiede, nachweisen konnten.

In guter Übereinstimmung zu diesen Daten konnte kürzlich für das Analogon 1964 in unserer Arbeitsgruppe durch eine kinetische Analyse der Insulinrezeptorinteraktion im zellfreien System mittels der BIACORE-Methode eine mit dem nativen Humaninsulin äquivalente Bindungsaffinität zum Insulinrezeptor nachgewiesen werden (Schreiber, 2001).

In der vorliegenden Arbeit konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den neuen Insulinanaloga HMR1964 und HMR1153 hinsichtlich ihrer Bindungscharakteristik in K6-Myoblasten nachgewiesen werden. Das [LysB3, IleB28]-Insulin (1153) wies eine deutlich erhöhte spezifische Bindung auf, während das [LysB3, GluB29]-Insulin (1964) ein hierzu signifikant schwächeres, mit dem nativen Humaninsulin vergleichbares Bindungspotential zeigte. In Übereinstimmung zu früheren Studien (Bornfeldt et al., 1991; Milazzo et al., 1997) konnte auch in unserem Zellsystem eine verstärkte Bindungsaffinität des AspB10-Insulins beobachtet werden.

Kürzlich durchgeführte Studien zur Konformationsanalyse der Insulinstruktur durch Röntgenkristallographie berichten, daß Komponenten wie Phenol, anorganische Anionen oder Metallionen, die normalerweise in den pharmazeutischen Insulinpräparationen als Konservierungsmittel bzw. Stabilisatoren enthalten sind, als allosterische Effektoren agieren und durch Bindung an spezifischen Stellen des Insulinhexamers seine Stabilisierung fördern. Dies äußert sich in einer Neuordnung der N-terminalen Reste B1-B8 der B-Kette von einer gestreckten Konformation (T) über ein T3R3- Intermediat zu einer helikalen Form (R) aus (Tang et al., 1999; Shneine et al., 2000).

Nach diesen Daten sowie unter Berücksichtigung der Erkenntnisse über die Bindungsdeterminanten für die spezifische Insulin- bzw. IGF-I-Rezeptor Erkennung

ergibt sich, daß die für die beiden Analoga 1964 und 1153 gemeinsame Modifikation der Position B3 durch den Austausch von Asparaginsäure gegen Lysin nicht zu einer Veränderung der Bindungsaffinität der Peptide führen kann, sondern vielmehr zu einer Verminderung der stabilisierenden Transformation des T6-Zustandes in die helikale R6-Konformation beiträgt. Somit muß die beobachtete differentielle Bindung der hier untersuchten Analoga auf die zusätzliche Modifikationen in den Positionen B28 und B29 zurückgeführt werden.

Nach den Daten von Sliker et al. (1997) erhöht die Einführung von basischen Aminosäuren an diesen Stellen des Insulinmoleküls seine strukturelle Homologie zur korrespondierenden C-terminalen Region der B-Domäne des IGF-I, die für die selektive Erkennung durch den IGF-I Rezeptor essentiell ist. Somit war nicht zu erwarten, daß die Substitution der basischen Aminosäure Lysin durch die negativ geladene Glutaminsäure in Position B29 bei HMR1964 bzw. der Austausch des Prolins gegen die neutrale Aminosäure Isoleucin bei HMR1153 eine Veränderung ihrer Bindungsaffinität fördern würde, was auch beim Insulin 1964 durch unsere Studie bestätigt wurde. Die unerwartete verstärkte Bindung des 1153 liegt möglicherweise an der herbeigeführten verminderten sterischen Hinderung durch Ersatz des sperrigen ringförmigen Restes Prolin durch die aliphatische Aminosäure Isoleucin.

Es ist allgemein akzeptiert, daß der Insulin- und IGF-I-Rezeptor einer Ligand-induzierten Internalisierung in intrazelluläre vesikuläre Kompartimente mittels einer Chlathrin-abhängigen Endozytose unterliegen (Furlanetto, 1988; Carpentier, 1994; Kublaoui et al., 1995; Ceresa et al., 1998), jedoch ist die exakte physiologische Signifikanz dieses Prozesses wenig verstanden und kontrovers diskutiert worden. Mehrere Studien haben demonstriert, daß nach Insulinstimulation der in Endosomen lokalisierte Insulinrezeptor eine gesteigerte Autophosphorylierung und Tyrosinkinaseaktivität aufweist, im Vergleich zum plasmamembranassoziierten,

aktivierten Rezeptor (Backer et al., 1989). Basierend auf der Zeitkinetik der Endosomenassoziation, Tyrosinkinaseaktivierung und Kompartimentalisierung von Effektorsubstraten wurde angenommen, daß der internalisierte, endosomale Rezeptoranteil für die Stimulation intrazellulärer Signalwege verantwortlich ist (Burgess et al., 1992; diGuglielmo et al., 1994).

Andere Arbeitsgruppen konnten im Gegensatz hierzu nachweisen, daß die Aktivierung des plasmamembran-assoziierten Insulinrezeptors ausreichend, zumindest für die initialen oder proximalen insulinspezifischen Signaleffekte ist (Heller-Harrison et al., 1995; Biener et al., 1996).

Eine Folge der Ligand-vermittelten Rezeptorinternalisierung mit herausragender physiologischer Bedeutung ist die Termination des Insulinsignals, die durch zwei separate Prozesse erfolgt (Authier et al., 1996). Die Dissoziation und Degradierung des Ligands ist erforderlich für das Verhindern einer kontinuierlichen Stimulation der Autophosphorylierung, während die Dephosphorylierung zur Deaktivierung der Rezeptortyrosinkinase führt. Prozessierung und Abbau des Peptidhormons Insulin stellen einen komplexen Vorgang mit multiplen intrazellulären Signalkomponenten dar (diGuglielmo et al., 1998), deren Beteiligung in einer gewebespezifischen Art variieren kann. Eine Reihe von Daten weist auf das „insulin-degrading-enzyme“ (IDE) als den primären Degradierungsmechanismus hin, aber andere Systeme wie die endosomale saure Insulinase (EAI) und die Lysosomen sind am Insulinmetabolismus zweifellos involviert.

Die Analyse der rezeptorvermittelten Internalisierung der hier untersuchten Insulinanaloga ergab deutliche Unterschiede in K6-Myoblasten. Es wurde beobachtet, daß die Analoga 1153 und AspB10 nach 1 h am schnellsten internalisiert wurden, während die entsprechende Internalisationsrate von Humaninsulin und 1964 deutlich geringer war. Die Kinetik des Internalisierungsprozesses korreliert also gut

mit dem Bindungspotential der Peptidhormone in unserem Zellsystem und läßt folgern, daß eine erhöhte Bindungsaffinität zu einer raschen Endozytose des Ligand/Rezeptor-Komplexes führt und umgekehrt. Dieser Zusammenhang steht in Einklang mit der Beobachtung, daß der Ligand-induzierte Prozeß der Rezeptoransammlung in Clatrin-bedeckten Pits und nachfolgender Internalisierung in den meisten Zellen eine Kinetik erster Ordnung folgt (Neufeld et al., 1975; Neufeld et al., 1977), was wiederum darauf hindeutet, daß die Besetzung des Rezeptors den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Endozytosevorgangs darstellt.

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels Abbauprobe ein deutlich unterschiedliches Prozessierungsmuster der modifizierten Insulinpeptide durch die K6-Myoblasten beobachtet. Nach 1 h zeigte das native Humaninsulin den stärksten Abbau (6%), während das Analogon 1153 mit 4,2% deutlich langsamer degradiert wurde. Bei den Insulinen AspB10 und 1964 wurde eine noch schwächere intrazelluläre Abbaurate ermittelt (1,7% bzw. 2,4%). Offensichtlich haben Modifikationen der B-Kette des Insulinmoleküls einen Einfluß auf die Zeitkinetik der Hormonprozessierung.

In völliger Übereinstimmung zu unseren Daten konnte eine neuere Studie zum zellulären Metabolismus des Analogons AspB10 in isolierten Hepatozyten eine im Vergleich zu Humaninsulin deutlich langsamere Prozessierung nachweisen, die möglicherweise zu seinem verstärkten Effekt auf Zellwachstum und Mitogenese beiträgt (Hamel et al., 1999).

Authier und Mitarbeiter (1998) untersuchten die rezeptorvermittelte Endozytose und nachfolgende endosomale Proteolyse des kurzwirksamen [¹²⁵I]TyrA14-[HisA8, HisB4, GluB10, HisB27]-Insulins ([¹²⁵I]TyrA14-H2 Analogon) in der Rattenleber in vivo im Vergleich zum nativen [¹²⁵I]TyrA14-Insulin und konnten zeigen, daß die Degradierung für das H2 Analogon entscheidend langsamer verlief, als Folge einerseits einer

gesteigerten Halbwertszeit des Ligand/Rezeptor-Komplexes und andererseits einer schwachen Affinität des dissoziierten H2-Moleküls für die endosomale saure Insulinase. Letzteres führten sie auf den Austausch von ThrB27 gegen den mehr hydrophilen Rest His beim H2-Analogen zurück, der möglicherweise eine effektive Blockade der (PheB24-PheB25)-Spaltung zur Folge hat. Diese Resultate bestätigen den in unserer Arbeit erzielten Befund, daß veränderte Rezeptoraffinitäten, bedingt durch strukturelle Modifikationen des Insulinmoleküls, kinetische Unterschiede des Hormonmetabolismus in der Zelle verursachen können.

Die veränderte Abbaurate der hier untersuchten modifizierten Peptide verglichen mit Humaninsulin könnte auf eine differentielle Verweilzeit der Liganden am Insulin- bzw. IGF-I-Rezeptor und/oder auf eine veränderte Affinität zu den Degradierungsenzymen zurückgeführt werden. Um jedoch eine eindeutige Aussage über die Halbwertszeit der Ligand/Rezeptor-Komplexe zu treffen, müssen Kinetikstudien zur Ermittlung der jeweiligen Dissoziationskonstanten durchgeführt werden.

Aufgrund des limitierten Kenntnisstands über den molekularen Verlauf des Insulin-Abbauprozesses in insulinsensitivem Gewebe und der potentiellen Beteiligung multipler Degradierungssystemen kann nur spekuliert werden, daß die bei den untersuchten modifizierten Peptide ausgetauschte Aminosäuren in oder in der Nähe der Interaktionsregionen für die Abbauenzyme lokalisiert sind. Es scheint, daß die Mutagenese der Positionen B3, B29 bei HMR1964, B10 beim AspB10-Insulin und B3, B28 bei HMR1153, die Fähigkeit der Analoga als effektive Substrate des Degradierungsapparates signifikant modulieren kann.

4.2.2. Induktion der IGF-I Rezeptor Autophosphorylierung durch Humaninsulin bzw. Insulinanaloga

Der Insulin- und IGF-I-Rezeptor steuern aufgrund ihrer strukturellen Homologie weitgehend ähnliche Signalmechanismen an (Ullrich et al., 1985; Ullrich et al., 1986). Die Ligandbindung an die α -Untereinheiten induziert die Aktivierung der Tyrosinkinase der β -Ketten, die wiederum die Autophosphorylierung mehrerer Tyrosinreste in verschiedenen Regionen des cytoplasmatischen Bereichs der Rezeptoren initiiert sowie die nachfolgende Phosphorylierung einer Reihe endogener Signalmediatoren (White, 1997; White & Yenush, 1998). Das erste Post-Bindungs Ereignis der Interaktion des Insulins und IGF-I mit ihren spezifischen Rezeptoren ist die Autophosphorylierung eines Triplet-Tyrosin Clusters innerhalb der Tyrosinkinase-Domäne der β -Untereinheit (White et al., 1988; Murakami & Rosen, 1991). Mutationsanalysen der Tyrosinkinase-Domänen des Insulin- und IGF-I-Rezeptors zur Untersuchung der regulatorischen Rolle des Triplet-Tyrosin Clusters belegen, daß die Autophosphorylierung aller drei für die Aktivierung und die Initiierung der normalen physiologischen Funktionen der beiden Rezeptoren essentiell ist (Wilden et al., 1992 (a&b); Kato et al., 1994).

In der vorliegenden Studie konnten deutlich divergente Effekte auf die IGF-I Rezeptor Autophosphorylierung nach Stimulation der K6-Myoblasten mit den modifizierten Insulinen beobachtet werden. Die Bindung des Analogons 1153 an den IGF-I Rezeptor resultierte in einer 7,5 fachen Steigerung der Autophosphorylierung, während das native Humaninsulin nur zu einer schwachen Aktivierung führte (1,8 fach). Dies korreliert gut mit den aus der Bindungsanalyse erhobenen Daten für diese Peptide und läßt folgern, daß die hohe spezifische Bindung von 1153 an den Myoblasten eine verstärkte Aktivierung der IGF-I Rezeptor Tyrosinkinase zur Folge hat, die sich in einer gesteigerten Autophosphorylierung äußert. Entsprechend seiner

schwächeren Bindungsaffinität zeigt Humaninsulin in dieser Hinsicht eine geringere Wirkung. Die Stimulation der K6-Myoblasten mit AspB10-Insulin führte zu einer signifikant größeren Steigerung der Autophosphorylierung des Rezeptors (3 fach) verglichen mit Humaninsulin, relativ zu seinem hohen Bindungspotential, was in völliger Übereinstimmung mit früheren Studien zur IGF-I Rezeptor Signaltransduktion durch dieses Analogon in vaskulären glatten Muskelzellen (Bornfeldt et al.,1991), in menschlichen Brust-Epithelzellen (Milazzo et al.,1997), in menschlichen Hepatoma HepG2-Zellen (Drejer et al.,1991) und in H9-Myoblasten (Bähr et al.,1997) steht. Überraschenderweise produzierte das Analogon 1964 eine mit AspB10-Insulin vergleichbare IGF-I Rezeptor Tyrosinphosphorylierung, trotz seiner schwächeren Bindungsaffinität. Dieses Verhalten könnte durch eine verlängerte Halbwertszeit des Ligand/Rezeptor-Komplexes und dadurch bedingten länger anhaltenden Aktivierung des IGF-I Rezeptors durch das 1964 erklärt werden. Diese Argumentation wird gestützt durch die Daten von Hansen et al. (1996), die eine umgekehrt proportionale Beziehung zwischen der Insulinrezeptor-vermittelten Signalaktivität von Insulinanaloga und deren Dissoziationsrate postulierten. Darüber hinaus deutet die in unserem Zellsystem beobachtete langsamere Internalisierung des Peptids 1964, verglichen mit AspB10-Insulin, auf eine verlängerte Aktivierung des IGF-I Rezeptors hin, die zur Angleichung des Autophosphorylierungsgrades durch die beiden Analoga führen könnte. In Analogie zu der nachgewiesenen fortschreitenden Aktivierung des internalisierten Insulinrezeptors in intrazellulären Kompartimenten (Backer et al., 1989) könnte eine verlängerte Aktivierung des IGF-I Rezeptors durch das 1964 aufgrund einer längeren Beständigkeit des Ligand/Rezeptor-Komplexes innerhalb der Endosomen zu einer unproportional, verglichen mit seiner Bindungsaffinität, gesteigerten Autophosphorylierung führen. Der Befund andererseits, daß Humaninsulin trotz seiner langsamen, mit 1964 vergleichbaren

Internalisierung, den IGF-I Rezeptor nicht im gleichen Maße aktiviert, begründet sich offensichtlich in seiner schnellen intrazellulären Abbaurate, die auf eine verkürzte Verweilzeit am Rezeptor schließen läßt. Kinetikstudien zur Ermittlung der Halbwertszeit der jeweiligen Ligand/Rezeptor-Komplexe sind jedoch erforderlich, um diese Vermutungen zu bestätigen.

4.3. Weiterleitung der rezeptorvermittelten Wirkung von Humaninsulin bzw. Insulinanaloga

4.3.1. Aktivierung der Shc/MAPK-Kaskade und DNA-Synthese

Sowohl der IGF-I- als auch der Insulinrezeptor sind bei der Regulation metabolischer und mitogener Aktivitäten involviert (DeMeyts et al., 1995), wobei die durch ihre spezifischen Liganden induzierte Signaltransduktionsmechanismen zum Teil untereinander austauschbar sind. Studien mit Insulinanaloga (DeMeyts et al., 1993) und Zelllinien stammend von IGF-I- bzw. Insulinrezeptor-Knockoutmäusen (Lamothe et al., 1998) deuten auf gemeinsame Signalwege hin. Trotz der strukturellen und funktionellen Ähnlichkeit der beiden Rezeptorsysteme ist ihre physiologische Wirkung weitgehend unterschiedlich. Als akzeptiertes Dogma gilt, daß der Insulinrezeptor primär mit der Vermittlung metabolischer Effekte wie Glukosetransport, Lipid- und Glykogen-Synthese assoziiert ist, während der IGF-I Rezeptor präferentiell Zellwachstum und Mitogenese durch Regulation von Zellproliferation, Differenzierung, Transformation und Apoptose steuert (Stewart & Rotwein, 1996).

Die Spezifität der biologischen Wirkung des IGF-I- und Insulinrezeptors reflektiert zum Teil ihr unterschiedliches Expressionsmuster sowie das spezifische Vorkommen der ansprechbaren endogenen Substrate in den verschiedenen Zelltypen. Neuere Studien weisen jedoch auf eine intrinsische Signalspezifität hin, die hauptsächlich

durch die Carboxy-terminale Domäne der Rezeptoren determiniert wird und sich in einer unterschiedlichen relativen Phosphorylierung intrazellulärer Substrate durch die IGF-I- und Insulinrezeptor-Tyrosinkinase äußert (Ursø et al, 1999).

Die Adaptermoleküle Shc sind für die Insulin- und IGF-I-Rezeptor vermittelte Regulation von Zellwachstum, Differenzierung und Mitogenese von primärer Bedeutung. Es existieren drei verschiedene Isoformen dieser cytosolischen Proteine mit den Molekulargewichten 46, 52 und 66 kDa. Alle drei Shc Proteine verfügen über konservierte Regionen, die aus einer N-terminalen Phosphotyrosin-Bindungsdomäne (PTB-Domäne), einer zentralen, zur α 1-Kette des Kollagens homologen, Glycin/Prolin-reichen Region (CH1) und einer C-terminalen SH2-Domäne bestehen, während die 66 kDa Isoform zusätzlich eine Gly/Pro-reiche Kollagen-homologe Region in ihrem N-Terminus trägt (CH2) (Migliaccio et al., 1997). Während die SH2-Domäne Phosphotyrosine (pY) in Zusammenhang mit den C-terminalen Resten erkennt, zeigt die PTB-Domäne eine hohe Präferenz für Reste N-terminal des Phosphotyrosins im Sequenzmotiv NPXpY. Durch die Interaktion der PTB-Domäne der Shc Proteine mit den aktivierten Tyrosinkinasen des Insulin- bzw. IGF-I-Rezeptors wird die Integration des extrazellulären Signals über die Assoziation der Shc-Phosphotyrosinreste mit dem Effektormolekül Grb2 in den Ras-Signalweg ermöglicht (van der Geer & Pawson, 1995). Die weitere Signalübertragung von Ras zum Zellkern initiiert eine klassische Phosphorylierungs-Kaskade, die in der Aktivierung der Ser/Thr Mitogen-aktivierten Protein (MAP) Kinasen ERK1 und ERK2 mündet und nachfolgend die Umwandlung des extrazellulären Signals in genregulatorische Antworten induzieren. Zur Familie der MAP-Kinasen zählen neben der extrazellulär regulierten Kinasen (ERK) auch die c-Jun-NH₂-terminale Kinase (JNK) und die p38 Kinase, die alle durch eine duale Phosphorylierung eines

Threonin- und eines Tyrosinrestes aktiviert werden (Übersichtsartikel: Seger & Krebs, 1995).

Die MAP-Kinasen sind von essentieller Bedeutung für die Vermittlung elementarer zellulärer Funktionen der Hormone Insulin und IGF-I, wie z.B. Proliferation, Differenzierung oder Apoptose durch die Regulation der Transkription multipler Gene im Zellkern, die bei der Kontrolle und Ablauf des Zellzyklus eine zentrale Rolle übernehmen (Pelech & Sanghera, 1992). So konnte gezeigt werden, daß die am besten charakterisierten ERK Proteine (p44/p42 MAPK) entscheidend zur Regulation der zellulären Proliferation und Differenzierung im wesentlichen über die Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren Elk-1 und Stat3 sowie mittels Aktivierung der p90 ribosomalen S6-Kinase (p90rsk) beitragen (Frodin & Gammeltoft., 1999). Die c-Jun-NH₂-terminale Kinase (JNK)- und p38 MAPK-Signalwege sind Streß-aktivierte MAPK-Kaskaden, die im Gegensatz zu den ERK Proteinen eine Hemmung des Zellwachstums und die Induktion von Apoptose bewirken (Tibbles & Woodgett, 1999; Mielke & Herdegen, 2000). Das Gleichgewicht der verschiedenen MAP-Kinasen scheint daher für die zelluläre Entscheidung zwischen Proliferation oder Apoptose von Bedeutung zu sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung der Insulinanaloga auf die Aktivierung der mitogenen Ras/MAPK-Kaskade im K6-Zellsystem durch die Analyse der Stimulation von zwei zentralen Signalgebern dieses Weges, der Shc- und ERK-Proteine sowie auf der Ebene der DNA-Synthese überprüft.

Die Untersuchung der Kopräzipitation der Shc Proteine mit dem IGF-I Rezeptor lieferte einen ersten Hinweis auf deren Assoziation, während die Detektion der Tyrosinphosphorylierung sowohl der Shc Proteine als auch der ERK-Kinasen eine Aussage über deren Aktivitätsstatus nach Stimulation mit den einzelnen Peptiden erlaubte. Schließlich konnte der Einfluß der insulininduzierten Aktivierung dieses

mitogenen Signalweges auf die Gesamt-DNA-Synthese durch Messung des BrdU-Einbaus erfaßt werden. Die 10 minütige Behandlung der K6-Myoblasten mit dem Analogon 1153 erzeugte eine prominente Steigerung der IGF-I Rezeptor/Shc-Assoziation, der Tyrosinphosphorylierung der zwei Shc Isoformen (66 und 52 kDa) und beider ERK Proteine (ERK1/p44MAPK und ERK2/p42MAPK) sowie eine deutliche Aktivierung der DNA-Synthese. Ein ähnliches Signalmuster wurde durch Stimulation der K6-Myoblasten mit dem supermitogenen AspB10-Insulin erhalten, jedoch war seine Wirkung insgesamt schwächer. In Übereinstimmung zu unseren Daten konnte auch in anderen Zellsystemen gezeigt werden, daß das Analogon AspB10 eine relativ zu Humaninsulin gesteigerte Fähigkeit aufweist die Autophosphorylierung und Tyrosinkinaseaktivität des IGF-I Rezeptors zu stimulieren und mitogene Effekte zu vermitteln (Drejer et al., 1991; Milazzo et al., 1997).

Die beobachteten Signaleigenschaften der Analoga 1153 und AspB10 hinsichtlich der Stimulation des Shc/MAPK-Weges korrelieren mit ihrer erhöhten Bindungsaffinität und der verstärkten Induktion der IGF-I Rezeptor Autophosphorylierung und stehen im Einklang mit Studien, die eine prominente Rolle der Shc Proteine in der MAPK-Signalübertragung nachwiesen (Giorgetti et al., 1994) und die Assoziation von Shc mit dem Effektormolekül Grb2 als den Hauptaktivierungsmechanismus der Ras/MAPK-Kaskade demonstrierten (Skolnik et al, 1993; Pronk et al, 1994). In Übereinstimmung hierzu konnten neueste Studien von Boney et al. (2000) die essentielle Rolle der Shc/MAPK-Kaskade bei der Mitogenese und Differenzierung in 3T3-L1 Preadipocyten nachweisen, indem sie zeigten, daß die Expression einer Shc-Mutante mit modifizierter Grb2-Bindungsstelle, eine Reduktion der MAPK Aktivierung und Inhibition der DNA-Synthese zur Folge hatte.

Die Daten von Sasaoka und Kobayashi (2000) unterstützen ebenfalls die These, daß den Adapterproteinen Shc eine primäre Bedeutung für die insulininduzierte

Mitogenese durch Regulation der Ras-Aktivität zukommt, während ihre Rolle hinsichtlich metabolischer Aspekte von untergeordneter Wichtigkeit zu sein scheint.

Die Wirkung von Humaninsulin und HMR1964 auf die Aktivierung der Assoziation von Shc mit dem IGF-I Rezeptor, der Shc- und MAPK-Tyrosinphosphorylierung und der DNA-Synthese war signifikant schwächer verglichen mit 1153 und AspB10, während das kurzwirkende Analogon 1964 den geringsten Effekt auf die Stimulation der ERK Proteine ausübte und sich dadurch auch vom Signalmuster des Humaninsulins deutlich unterscheiden ließ.

Die Divergenz der Signalaktivität von Humaninsulin und 1964 auf der Ebene der MAPK Aktivierung war zunächst unerwartet angesichts der Tatsache, daß die beiden Peptide die stromaufwärts gelegenen Shc Proteine im gleichen Maße stimulierten. Dieses Resultat führte zu der Annahme, daß die Humaninsulin induzierte Aktivierung der ERKs möglicherweise zusätzlich durch andere Signalwege angesteuert wird. Es ist allgemein bekannt, daß das Grb2 Protein durch seine SH2-Domäne ebenfalls eine direkte Bindung mit dem tyrosinphosphorylierten IRS-1 eingehen kann und daß diese Assoziation ähnlich zum Shc/Grb2/Sos-Komplex alternativ zur Stimulation der Ras/MAPK-Kaskade beitragen kann (Takahashi et al., 1997; Valverde et al., 1998). In der Tat trägt die zusätzliche IRS-1 Aktivierung durch Humaninsulin offensichtlich zur im Vergleich mit 1964 gesteigerten ERK Stimulation bei, wie noch später genauer erläutert wird (4.3.2.).

Darüber hinaus erschien der Befund, daß das Analogon 1964 trotz einer mit AspB10 vergleichbaren Aktivierung der IGF-I Rezeptor Autophosphorylierung eine deutlich geringere Stimulation der Shc/MAPK-Kaskade induzierte, zunächst überraschend. Es ließ sich daher folgern, daß möglicherweise unterschiedliche Autophosphorylierungsmuster am IGF-I Rezeptor durch die verschiedenen Analoga induziert werden, die zu einer differentiellen Interaktion mit den nachgeschalteten Signalgebern führen

könnten. Diese Spekulation ließ sich auf der Ebene der Aktivierung der IRS Proteine überprüfen und auch durch die dabei erzielten Befunde unterstützen (4.3.2.).

Die durch die verschiedenen Insulinpeptide induzierte biologische Antwort auf der Ebene der DNA-Synthese ließ die oberhalb ermittelte sehr deutliche Differenzierung in der Aktivierung der mitogenen Shc/MAPK-Kaskade bestätigen. Jedoch wurde insgesamt nur eine relativ geringe Stimulation der DNA-Synthese erreicht, selbst FCS und IGF-I bewirkten nur eine ca. 4 fache Aktivierung im Vergleich zu den Kontrollzellen. Demzufolge waren die beobachteten Effekte der Insuline gering und die erwarteten Unterschiede ließen sich auf dieser Ebene vom absoluten Betrag her nicht erfassen. Die um ca. 50% gesteigerte Wirkung des supermitogenen AspB10 relativ zum Humaninsulin liegt deutlich niedriger als die ermittelte wachstumsfördernde Aktivität dieses Analogons in menschlichen Epithelzellen, ca. 3,4 fach (Sliker et al., 1997), in CHO-K1-Zellen ca. 6 fach (Hansen et al., 1996) und in menschlichen Osteosarcoma Zellen, ca. 10 fach (Kurtzhals et al., 2000). Jedoch stimmt die in unserem Zellsystem gemessene ca. 1,7 bzw. 3 fache Aktivierung der DNA-Synthese durch Humaninsulin und AspB10 gegenüber dem Basalzustand, mit der entsprechenden Mitogenität der Peptide in H9-Myoblasten (Bähr et al., 1997), dem Wildtyp des hier verwendeten K6-Zellsystems, gut überein. Aus diesen Daten ließ sich folgern, daß der Prozeß der Gesamt-DNA-Synthese möglicherweise gewebespezifisch auf unterschiedliche Art und Weise angesteuert wird und daß die Messung auf dieser Ebene nicht unbedingt Unterschiede in der stromaufwärts gelegenen Ras/MAPK-Signalübertragung streng widerspiegeln muß. Vielmehr ist davon auszugehen, daß zumindest im K6- bzw. H9-Zellsystem die Aktivierung der ERK-Kinasen die Expression eines spezifischen Genmusters ansteuert, daß jedoch die Gesamt-DNA-Synthese und das Wachstum der Zellen im Verbund mit weiteren Signalgebern reguliert werden.

Neuere Literaturdaten belegen, daß die IGF-I Rezeptor-vermittelte genregulatorische Antwort nicht nur das Ergebnis der klassischen mitogenen Shc/Ras/Raf/MEK/MAPK-Kaskade ist, sondern eher ein komplexes Netzwerk von verschiedenen, parallel aktivierten Signalwegen widerspiegelt. In diesem Kontext berichteten Valverde und Mitarbeiter (1996), daß in fötalen primären Adipocyten die IGF-I Rezeptor-vermittelte mitogene Signalkaskade unterhalb der Ras-Ebene amplifiziert wird und über zwei verschiedene Ser/Thr-Kinasen, Raf-1 und Protein Kinase Czeta, den Zellkern erreicht. Desweiteren deuten eine Reihe von Studien auf die potentielle Beteiligung der PI3-Kinase bei der Vermittlung mitogener Effekte hin. So zeigten Duan und Mitarbeiter (2000), daß die PI3-Kinase für die IGF-I induzierte Proliferation und Migration der vaskulären glatten Muskelzellen erforderlich ist und daß dieser Prozeß über die Aktivierung der nachgeschalteten Protein Kinase B (PKB/Akt) verläuft.

Der relativ schwache Effekt sowohl des Insulin-, IGF-I als auch des Serum-Stimulus auf die Gesamt-DNA-Synthese in unserem Zellsystem deutet außerdem auf eine potentielle Stimulation und Beteiligung von Streß-aktivierbaren MAP-Kinasen, wie JNK und/oder p38-MAPK, möglicherweise ausgelöst durch den 30 h langen Serumentzug, hin. Die Stimulation solcher Signalkaskaden würde bekanntlich eine Wachstumshemmung induzieren, die zumindest zum Teil die geringe Wirkung der einzelnen Stimuli auf der Ebene der DNA-Synthese erklären könnte. Zusätzlich wäre denkbar, daß die langzeitige Behandlung der Zellen mit supraphysiologischen Insulinkonzentrationen zu einer Abregulation des IGF-I Rezeptor Singalsystems führen könnte und somit wäre der Vergleich zu den Kurzeiteffekten der Insuline auf die MAPK-Kaskade nicht sinnvoll. Diese These wird unterstrichen durch die Arbeit von Chi et al. (2000), die gezeigt hat, daß hohe IGF-I- und Insulinkonzentrationen langfristig eine Apoptose in Maus-Blastozyten durch Reduktion der IGF-I Rezeptor - Signaltransduktion und/oder -Expression auslösten.

4.3.2. Aktivierung der IRS-Signalkaskade

Neben den Shc Proteinen stellen Mitglieder der IRS-Familie nachweislich zentrale Komponenten der Insulin- bzw. IGF-I-Rezeptor Signaltransduktion dar. Es existieren mindestens vier verschiedene Gene (IRS 1 bis 4) die für diese Adapterproteine kodieren, wobei IRS-1 und IRS-2 zu den am besten charakterisierten gehören (Butler et al., 1998). Das Vorkommen der IRS-1/2 Proteine ist ubiquitär, jedoch variiert ihr Expressionsgrad zwischen den verschiedenen Geweben in Mammaliern stark und es wird angenommen, daß diese unterschiedliche zelluläre Verteilung zum Teil zu ihrer Signalspezifität beiträgt. Während die IRS Proteine über hochkonservierte Regionen im N-Terminus, wie die PTB- und PH-Domänen verfügen, weist ihr C-Terminus, der multiple potentielle Tyrosinphosphorylierungsstellen enthält, eine extensive Heterogenität auf. Die rezeptorvermittelte Tyrosinphosphorylierung der IRS Proteine an multiplen Stellen der C-terminalen Domäne ermöglicht ihre nachfolgende Assoziation mit einem breiten Spektrum nachgeschalteter, SH2-Domänen enthaltender Effektormoleküle, wodurch eine zusätzliche Divergenz der zellulären biologischen Wirkung ermöglicht wird.

Obwohl IRS-1 und IRS-2 eine funktionelle Überlappung aufweisen, sind sie hinsichtlich ihrer physiologischen zellulären Wirkung keinesfalls austauschbar. Dies wird durch Studien an IRS1/2-Knockoutmodellen untermauert (Bruning et al., 1997). In diesem Zusammenhang berichten Yamauchi und Mitarbeiter (1996), daß der Kompensationsgrad für das IRS-1 Defizit mit der verfügbaren Menge an tyrosinphosphoryliertem IRS-2 zu korrelieren scheint. So konnten ihre Studien an von IRS-1 Knockoutmäusen stammenden Muskeln eine deutliche Beeinträchtigung der insulininduzierten PI3-Kinase Aktivierung, des Glukosetransports, der p70S6 Kinase- und der MAPK-Stimulation, mRNA-Translation und Proteinsynthese nachweisen, während in der Leber dieser transgenen Mäuse die Insulinansprechbarkeit

hinsichtlich der PI3-Kinase- und MAPK-Aktivierung nicht signifikant reduziert war. Diese Unterschiede spiegelten die gewebespezifische Verteilung der IRS-1/2 Proteine wider, die in der Leber äquivalent ist, während in den Muskeln das IRS-1 dominiert.

In der vorliegenden Arbeit führte die Analyse der Aktivierung der IRS-1/2 Proteine durch die verschiedenen Analoga zu neuen, interessanten Erkenntnissen über die differentielle Wirkung modifizierter Insulinpeptide und die Rolle der spezifischen Interaktion mit dem IGF-I Rezeptor bei der selektiven Regulation nachgeschalteter Signalprozesse. Die Analoga 1153 und AspB10 wiesen ein deutlich schwächeres Potential hinsichtlich der Stimulation beider IRS Proteine gegenüber der Wirkung vom nativen Insulin auf. Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit in drei unterschiedlichen Zellsystemen, in K6-Myoblasten, in menschlichen Myoblasten der Skelettmuskulatur und in adulten Kardiomyozyten bestätigt werden. In Übereinstimmung mit unseren Daten berichteten Hansen und Mitarbeiter (1996), daß die Stimulation von CHO-Zellen mit AspB10-Insulin in einer selektiven Verstärkung der Tyrosinphosphorylierung von Shc gegenüber den IRS Proteinen resultierte, die möglicherweise auf eine verlängerte Aktivierung der Rezeptortyrosinkinase, bedingt durch eine längere Halbwertszeit des AspB10/Rezeptor-Komplexes, zurückzuführen ist. Interessanterweise existieren subtile Unterschiede in der Zeitkinetik des Aktivierungsprozesses der Adapterproteine IRS-1 und Shc. Während die IGF-I vermittelte maximale Tyrosinphosphorylierung von IRS-1 innerhalb von 1 bis 2 Minuten erreicht ist, weist der entsprechende Vorgang für Shc eine verzögerte Dauer von 5 bis 10 Minuten auf, was mit dem für die ligandinduzierte Rezeptorinternalisierung erforderlichen Zeitrahmen korreliert (Hsu et al., 1994; Sasaoka et al., 1996). In der Tat konnten Chow et al. (1998) in CHO-Fibroblasten nachweisen, daß die IGF-I Rezeptor Internalisierung für die Signalübertragung via

der Shc/MAPK-Kaskade im Gegensatz zum IRS-1 Signalweg erforderlich ist. Dieser Befund untermauert die These, daß die Ligand- stimulierte Rezeptorendozytose einen Regulationsmechanismus für die selektive Aktivierung von Signalwegen und somit Vermittlung spezifischer biologischer Effekte darstellt. In Analogie zu diesen Daten könnte die in unserem Zellsystem beobachtete schnelle Internalisierung der Analoga 1153 und AspB10, zumindest teilweise, ihre präferentielle Shc Aktivierung gegenüber den IRS Proteinen erklären. In Übereinstimmung zu dieser Argumentation zeigen unsere Daten eine gute Korrelation zwischen der Internalisierung der einzelnen Insulinpeptide und der Aktivierung der MAPK-Kaskade in K6-Myoblasten. Das Analogon 1153 wies eine 3 bis 4 fach höhere Internalisationsrate relativ zu 1964 auf, die in einer 3 bis 4 fach gesteigerten Shc Phosphorylierung und ERK1/2 Aktivierung resultierte. Andererseits korrelierte die langsame rezeptorvermittelte Internalisierung des Analogons 1964 mit der Induktion einer sehr schwachen MAPK Aktivierung, die sogar signifikant geringer als die Wirkung des Humaninsulins war. Darüber hinaus demonstrierten Bevan und Mitarbeiter (2000), daß eine länger anhaltende Verweilzeit am Rezeptor die endosomale Insulindegradierung verzögert und eine dadurch verstärkte intrazelluläre Signalauslösung bewirkt. Anhand dieser Aussage könnte die in den K6-Zellen erhaltene schnelle Internalisierung des AspB10-Insulins in Kombination mit dem sehr langsamen intrazellulären Abbau seine prominente MAPK Aktivierung erklären.

Es ist allgemein akzeptiert, daß sowohl IRS-1 als auch Shc primär durch ihre PTB-Domänen an Phosphotyrosine im Sequenzmotiv NPXpY innerhalb der Juxtamembran-Region aktivierter Rezeptoren binden, jedoch wird diese Interaktion individuell durch diverse Faktoren beeinflusst. Während die Shc-PTB-Domäne spezifisch die Kernsequenz AsnProXpY erkennt, wie Van der Geer et al. (1996) berichteten, wird ihre Bindungsaffinität dennoch durch N-terminale Reste dieses

Motivs signifikant moduliert. Eine Sequenzanalyse dieser N-terminalen Region zeigte, daß die Anwesenheit hydrophober Reste essentiell für eine hochaffine Bindung und somit Spezifität der PTB/Rezeptor-Interaktion ist, wobei der Existenz eines sperrigen hydrophoben Restes an der pY-5 Stelle eine primäre Bedeutung zukommt. Im Gegensatz hierzu weist die IRS-1-PTB-Domäne eine hohe Selektivität für hydrophobe Reste an den N-terminalen pY-6 und pY-8 Positionen und für Alanin an der pY-1 Stelle auf (Wolf et al., 1995). Darüber hinaus konnten Tartare-Deckert und Mitarbeiter (1995) eine differentielle Abhängigkeit der Shc- bzw. IRS-1-Bindung von der Phosphorylierung individueller Reste des Tyrosin-Clusters innerhalb der katalytischen Domäne des IGF-I Rezeptors nachweisen. Sie zeigten unter Verwendung des Yeast -two -hybrid-Systems, daß IRS-1 und Shc am NPEY950 Juxtamembranmotiv des IGF-I binden. Jedoch interagiert IRS-1 zusätzlich mit den Hauptautophosphorylierungsstellen (Tyr-1131, -1135 und -1136) der Rezeptortyrosinkinase-Domäne. Der Phosphorylierungsgrad der katalytischen Domäne des IGF-I Rezeptors scheint daher eine weitere Stufe der spezifischen Substraterkennung darzustellen. Zusätzlich zeigten Studien an transfizierten CHO-Zellen mit stabiler Expression einer Mutante des menschlichen Insulinrezeptors (hIR Δ NPEY), daß die NPEY972-Sequenz wichtig, aber nicht essentiell für die Kopplung der Insulinrezeptorkinase an IRS-1 ist, wohingegen dieses Motiv für die Shc Phosphorylierung absolut erforderlich zu sein scheint (Berhanu et al., 1997). Farooq et al. (1999) zeigten mittels der Isothermischen Titrationskalorimetrie Technik deutliche Unterschiede bezogen auf die thermodynamischen Aspekte der Spezifität der Shc- bzw. IRS-1-PTB Peptidbindung. Zusammenfassend weisen diese Studien in Kombination mit unseren Daten darauf hin, daß neben der Prozessierung die unterschiedliche Interaktion von IRS-1 und Shc mit dem Rezeptor, bedingt durch ein

differentielles Phosphorylierungsmuster seiner cytoplasmatischen Domäne zur Spezifität der vermittelten biologischen Wirkung beitragen kann.

Ein Kernbefund der vorliegenden Arbeit besteht in der Beobachtung, daß das Analogon 1964 die einzigartige Eigenschaft aufweist, eine präferentielle Signaltransduktion über das IRS-2 Protein zu induzieren. Die Stimulation der K6-Myoblasten mit 1964 zeigte nur einen marginalen Effekt auf die Aktivierung von IRS-1, jedoch bewirkte dieses modifizierte Insulinpeptid eine prominente, etwa 20 fache und somit mit Humaninsulin äquivalent effektive Steigerung der IRS-2 Tyrosinphosphorylierung. Das auffällige Verhalten des Analogons 1964 hinsichtlich der bevorzugten IRS-2 Aktivierung wurde zunächst in einem weiteren Myoblastensystem primärer menschlicher Skelettmuskelzellen überprüft und auch bestätigt. Es konnte exakt die gleiche Aussage wie in den Herzmuskelzellen der Ratte getroffen werden, was darauf hindeutete, daß das spezielle Wirkungsprofil des Analogons 1964 nicht gewebe- oder speziesspezifisch ist. Im menschlichen Zellsystem war sogar die Fähigkeit des Analogons den IRS-2 Signalweg anzusteuern signifikant höher als die von Humaninsulin.

Unter Verwendung von adulten Kardiomyozyten, die einen sehr hohen Anteil an Insulinrezeptoren besitzen und deutlich weniger IGF-I Rezeptoren exprimieren (Eckel & Reinauer, 1985), ließ sich die Übertragbarkeit der im Myoblastensystem erhobenen Daten auch an primären Muskelzellen bestätigen. Aus diesen Daten ließ sich folgern, daß das Insulinanalogon 1964 eine sehr spezifische Signalauslösung auf der Rezeptorebene initiiert, die zu einer deutlich bevorzugten rezeptorvermittelten Signalweiterleitung durch IRS-2 führt. Neben den hochkonservierten N-terminalen PTB- und PH-Domänen der IRS-1/2 Proteine berichteten O'Neill und Mitarbeiter (1994) von der Existenz einer dritten Region im IRS-1 Molekül (SAIN), die eine weitere funktionelle PTB-Domäne enthält und

zwischen IRS-1 und IRS-2 wenig konserviert zu sein scheint. Darüber hinaus identifizierten neuere Studien eine zusätzliche Interaktionsdomäne in der zentralen Region von IRS-2, die zwischen den Aminosäuren 591 und 786 lokalisiert ist. Diese spezifische, im IRS-1 Molekül nicht vorkommende Region, die weder eine SH2- noch eine PTB-Domäne zu enthalten scheint, ermöglicht eine Interaktion mit dem Rezeptor erst nach Aktivierung seiner Tyrosinkinase, jedoch durch einen NPXpY-unabhängigen Mechanismus. Die Arbeitsgruppe von Sawka-Verhelle et al. (1996 & 1997) konnte mittels dem Yeast-two-hybrid-System nachweisen, daß diese neue spezifische IRS-2 Bindedomäne eine funktionelle Insulinrezeptorkinase und die Anwesenheit der drei Tyrosinphosphorylierungsstellen (Y1146, Y1150, Y1151) in der regulatorischen Untereinheit des Rezeptors erfordert. Zwei Tyrosinreste (Y624 und Y628) innerhalb dieser IRS-2 Region, die als KRLB (kinase regulatory loop binding)-Domäne bezeichnet wurde, scheinen essentiell für die Vermittlung der Interaktion mit dem Insulinrezeptor zu sein. Das von dieser Arbeitsgruppe beschriebene Modell besteht zunächst in einer primären PTB-vermittelten Bindung an das NPXpY-Motiv der Juxtamembran-Region des Insulinrezeptors und einer Stabilisierung der Assoziation durch die nachfolgende Interaktion der IRS-2-KRLB-Domäne mit der Rezeptortyrosinkinase-Untereinheit (Sawka-Verhelle et al., 1997). In diesem Kontext ist es von entscheidender Bedeutung, daß die Interaktion durch die KRLB-Domäne möglicherweise einen Regulationsmechanismus darstellt, über den die Stöchiometrie der Autophosphorylierung in der regulatorischen Rezeptoruntereinheit den IRS-2 Aktivierungsgrad kontrolliert. In Übereinstimmung hierzu konnten Chaika und Mitarbeiter (1999) durch Studien an 3T3-L1-Adipocyten mit Expression einer in der Juxtamembran-Domäne mutierten Variante des Insulinrezeptors nachweisen, daß Tyr960 wichtig für die Interaktion mit IRS-2, jedoch im Gegensatz zur IRS-1 Stimulation nicht essentiell für die Rezeptortyrosinkinase-vermittelte IRS-2

Phosphorylierung ist. Die Daten von Miele et al. (1999) unterstützen ebenfalls dieses Konzept, indem sie zeigten, daß die erhaltene basale maximale IRS-2 Phosphorylierung in L6-Muskelzellen mit Expression der natürlich vorkommenden Variante Arg1152-> Gln des Insulinrezeptors, mit einer 4 fachen Steigerung der Bindung der IRS-2-KRLB-Domäne an dem mutierten Rezeptor korrelierte.

Zusammenfassend belegen diese Befunde, daß das IRS-2 Protein im Gegensatz zu IRS-1 über multiple, unabhängige Bindungsmotive mit aktivierten Rezeptoren interagieren kann, was möglicherweise zu einer weiteren Signalspezifität beiträgt. Unsere Befunde und vor allem die Beobachtung, daß Bindung und initiale Signalprozesse einerseits sowie Rezeptorautophosphorylierung und intrazelluläres Signalmuster andererseits zwischen den einzelnen Analoga nicht komplett korrelieren, legen die Vermutung nahe, daß es Strukturelemente im Insulinmolekül gibt, die unabhängig von Bindung und induziertem Phosphorylierungsgrad unterschiedliche Phosphorylierungsmuster am Rezeptor erzeugen. Dadurch wird eine differentielle Wechselwirkung der nachgeschalteten Adapterproteine mit den cytoplasmatischen Rezeptor-Untereinheiten und eine damit verbundene spezifische Aktivierung der Signalübertragung induziert. Somit kann spekuliert werden, daß neben der Bindungsaffinität, des Internalisierungsprozesses und der Halbwertszeit des Ligand/Rezeptor-Komplexes zusätzlich das Phosphorylierungsmuster am Rezeptor eine weitere Differenzierungsstufe der Signalauslösung darstellt.

Der Mechanismus nach dem die Ligand/Rezeptor-Interaktion zur Induktion der transmembranen Aktivierung führt, ist bisher nicht im Detail auf molekularer Ebene verstanden worden. Es wird angenommen, daß die extrazellulär induzierte Aktivierung des Rezeptors nach einem allosteren Mechanismus verläuft. Letzterer involviert eine Konformationsänderung der Quartärstruktur des transmembranen Glykoproteins nach Ligandbindung. Dabei erfolgt eine Verschiebung der

α -Untereinheiten und Änderung der gegenseitigen Zuordnung der beiden Tyrosinkinase-Domänen der β -Ketten in einer solchen Weise, daß eine gegenseitige (trans) Tyrosin-phosphorylierung in verschiedenen Regionen des cytoplasmatischen Bereichs, betreffend die Juxtamembran-, die Tyrosinkinase- und die Carboxy-terminale- Domäne, ermöglicht wird (Hubbard et al., 1994; McDonald et al., 1995).

Anhand dieser Erkenntnisse läßt sich spekulieren, daß Unterschiede in der durch die modifizierten Insulinpeptide induzierten strukturellen Veränderung des Rezeptors, möglicherweise sein Phosphorylierungsmuster modulieren könnten, was in einer differentiellen Assoziation mit den endogenen Substraten und somit in einem divergenten Wirkungsprofil resultieren würde. Es liegt die Vermutung nahe, daß eine unterschiedliche Rezeptorinteraktion der einzelnen Insulinanaloga, bedingt durch ihre strukturelle Modifikation, eine solche Rezeptor-Konformationsänderung induzieren können, die eine stabile Komplexbildung mit einem spezifischen Substrat fördert, während die Assoziation mit anderen potentiellen Signalgebern beeinträchtigt oder gar blockiert wird. Dies könnte unter anderem das Wirkungsprofil des Analogons 1964 erklären, das sich durch eine schwache Aktivierung von Shc, eine starke Beeinträchtigung der IRS-1 Phosphorylierung und schließlich eine präferentielle Stimulation von IRS-2 auszeichnet. Eine hypothetische Interpretation der erhaltenen Diskrepanz zwischen Bindungspotential und Rezeptorphosphorylierung induziert durch die Analoga 1964 und AspB10, wäre neben ihrem differentiellen Internalisierungsprozeß, ihre Interaktion mit unterschiedlichen Bindungsregionen der α -Untereinheiten des Rezeptors, wodurch die Anordnung der Ketten in bestimmten Konformationszuständen zur Induktion spezieller Phosphorylierungsmuster ermöglicht wäre. Jedoch sind umfangreiche und detaillierte Analysen zur Funktion und Struktur der Interaktionsdomänen erforderlich, um die genauen molekularen Mechanismen aufzuklären und die hier aufgestellten Hypothesen zu bestätigen.

Eine zentrale Aussage der vorliegenden Arbeit beinhaltet die bemerkenswerte Eigenschaft des Insulinanalogons 1964 bevorzugt den IRS-2 Signalweg anzusteuern. Eine präferentielle IRS-2 Aktivierung ist für die potentielle klinische Relevanz neuer Insulinmoleküle besonders wünschenswert. Dies resultiert aus den gewonnenen Erkenntnissen neuerer Studien, die belegen, daß die IRS Proteine unterschiedliche Rollen bei der Vermittlung der metabolischen und mitogenen Effekte des Insulins einnehmen. So identifizierten Rother et al. (1998) das IRS-2 Protein als den Haupteffektor der insulinvermittelten metabolischen und wachstumsfördernden Wirkung, über die Aktivierung der intermediären PI3-Kinase in Hepatozyten, wohingegen das IRS-1 der primäre Mediator der IGF-I Rezeptor-vermittelten mitogenen Insulinaktivität zu sein scheint. In völliger Übereinstimmung berichteten Valverde und Mitarbeiter (1998), daß IRS-1 und Shc, jedoch nicht IRS-2, mit dem Effektormolekül Grb2 assoziieren, was zur Aktivierung der Ras/MAPK-Kaskade führt, die für die Proliferation der fötalen braunen Adipozyten erforderlich ist. Eine Komplexbildung zwischen IRS-2 und Grb2 konnte in Neuroblastoma-Zellen nach IGF-I Stimulation beobachtet werden, die jedoch nicht eine Anbindung des Signals an den mitogenen MAPK-Signalweg herstellte (Kim et al., 1998).

Die relative Beteiligung der IRS-1/2 Proteine beim Insulin/IGF-I-Signalsystem wurde ebenfalls in Muskelgewebe untersucht. In völliger Deckung mit den oben dargestellten Daten konnte auch in L6-Muskelzellen die primäre Rolle von IRS-2 für die Vermittlung der metabolischen Insulinwirkung bestätigt werden, während die insulinstimulierte Mitogenese mit der Aktivierung der MAPK-Kaskade via IRS-1 in diesen Zellen korrelierte (Miele et al, 1999). Eine in unserer Arbeitsgruppe kürzlich durchgeführte Untersuchung zur Stimulation des Glukosetransports, einer der Hauptfunktionen der physiologischen metabolischen Insulinwirkung, konnte nach 10 minütiger Behandlung frisch isolierter adulter Kardiomyozyten der Ratte mit

Humaninsulin bzw. HMR1964 keine Beeinträchtigung der metabolischen Aktivität des Analogons trotz des völligen Fehlens einer IRS-1 Aktivierung nachweisen. Das Peptid 1964 wies eine mit Humaninsulin identische maximale metabolische Wirkung, sowohl bei sehr hohen (500 nmol/l) als auch bei physiologisch nahen (5 nmol/l) Konzentrationen auf. Diese Befunde unterstreichen in guter Übereinstimmung mit den oben angeführten Studien die sekundäre Rolle des IRS-1 bei der Vermittlung der metabolischen Aktivität des Hormons Insulin.

Darüber hinaus konnte eine in der vorliegenden Arbeit weiterführende Untersuchung zur molekularen Abgrenzung der Wirkungsspektren von Humaninsulin bzw. HMR 1964 einerseits und AspB10-Insulin andererseits, durch eine zweidimensionale Analyse von Phosphoproteinen, die nach längerer Inkubation (24 h) der Zellen mit [³³P]-Orthophosphat und den einzelnen Insulinen darstellbar sind und letztendlich an der terminalen Regulation der Effektoren auf metabolischer und mitogener Ebene beteiligt sind, die bisher erzielten Resultate bestätigen. Das durch Humaninsulin und 1964 induzierte Phosphorylierungsmuster war vergleichbar und zeichnete sich durch mehrere prominente Phosphoproteine zwischen 20 und 100 kDa im pH-Bereich 4,5 bis 5,8 aus, während das supermitogene AspB10-Insulin zu einer gesteigerten Phosphorylierung weiterer Proteine im pH-Bereich von ca. 6,5 führte. Die beobachtete Langzeitwirkung der einzelnen Peptide auf die Proteinphosphorylierung untermauert den Befund, daß Humaninsulin und das Analogon 1964 eine sehr ähnliche IGF-I Rezeptor-vermittelte Signalweiterleitung auslösen, während AspB10 einen hiervon deutlich divergenten Signalfuß ansteuert.

Die Befunde der hier vorgestellten Studien in Kombination mit unseren Daten lassen feststellen, daß das Insulinanalogon 1964 durch seine mit Humaninsulin vergleichbare IGF-I Rezeptor Signaltransduktion und vor allem durch seine einzigartige Eigenschaft, bevorzugt den IRS-2 Signalweg zu aktivieren und somit

präferentiell metabolische Wege anzusteuern, als ein besonders interessanter Kandidat für zukünftige Forschung und vielmehr für therapeutische Zwecke der Diabetesbehandlung einzuschätzen ist.

4.4. Funktionelle Bedeutung der Spezifität des Insulin- und IGF-I-Rezeptors im menschlichen Myoblastensystem

Analysen zur Aufklärung der relativen Beteiligung der homologen Insulin- und IGF-I-Rezeptoren beim physiologischen Wirkungsprofil der heterologen Liganden Insulin und IGF-I sind schon seit langem zentrales Objekt der Forschung. Jedoch wird die Interpretation solcher Vergleichsstudien der spezifischen Aktivität der beiden Rezeptoren in einem gegebenen Zelltyp primär durch drei Faktoren erschwert.

Einerseits weist jeder der Rezeptoren neben einer hohen Spezifität für seinen konjugierten Ligand auch eine 100-1000 fach schwächere Affinität für den heterologen Ligand auf, so daß bei hohen Substratkonzentrationen eine Kreuzreaktivität unvermeidlich ist (LeRoith et al., 1995; White, 1997). Dies ist durch die hohe strukturelle Homologie zwischen den α -Untereinheiten des Insulin- und IGF-I-Rezeptors gegeben, die N-terminal aus zwei β -helikalen Bereichen (L1 und L2), getrennt durch eine Cys-reiche Region (CR) bestehen, während die C-terminale Hälften drei Fibronectin Typ III-Domänen (F0, F1, F2) enthalten (Ward, 1999; Molina et al., 2000). Es wird anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen des Insulin/Rezeptor-Komplexes (Luo et al., 1999) angenommen, daß die hochaffine Ligandbindung und Rezeptoraktivierung eine Kreuzkopplung der beiden Hälften nativer Rezeptoren involviert, bedingt durch die Interaktion multipler Stellen eines einzigen Ligandmoleküls mit unterschiedlichen Regionen der zwei α -Ketten. Dieses vorgeschlagene Modell liefert zugleich eine Interpretation für die negative Kooperativität der Ligandbindung.

Andererseits ist bekannt, daß in Zellen, die den Insulin- und IGF-I- Rezeptor exprimieren, eine beträchtliche Fraktion dieser transmembranen Glykoproteine zu Hybridstrukturen mit hoher Affinität, sowohl für Insulin als auch für IGF-I, assemblieren. In einer von Bailyes und Mitarbeiter (1997) durchgeführten Studie konnte gezeigt werden, daß der Hybridisierungsgrad gewebespezifisch ist und von ca. 40% in der Leber über 70% in der Plazenta bis zu 85-90% in der Skelett- und Herzmuskulatur variieren kann. Obwohl der Regulationsmechanismus, der eine heterodimere Hybridisierung gegenüber den klassischen Rezeptoren begünstigt, völlig unbekannt ist, scheint es, daß die Hybridform den Hauptanteil des IGF-I Rezeptors im Herz- und Skelettmuskel von beiden untersuchten Spezies, Kaninchen und Mensch, repräsentiert.

Darüber hinaus kann eine Überlappung der Rezeptorfunktionen über eine gegenseitige Interphosphorylierung stattfinden. Li und Mitarbeiter (1998) berichteten, daß die C-terminale Domäne des IGF-I Rezeptors über eine direkte Interaktion die Insulinrezeptortyrosinkinase aktivieren kann.

Vor diesem Hintergrund wird es deutlich, daß zur Analyse der Spezifität und Komplementarität der Insulin- und IGF-I-Rezeptor vermittelten Signalkaskaden die Modifizierung der Struktur oder Expression eines oder mehrerer Schlüsselgene erforderlich ist. Die genetische Manipulation in Mäusen ermöglichte das Ausschalten eines spezifischen Gens durch homologe Rekombination und eröffnete dadurch neue Perspektiven für Studien zur molekularen Abgrenzung der multiplen Signalgebern. So konnten Lamothe und Mitarbeiter (1998) durch eine Studie zur metabolischen und mitogenen Aktivität von IGF-I und Insulin an von der Insulinrezeptor-Knockoutmaus stammenden Fibroblasten nachweisen, daß das IGF-I Rezeptor-System in der Tat einen alternativen Signalweg für die Vermittlung der biologischen Wirkung des Insulins darstellt. In Einklang hierzu lieferten neuste

Studien an Skelettmuskelzellen, die aus der IR-Knockoutmaus isoliert wurden, einen direkten Beweis für den IGF-I Rezeptor als alternatives System bei der Vermittlung metabolischer Effekte in ausdifferenzierten Muskelzellen (Baudry et al., 2001). Eine weitere Möglichkeit zur selektiven Analyse der Funktion eines spezifischen Signalgebers besteht in seiner Inhibition mittels Antisense-Oligonukleotiden oder blockierender Antikörper.

Angesichts der Tatsache, daß Myoblasten neben dem dominierenden Anteil an IGF-I Rezeptoren auch eine geringe Menge Insulinrezeptoren exprimieren, war es in der vorliegenden Arbeit von zentraler Bedeutung die Wirkung der einzelnen Insulinanaloga über die beiden Rezeptorsysteme abzugrenzen. Die differentielle Beteiligung des Insulin- und IGF-I- Rezeptors beim Wirkungsprofil der verschiedenen Insulinpeptide wurde in menschlichen Myoblasten mit Hilfe hochspezifischer blockierender Antikörper gegen die humanen Rezeptorfomen (Soos et al., 1986 & 1992) auf der Ebene der Aktivierung der IRS-1/2 Proteine analysiert. Die hierdurch erhobenen Resultate verdeutlichen, daß das divergente Signalmuster der einzelnen Insulinanaloga über beide Rezeptoren vermittelt wird, da ihre jeweilige Blockade zur Reduktion bzw. Inhibition der Signalübertragung über die IRS Proteine führte. Jedoch war der relative Beitrag des Insulin- und IGF-I-Rezeptors zur spezifischen Signalweiterleitung über diese Adapterproteine unterschiedlich. Es ließ sich eine differentielle Auswirkung der Blockade der beiden Rezeptoren auf die durch die verschiedenen Insuline induzierte IRS-1 Phosphorylierung feststellen, die sich durch eine gleichstarke, ca. 50%ige Hemmung des IRS-1 Signals über beide Rezeptorsysteme bei Humaninsulin und eine signifikante 50%ige Inhibition durch das Ausschalten des Insulin- bzw IGF-I- Rezeptors bei den Analoga 1964 und AspB10 entsprechend auszeichnete.

Im Gegensatz hierzu wurde bei allen Insulinen ein einheitlicher Hemmeffekt auf die IRS-2 Aktivierung beobachtet, der aus einer ca. 70-80%igen Inhibition der Tyrosinphosphorylierung durch das Blockieren des IGF-I Rezeptors und einer im Mittel 5-10%igen Reduktion durch das Ausschalten des Insulinrezeptors bestand. Zusammengefasst deuten unsere Befunde darauf hin, daß in proliferierenden Myoblasten das IRS-1 als ein gemeinsames Substrat für beide Rezeptoren agiert, während IRS-2 präferentiell über den IGF-I Rezeptor phosphoryliert wird. Dies unterstützt die These einer differentiellen Interaktion der Rezeptoren mit den nachgeschalteten Signalgebern und somit der Ansteuerung spezifischer intrazellulärer Wege.

Neben der zentralen, gut etablierten Rolle von IRS-2 bei der Vermittlung metabolischer Effekte demonstrierten neuere Studien die fundamentale Bedeutung dieses Adapterproteins für die β -Zell-Funktion und Entwicklung der Pathogenese des nicht Insulin-abhängigen Diabetes mellitus Typ 2 (Übersichtsartikel: Shaler, 1998). Um die spezifische funktionelle Bedeutung der IRS-1/2 Proteine in den β -Zellen definieren zu können, inaktivierten Withers und Mitarbeiter (1998) die entsprechenden Gene mittels homologer Rekombination in Mäusen und studierten die daraus resultierten phenotypischen Veränderungen in den Pankreasinseln solcher transgenen Tiere. Die IRS-1-Knockoutmaus erreichte trotz Glukoseintoleranz nicht das Diabetes-Stadium aufgrund der kompensatorischen IRS-2 vermittelten Induktion von β -Zell-Hyperplasie und Hyperinsulinämie. Im Gegensatz dazu wurde bei der IRS-2-Knockoutmaus eine ähnliche kompensatorische Wirkung über IRS-1 nicht beobachtet, was konsekutiv, bedingt durch eine deutliche β -Zellmasse-Reduktion verstärkte Insulinresistenz, zur Diabetesentwicklung führte. Kubota und Mitarbeiter (2000) beobachteten in Analogie zu diesen Befunden eine 83%ige Reduktion der β -Zellmasse in der IRS-2-Knockoutmaus, im Gegensatz zu

einer 85%igen Steigerung in der IRS-1-Defizitmaus gegenüber dem Wildtyp. Andererseits war die ex vivo untersuchte, glukosestimulierte Insulinsekretion, bei gleicher Anzahl von β -Zellen in der IRS-2^{-/-} Maus verstärkt und im IRS-1^{-/-} Modell reduziert, bezogen auf die Kontrolltiere. Diese Resultate unterstreichen die differentielle Rolle der IRS-1/2 Proteine in der Regulation der β -Zellmasse und -Funktion. Letzteres wird auch unterstützt durch Studien mit der natürlich vorkommenden Gly972->Arg IRS-1 Variante, die zu einer beeinträchtigten Insulinsekretion in pankreatischen β -Zellen zu führen scheint (Porzio et al., 1999).

Das selektive Ausschalten des Insulin- bzw. IGF-I-Rezeptors in Mäusen führte ebenfalls zu unterschiedlichen Phenotypen und ermöglichte eine Differenzierung ihrer Funktionen. Das Inaktivieren des Insulinrezeptor- oder IGF-I Rezeptor-Gens resultierte im frühen postnatalen Tod, verursacht durch Diabetes (Accili et al., 1996) bzw. starke Wachstumsbeeinträchtigung (Liu et al., 1993). Analoge Studien an transgenen Mäusen mit Fehlen der β -Zell-Insulinrezeptoren zeigten den Verlust einer akuten glukosestimulierten Insulinsekretion, jedoch keine Veränderung in der β -Zell Anzahl und somit keine Diabetesentwicklung (Kulkarni et al., 1999), wohingegen die IGF-I Rezeptoren eine elementare Rolle beim β -Zellwachstum einzunehmen scheinen (Withers et al., 1999). Durch Kreuzen von Mäusen, heterozygot für Null-Allele der IGF-I Rezeptor- und IRS-2-Gene, konnten Withers und Mitarbeiter (1999) nachweisen, daß die IGF-I Rezeptor-induzierte Entwicklung der Inselzellen während der Embryogenese sowie die β -Zell Proliferation und Erhaltung im postnatalen Wachstum und als Antwort auf eine periphere Insulinresistenz über den IRS-2 Signalweg vermittelt wird. Im Einklang hierzu berichteten Zhang et al. (1998), daß die IGF-I induzierte DNA-Synthese in der insulinsekretorischen Zelllinie RINm5F mit einer gesteigerten Aktivierung des IGF-I Rezeptors und Tyrosinphosphorylierung des

Adapterproteins IRS-2 einherging. In völliger Deckung konnte auch durch eine Studie an der pankreatischen β -Zelllinie INS-1 eine Korrelation zwischen der IGF-I induzierten Zellproliferation und einer gesteigerten IRS-2 Tyrosinphosphorylierung und nachfolgender PI3-K-Assoziation nachgewiesen werden (Hügl et al., 1998).

In Kombination lassen die hier vorgestellten Befunde ein Konzept der β -Zellfunktion erstellen, daß sich aus zwei Determinanten zusammensetzt, dem Insulinrezeptor/IRS-1 Weg einerseits, der die β -Zell-Insulinsekretion reguliert und dem IGF-I Rezeptor/IRS-2 Weg andererseits, der für das β -Zellwachstum erforderlich ist. Darüber hinaus deuten die Daten darauf hin, daß das Adapterprotein IRS-2 über die Koordinierung der Insulineffekte in peripheren Zielgeweben und der IGF-I induzierten wachstumsfördernden Wirkung in β -Zellen die Aufrechterhaltung der Glukosehomöostase kontrolliert. Die Erkenntnis, daß der proliferative und antiapoptotische Effekt von IGF-I in β -Zellen über den IGF-I Rezeptor/IRS-2 Signalweg vermittelt wird, in Kombination mit unserem Befund, daß das Insulinanalogon 1964 präferentiell eine IGF-I Rezeptor-vermittelte IRS-2 Aktivierung induziert, läßt vermuten, daß dieses modifizierte Insulinpeptid möglicherweise eine zu IGF-I analoge antiapoptotische Wirkung in den pankreatischen insulinsekretorischen Zellen aufweisen könnte. Vor diesem Hintergrund und unter Berücksichtigung der Tatsache, daß das Analogon 1964 eine mit dem nativen Humaninsulin vergleichbare maximale metabolische und mitogene Aktivität zeigt, wird deutlich, daß seine bevorzugte IGF-I Rezeptor-vermittelte IRS-2 Stimulation von potentieller klinischer Relevanz wäre, nicht nur bei der konventionellen Insulintherapie, sondern auch zur Prävention der Typ 2 Diabetes Manifestation durch Verhinderung der im prädiabetischen Stadium eintretenden β -Zelldestruktion.

Das Insulinanalogon 1964 besitzt in diesem Kontext den entscheidenden Vorteil gegenüber IGF-I, daß es sogar unter supraphysiologischen Konzentrationen, wie es in unserer Studie der Fall war, kein verstärktes mitogenes Potential aufweist. Vielmehr zeigt es die einzigartige Eigenschaft über eine bevorzugte IGF-I Rezeptor Aktivierung spezifisch metabolische Wege anzusteuern. Umfangreiche in vivo und in vitro Untersuchungen in Pankreaszellen sind jedoch erforderlich, um die Annahme der Schutzwirkung des Analogons HMR1964 gegen den programmierten β -Zelltod und somit seiner potentiellen therapeutischen Anwendbarkeit gegen die Progression und Manifestation der Typ 2 Diabetes Erkrankung zu bestätigen.

5. Zusammenfassung

Die pharmakologische Korrektur der postprandialen Hyperglykämie ist von zentraler Bedeutung für die Behandlung des Diabetes mellitus. Die Zahl der hierfür einsetzbaren Substanzen ist jedoch gering und ihre Wirksamkeit in vielen Fällen eingeschränkt. Mit Hilfe der Gentechnik wurden in den letzten Jahren verschiedene neue, modifizierte Insuline synthetisiert, deren Wirkprofile den Anforderungen eines optimalen Therapiekonzeptes bereits sehr weitreichend erfüllen. Somit eröffnen Insulinanaloga eine neue Perspektive der Insulintherapie und es ist zu erwarten, daß der Einsatz von kurz- und langwirksamen Insulinen zu einer deutlich verbesserten metabolischen Kontrolle sowohl bei Typ 1 als auch bei Typ 2 Diabetikern beiträgt. Der klinische Einsatz solcher modifizierter Insulinpeptide bedarf jedoch eine detaillierte Charakterisierung ihrer Signalauslösung und Wirksamkeit, was von außerordentlicher Wichtigkeit mit Hinblick auf die potentiellen mitogenen Effekte ist. In diesem Kontext erfordert neben dem Insulinrezeptor speziell auch der IGF-I Rezeptor besondere Beachtung, da er für die Vermittlung der Zellzyklusprogression und Mitogenese von primärer Bedeutung ist. Der IGF-I Rezeptor vermittelt jedoch auch metabolische Effekte und es ist gegenwärtig unklar, durch welche molekularen Mechanismen die mitogene und metabolische Wirkung differentiell angesteuert werden kann und welche Bedeutung in diesem Zusammenhang den verschiedenen Insulinanaloga zukommt.

Vor diesem Hintergrund wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Signaltransduktion durch die neuen, schnellwirksamen Insulinanaloga HMR1964 und HMR1153 auf verschiedenen Ebenen an Myoblasten bzw. adulten Kardiomyozyten analysiert und mit den Wirkungsspektren vom nativen Humaninsulin und dem supermitogenen AspB10-Insulin verglichen.

Die molekulare Analyse der initialen Prozesse auf der Rezeptorebene in K6-Myoblasten deutete auf eine deutliche Divergenz der Signalauslösung durch die verschiedenen Insuline hin. Während das Analogon 1153 und AspB10-Insulin eine erhöhte Bindungsaffinität aufwiesen, die zu einer verstärkten IGF-I Rezeptoraktivierung führte, zeigte das Analogon 1964 ein mit dem nativen Humaninsulin equivalentes Bindungspotential, induzierte jedoch eine davon abweichende, mit AspB10-Insulin vergleichbare Rezeptorautophosphorylierung. Diese Diskrepanz zwischen Rezeptorinteraktion und Aktivierung wies auf eine differentielle rezeptorvermittelte Prozessierung der Insuline hin.

Tatsächlich konnten durch Untersuchung des Internalisations- und Abbauprozesses der einzelnen Peptide deutliche Unterschiede bei ihrer Prozessierung durch die Myoblasten beobachtet werden. Die Inkubation der K6-Myoblasten mit ¹²⁵I-markierten Liganden induzierte einen schnellen Endozytoseprozeß für die Insuline 1153 und AspB10, während die stimulierte Internalisierungsrate von Humaninsulin und 1964 deutlich geringer war. Die schnellste intrazelluläre Degradierung wurde für Humaninsulin und 1153 gemessen, im Gegensatz hierzu schienen die Analoga 1964 und AspB10 deutlich länger in der Zelle intakt zu bleiben.

Aus diesen Daten ließ sich folgern, daß eine Differenzierung der Signalauslösung bereits auf der Rezeptorebene stattfindet und daß die Rezeptorphosphorylierung und/oder Internalisierung eine zusätzlich Stufe der Spezifität erzeugt. Es lag die Vermutung nahe, daß die differentielle Interaktionen zwischen den Analoga und dem Rezeptor, bedingt durch die strukturelle Modifikation des Insulinmoleküls, möglicherweise die Rezeptor-Konformation unterschiedlich beeinflussen und das Gleichgewicht in die Richtung eines stabileren Ligand/Rezeptor-Komplexes verschieben könnten.

Die weitere Untersuchung umfaßte die Wirkung der einzelnen Insuline auf die Aktivierung intrazellulärer zentraler Signalgeber mit Schwerpunkt auf dem Vergleich zwischen dem mitogenen Shc/MAP-Kinaseweg und der IRS1/2-Signalkaskade. Es konnte nachgewiesen werden, daß HMR1153 eine prominente Steigerung der Shc Phosphorylierung und MAP-Kinase Aktivierung erzeugte, die sogar noch stärker als die des supermitogenen AspB10-Insulins war. Die Wirkung von Humaninsulin und HMR1964 auf die Aktivierung der Shc/MAPK-Kaskade war im Mittel 80% geringer im Vergleich zu 1153. Die Analyse auf der Ebene der IRS Proteine führte zu einer weiteren molekularen Abgrenzung der Wirkungsspektren der untersuchten Insulinpeptide. Humaninsulin bewirkte die stärkste IRS-1 und IRS-2 Tyrosinphosphorylierung, während AspB10 und 1153 eine schwächere Stimulation erzeugten. Sehr auffällig war dabei das Wirkungsprofil von 1964, das sich durch eine marginale (2 fache) IRS-1 Aktivierung, jedoch durch eine 20 fache IRS-2 Phosphorylierung auszeichnete. Zur Verifizierung wurden diese Befunde in menschlichen Myoblasten und adulten Kardiomyozyten überprüft und bestätigt. Die erhobenen Resultate deuten darauf hin, daß die besonderen Eigenschaften von HMR1964, die in einer bevorzugten Signalauslösung über den IRS-2 Weg bestehen und somit präferentiell metabolische Wege ansteuern, dieses Analogon als einen interessanten Kandidaten für die Insulintherapie auszeichnen. Weiterhin ließ sich die Hypothese aufstellen, daß es Strukturelemente im Insulinmolekül gibt, die unabhängig von Bindung, Prozessierung und Phosphorylierungsgrad unterschiedliche Phosphorylierungsmuster am Rezeptor erzeugen, die seine differentielle Interaktion mit den nachgeschalteten Signalgebern induzieren und somit das Insulinsignal in die mitogene oder metabolische Richtung lenken.

Diese These wurde durch die Analyse der Langzeitwirkung der verschiedenen Insuline auf die DNA-Synthese unterstrichen. Auf dieser Ebene distal vom IGF-I-

bzw. Insulinrezeptor ließ sich die oberhalb ermittelte deutlich divergente Signaltransmission der einzelnen Analoga bestätigen und zwar durch die Beobachtung, daß 1153 und AspB10-Insulin eine verstärkte Stimulation der DNA-Synthese in K6-Myoblasten induzierten, während das Analogon 1964 eine zu Humaninsulin äquivalente mitogene Wirkung aufwies. Ein mit Humaninsulin vergleichbares Wirkungsprofil des Analogons 1964 konnte außerdem in bezug auf die maximale metabolische Aktivität durch Messung des Glukosetransports in adulten Kardiomyozyten nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte in Übereinstimmung hierzu eine zweidimensionale Analyse von Phosphoproteinen, die letztendlich an der terminalen Regulation der Effektoren auf metabolischer und mitogener Ebene beteiligt sind, den Befund untermauern, daß Humaninsulin und 1964 eine sehr ähnliche Signalweiterleitung auslösen, während AspB10 einen hiervon deutlich unterschiedlichen Signalfluß ansteuert.

Schließlich wurde die differentielle Wirkung der einzelnen Insulinanaloga über den Insulin- bzw. IGF-I Rezeptor und die in diesem Kontext individuelle Beteiligung der IRS Proteine in menschlichen Skelettmuskelzellen durch selektive Inhibition der beiden Rezeptorsysteme mittels hochspezifischer blockierender Antikörper erfaßt. Es ließ sich feststellen, daß in proliferierenden Myoblasten das IRS-1 als ein gemeinsames Substrat für beide Rezeptoren agiert, wohingegen IRS-2 präferentiell über den IGF-I Rezeptor phosphoryliert wird. In Analogie zu der antiapoptotischen Wirkung von IGF-I, dem physiologischen Substrat des IGF-I Rezeptors, die in Pankreaszellen über eine verstärkte IRS-2 Aktivierung vermittelt wird, läßt die durch 1964 induzierte IGF-I rezeptorvermittelte präferentielle Ansteuerung des IRS-2 Signalweges auf eine potentielle ähnliche Wirkung dieses Analogons spekulieren, die von herausragender therapeutischer Bedeutung für die Prävention der progressiven β -Zelldestruktion im frühen Stadium der Typ 2 Diabetes Erkrankung wäre.

6. Literatur

Accili D, Drago J, Lee EJ, Johnson MD, Cool MH, Salvatore P, Asico LD, Jose PA, Taylor SI, Westphal H (1996) Early neonatal death in mice homozygous for a null allele of the insulin receptor gene. *Nat Genet* 12:106-9.

Aguilar-Bryan L, Nichols CG, Wechsler SW, Clement JPt, Boyd AE, 3rd, Gonzalez G, Herrera-Sosa H, Nguy K, Bryan J, Nelson DA (1995) Cloning of the beta cell high-affinity sulfonyleurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science* 268:423-6.

Ahmed AB, Home PD (1998) Optimal provision of daytime NPH insulin in patients using the insulin analog lispro. *Diabetes Care* 21:1707-13.

Ahmed AB, Home PD (1998) The effect of the insulin analog lispro on nighttime blood glucose control in type 1 diabetic patients. *Diabetes Care* 21:32-7.

Ahmed AB, Mallias J, Home PD (1998) Optimization of evening insulin dose in patients using the short-acting insulin analog lispro. *Diabetes Care* 21:1162-6.

Almind K, Bjorbaek C, Vestergaard H, Hansen T, Echwald S, Pedersen O (1993) Aminoacid polymorphisms of insulin receptor substrate-1 in non-insulin- dependent diabetes mellitus. *Lancet* 342:828-32.

Almind K, Frederiksen SK, Bernal D, Hansen T, Ambye L, Urhammer S, Ekstrom CT, Berglund L, Reneland R, Lithell H, White MF, Van Obberghen E, Pedersen O (1999) Search for variants of the gene-promoter and the potential phosphotyrosine encoding sequence of the insulin receptor substrate-2 gene: evaluation of their relation with alterations in insulin secretion and insulin sensitivity. *Diabetologia* 42:1244-9.

Authier F, Di Guglielmo GM, Danielsen GM, Bergeron JJ (1998) Uptake and metabolic fate of [HisA8,HisB4,GluB10,HisB27]insulin in rat liver in vivo. *Biochem J* 332:421-30.

Authier F, Posner BI, Bergeron JJ (1996) Endosomal proteolysis of internalized proteins. *FEBS Lett* 389:55-60.

Backer JM, Kahn CR, Cahill DA, Ullrich A, White MF (1990) Receptor-mediated internalization of insulin requires a 12-amino acid sequence in the juxtamembrane region of the insulin receptor beta- subunit. *J Biol Chem* 265:16450-4.

Backer JM, Kahn CR, White MF (1989) Tyrosine phosphorylation of the insulin receptor during insulin- stimulated internalization in rat hepatoma cells. *J Biol Chem* 264:1694-701.

Bahr M, Kolter T, Seipke G, Eckel J (1997) Growth promoting and metabolic activity of the human insulin analogue [GlyA21,ArgB31,ArgB32]insulin (HOE 901) in muscle cells. *Eur J Pharmacol* 320:259-65.

- Baillyes EM, Nave BT, Soos MA, Orr SR, Hayward AC, Siddle K** (1997) Insulin receptor/IGF-I receptor hybrids are widely distributed in mammalian tissues: quantification of individual receptor species by selective immunoprecipitation and immunoblotting. *Biochem J* 327:209-15.
- Baker EN, Blundell TL, Cutfield JF, Cutfield SM, Dodson EJ, Dodson GG, Hodgkin DM, Hubbard RE, Isaacs NW, Reynolds CD, et al.** (1988) The structure of 2Zn pig insulin crystals at 1.5 Å resolution. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 319:369-456.
- Banting FG, Best CH, Collip JB, Campbell WR, Fletcher AA** (1922) Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus. *Can. Med. Assoc. J.* 12:141-146
- Baudry A, Lamothe B, Bucchini D, Jami J, Montarras D, Pinset C, Joshi RL** (2001) IGF-1 receptor as an alternative receptor for metabolic signaling in insulin receptor-deficient muscle cells. *FEBS Lett* 488:174-8.
- Beguinet F, Smith RJ, Kahn CR, Maron R, Moses AC, White MF** (1988) Phosphorylation of insulin-like growth factor I receptor by insulin receptor tyrosine kinase in intact cultured skeletal muscle cells. *Biochemistry* 27:3222-8.
- Berchtold H, Hilgenfeld R** (1999) Binding of phenol to R6 insulin hexamers. *Biopolymers* 51:165-72
- Berhanu P, Anderson C, Hickman M, Ciaraldi TP** (1997) Insulin signal transduction by a mutant human insulin receptor lacking the NPEY sequence. Evidence for an alternate mitogenic signaling pathway that is independent of Shc phosphorylation. *J Biol Chem* 272:22884-90.
- Berti L, Kellerer M, Bossenmaier B, Seffer E, Seipke G, Haring HU** (1998) The long acting human insulin analog HOE 901: characteristics of insulin signalling in comparison to Asp(B10) and regular insulin. *Horm Metab Res* 30:123-9.
- Bevan AP, Seabright PJ, Tikerpae J, Posner BI, Smith GD, Siddle K** (2000) The role of insulin dissociation from its endosomal receptor in insulin degradation. *Mol Cell Endocrinol* 164:145-57.
- Bi RC, Dauter Z, Dodson E, Dodson G, Giordano F, Reynolds C** (1984) Insulin's structure as a modified and monomeric molecule. *Biopolymers* 23:391-395
- Biener Y, Feinstein R, Mayak M, Kaburagi Y, Kadowaki T, Zick Y** (1996) Annexin II is a novel player in insulin signal transduction. Possible association between annexin II phosphorylation and insulin receptor internalization. *J Biol Chem* 271:29489-29496
- Blenis J** (1993) Signal transduction via the MAP kinases: proceed at your own RSK. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:5889-92.
- Bliss M** (1982) Banting's, Best's, and Collip's accounts of the discovery of insulin. *Bull Hist Med* 56:554-68.

Bolli GB, Di Marchi RD, Park GD, Pramming S, Koivisto VA (1999) Insulin analogues and their potential in the management of diabetes mellitus. *Diabetologia* 42:1151-67.

Boney CM, Gruppuso PA, Faris RA, Frackelton AR, Jr. (2000) The critical role of Shc in insulin-like growth factor-I-mediated mitogenesis and differentiation in 3T3-L1 preadipocytes. *Mol Endocrinol* 14:805-13.

Bornfeldt KE, Gidlof RA, Wasteson A, Lake M, Skottner A, Arnqvist HJ (1991) Binding and biological effects of insulin, insulin analogues and insulin-like growth factors in rat aortic smooth muscle cells. Comparison of maximal growth promoting activities. *Diabetologia* 34:307-13.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-54.

Brange J, Volund A (1999) Insulin analogs with improved pharmacokinetic profiles. *Adv Drug Deliv Rev* 35:307-335.

Breidenbach A, Fuhrmann H, Deegen E, Lindholm A, Sallmann HP (1999) Studies on equine lipid metabolism. 2. Lipolytic activities of plasma and tissue lipases in large horses and ponies. *Zentralbl Veterinarmed A* 46:39-48.

Brunelle BL, Llewelyn J, Anderson JH, Jr., Gale EA, Koivisto VA (1998) Meta-analysis of the effect of insulin lispro on severe hypoglycemia in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 21:1726-31.

Brunetti A, Maddux BA, Wong KY, Goldfine ID (1989) Muscle cell differentiation is associated with increased insulin receptor biosynthesis and messenger RNA levels. *J Clin Invest* 83:192-8.

Bruning JC, Winnay J, Cheatham B, Kahn CR (1997) Differential signaling by insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and IRS-2 in IRS-1-deficient cells. *Mol Cell Biol* 17:1513-21.

Burgess JW, Wada I, Ling N, Khan MN, Bergeron JJ, Posner BI (1992) Decrease in beta-subunit phosphotyrosine correlates with internalization and activation of the endosomal insulin receptor kinase. *J Biol Chem* 267:10077-10086

Buse J (2000) Insulin glargine (HOE901): first responsibilities: understanding the data and ensuring safety. *Diabetes Care* 23:576-8.

Butler AA, Yakar S, Gewolb IH, Karas M, Okubo Y, LeRoith D (1998) Insulin-like growth factor-I receptor signal transduction: at the interface between physiology and cell biology. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 121:19-26.

Carpentier JL (1994) Insulin receptor internalization: molecular mechanisms and physiopathological implications. *Diabetologia* 37 Suppl 2:S117-24.

Carpentier JL, Gorden P, Amherdt M, Van Obberghen E, Kahn CR, Orci L (1978) 125I-insulin binding to cultured human lymphocytes. Initial localization and fate of hormone determined by quantitative electron microscopic autoradiography. *J Clin Invest* 61:1056-70.

Carpentier JL, Paccaud JP, Backer J, Gilbert A, Orci L, Kahn CR, Baecker J (1993) Two steps of insulin receptor internalization depend on different domains of the beta-subunit. *J Cell Biol* 122:1243-52.

Ceresa BP, Kao AW, Santeler SR, Pessin JE (1998) Inhibition of clathrin-mediated endocytosis selectively attenuates specific insulin receptor signal transduction pathways. *Mol Cell Biol* 18:3862-70.

Chaika OV, Chaika N, Volle DJ, Hayashi H, Ebina Y, Wang LM, Pierce JH, Lewis RE (1999) Mutation of tyrosine 960 within the insulin receptor juxtamembrane domain impairs glucose transport but does not inhibit ligand-mediated phosphorylation of insulin receptor substrate-2 in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 274:12075-80.

Chan SJ, Keim P, Steiner DF (1976) Cell-free synthesis of rat preproinsulins: characterisation and partial amino acid sequence determination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73:1964

Chi MM, Schlein AL, Moley KH (2000) High insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and insulin concentrations trigger apoptosis in the mouse blastocyst via down-regulation of the IGF-1 receptor. *Endocrinology* 141:4784-92.

Chow JC, Condorelli G, Smith RJ (1998) Insulin-like growth factor-I receptor internalization regulates signaling via the Shc/mitogen-activated protein kinase pathway, but not the insulin receptor substrate-1 pathway. *J Biol Chem* 273:4672-80.

Cobb MH, Goldsmith EJ (1995) How MAP kinases are regulated. *J Biol Chem* 270:14843-6.

Colditz GA, Willett WC, Stampfer MJ, Manson JE, Hennekens CH, Arky RA, Speizer FE (1990) Weight as a risk factor for clinical diabetes in women. *Am J Epidemiol* 132:501-13.

Coniff RF, Shapiro JA, Seaton TB, Bray GA (1995) Multicenter, placebo-controlled trial comparing acarbose (BAY g 5421) with placebo, tolbutamide, and tolbutamide-plus-acarbose in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Med* 98:443-51.

Cook DL, Taborsky GJ (1997) B-cell function and insulin secretion. In: Porte D., Sherwin R.S. (eds) *Ellenberg & Rifkin's Diabetes mellitus*. Appleton & Lange, Stamford, 5th ed. 49-73

Cuatrecasas P (1971) Insulin--receptor interactions in adipose tissue cells: direct measurement and properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68:1264-8.

De Meyts P (1993) The diabetogenes concept of NIDDM. *Adv Exp Med Biol* 334:89-100

- De Meyts P, Christoffersen CT, Urso B, Wallach B, Gronskov K, Yakushiji F, Shymko RM** (1995) Role of the time factor in signaling specificity: application to mitogenic and metabolic signaling by the insulin and insulin-like growth factor-I receptor tyrosine kinases. *Metabolism* 44:2-11.
- De Meyts P, Urso B, Christoffersen CT, Shymko RM** (1995) Mechanism of insulin and IGF-I receptor activation and signal transduction specificity. Receptor dimer cross-linking, bell-shaped curves, and sustained versus transient signaling. *Ann N Y Acad Sci* 766:388-401.
- DeMeyts P, Christoffersen CT, Urso B, Ish-Shalom D, Sacerdoti-Sierra N, Drejer K, Schäffer L, Shymko RM, Naor D** (1993) Insulin's potency as a mitogen is determined by the half-life of the insulin-receptor complex. *Exp. Clin. Endocrinol.* 101 (Suppl 2):22
- Di Guglielmo GM, Baass PC, Ou WJ, Posner BI, Bergeron JJ** (1994) Compartmentalization of SHC, GRB2 and mSOS, and hyperphosphorylation of Raf-1 by EGF but not insulin in liver parenchyma. *Embo J* 13:4269-77.
- Di Guglielmo GM, Drake PG, Baass PC, Authier F, Posner BI, Bergeron JJ** (1998) Insulin receptor internalization and signalling. *Mol Cell Biochem* 182:59-63.
- Dideriksen LH, Jorgensen LN, Drejer K** (1992) Carcinogenic effect on female rats after 12 months administration of the insulin analogue B(10) Asp (Abstract). *Diabetes* 41:A143
- Docherty K, Steiner DF** (1997) Molecular and cellular biology of the beta-cell. In: *Porte D., Sherwin, R.S. (eds) Ellenberg & Rifkin's Diabetes mellitus, Appleton & Lange, Stamford. 5th ed. 29-48*
- Dransfeld O, Uphues I, Sasson S, Schurmann A, Joost HG, Eckel J** (2000) Regulation of subcellular distribution of GLUT4 in cardiomyocytes: Rab4A reduces basal glucose transport and augments insulin responsiveness. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 108:26-36
- Drejer K** (1992) The bioactivity of insulin analogues from in vitro receptor binding to in vivo glucose uptake. *Diabetes Metab Rev* 8:259-85.
- Drejer K, Kruse V, Larsen UD, Hougaard P, Bjorn S, Gammeltoft S** (1991) Receptor binding and tyrosine kinase activation by insulin analogues with extreme affinities studied in human hepatoma HepG2 cells. *Diabetes* 40:1488-95.
- Dreyer M, Pein M, Schmidt B, Heidtmann B, Schlunzen N, Roskamp R** (1994) Comparison of the pharmacokinetics/dynamics of GLY(A21)-ARG(B31,B32)-human-insulin (HOE71GT) with NPH-insulin following subcutaneous injection by using euglycemic clamp technique (Abstract). *Diabetologia* 37 (Suppl 1):A78
- Duan C, Bauchat JR, Hsieh T** (2000) Phosphatidylinositol 3-kinase is required for insulin-like growth factor-I-induced vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Circ Res* 86:15-23.

- Eckel J, Pandalis G, Reinauer H** (1983) Insulin action on the glucose transport system in isolated cardiocytes from adult rat. *Biochem J* 212:385-92.
- Eckel J, Reinauer H** (1985) The insulin receptor of adult heart muscle cells. *Basic Res Cardiol* 80:61-4.
- Eckel J, Reinauer H** (1988) Involvement of hormone processing in insulin-activated glucose transport by isolated cardiac myocytes. *Biochem J* 249:111-6.
- Edelstein SL, Knowler WC, Bain RP, Andres R, Barrett-Connor EL, Dowse GK, Haffner SM, Pettitt DJ, Sorkin JD, Muller DC, Collins VR, Hamman RF** (1997) Predictors of progression from impaired glucose tolerance to NIDDM: an analysis of six prospective studies. *Diabetes* 46:701-10.
- Farooq A, Plotnikova O, Zeng L, Zhou MM** (1999) Phosphotyrosine binding domains of Shc and insulin receptor substrate 1 recognize the NPXpY motif in a thermodynamically distinct manner. *J Biol Chem* 274:6114-21.
- Fleischer W** (1999) Regulation der Insulinempfindlichkeit bei menschlichen Skelettmuskelzellen. *Diplomarbeit, HHU-Düsseldorf*
- Frattali AL, Treadway JL, Pessin JE** (1992) Transmembrane signaling by the human insulin receptor kinase. Relationship between intramolecular beta subunit trans- and cis- autophosphorylation and substrate kinase activation. *J Biol Chem* 267:19521-8.
- Freychet P, Roth J, Neville DM, Jr.** (1971) Insulin receptors in the liver: specific binding of (125 I)insulin to the plasma membrane and its relation to insulin bioactivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68:1833-7.
- Frodin M, Gammeltoft S** (1999) Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction. *Mol Cell Endocrinol* 151:65-77.
- Furlanetto RW** (1988) Receptor-mediated endocytosis and lysosomal processing of insulin-like growth factor I by mitogenically responsive cells. *Endocrinology* 122:2044-53.
- Galloway JA** (1993) New directions in drug development: mixtures, analogues, and modeling. *Diabetes Care* 16 Suppl 3:16-23.
- Galloway JA, Chance RE** (1994) Improving insulin therapy: achievements and challenges. *Horm Metab Res* 26:591-8.
- Gammeltoft S** (1984) Insulin receptors: binding kinetics and structure-function relationship of insulin. *Physiol Rev* 64:1321-78.
- Giorgetti S, Pelicci PG, Pelicci G, Van Obberghen E** (1994) Involvement of Src-homology/collagen (SHC) proteins in signaling through the insulin receptor and the insulin-like-growth-factor-I- receptor. *Eur J Biochem* 223:195-202.

Gorden P, Carpentier JL, Freychet P, LeCam A, Orci L (1978) Intracellular translocation of iodine-125-labeled insulin: direct demonstration in isolated hepatocytes. *Science* 200:782-5.

Group TDCaCTR (1993) The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 329:977-86.

Haffner SM, Miettinen H, Gaskill SP, Stern MP (1996) Decreased insulin action and insulin secretion predict the development of impaired glucose tolerance. *Diabetologia* 39:1201-7.

Hamel FG, Siford GL, Fawcett J, Chance RE, Frank BH, Duckworth WC (1999) Differences in the cellular processing of AspB10 human insulin compared with human insulin and LysB28ProB29 human insulin. *Metabolism* 48:611-7.

Hansen BF, Danielsen GM, Drejer K, Sorensen AR, Wiberg FC, Klein HH, Lundemose AG (1996) Sustained signalling from the insulin receptor after stimulation with insulin analogues exhibiting increased mitogenic potency. *Biochem J* 315:271-9.

Heinemann L, Heise T, Wahl LC, Trautmann ME, Ampudia J, Starke AA, Berger M (1996) Prandial glycaemia after a carbohydrate-rich meal in type I diabetic patients: using the rapid acting insulin analogue [Lys(B28), Pro(B29)] human insulin. *Diabet Med* 13:625-9.

Heinemann L, Linkeschova R, Rave K, Hompesch B, Sedlak M, Heise T (2000) Time-action profile of the long-acting insulin analog insulin glargine (HOE901) in comparison with those of NPH insulin and placebo. *Diabetes Care* 23:644-9.

Heinemann L, Starke AA, Heding L, Jensen I, Berger M (1990) Action profiles of fast onset insulin analogues. *Diabetologia* 33:384-6.

Heinemann L, Weyer C, Rauhaus M, Heinrichs S, Heise T (1998) Variability of the metabolic effect of soluble insulin and the rapid- acting insulin analog insulin aspart. *Diabetes Care* 21:1910-4.

Heller-Harrison RA, Morin M, Czech MP (1995) Insulin regulation of membrane-associated insulin receptor substrate 1. *J Biol Chem* 270:24442-50.

Heukeshoven J, Dernick R (1985) Simplified method of silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* 6:103-112

Hildebrandt P, Sejrsen P, Nielsen SL, Birch K, Sestoft L (1985) Diffusion and polymerization determines the insulin absorption from subcutaneous tissue in diabetic patients. *Scand J Clin Lab Invest* 45:685-90.

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

- Home P** (1999) Insulin glargine: the first clinically useful extended-acting insulin in half a century? *Exp. Opin. Invest. Drugs.* 8:307-314
- Home PD, Barriocanal L, Lindholm A** (1999) Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of the novel rapid- acting insulin analogue, insulin aspart, in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 55:199-203.
- Home PD, Lindholm A, Hylleberg B, Round P** (1998) Improved glycemic control with insulin aspart: a multicenter randomized double-blind crossover trial in type 1 diabetic patients. UK Insulin Aspart Study Group. *Diabetes Care* 21:1904-9.
- Howey DC, Bowsher RR, Brunelle RL, Woodworth JR** (1994) [Lys(B28), Pro(B29)]-human insulin. A rapidly absorbed analogue of human insulin. *Diabetes* 43:396-402.
- Hsu D, Knudson PE, Zapf A, Rolband GC, Olefsky JM** (1994) NPXY motif in the insulin-like growth factor-I receptor is required for efficient ligand-mediated receptor internalization and biological signaling. *Endocrinology* 134:744-50.
- Hubbard SR, Wei L, Ellis L, Hendrickson WA** (1994) Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor. *Nature* 372:746-54.
- Hugl SR, White MF, Rhodes CJ** (1998) Insulin-like growth factor I (IGF-I)-stimulated pancreatic beta-cell growth is glucose-dependent. Synergistic activation of insulin receptor substrate-mediated signal transduction pathways by glucose and IGF-I in INS-1 cells. *J Biol Chem* 273:17771-9.
- Jorgensen LN, Dideriksen LH, Drejer K** (1992) Carcinogenic effect of the human insulin analog B-10 Asp in female rats. (Abstract). *Diabetologia* 35 (Suppl 1):A3
- Jorgensen S, Vaag A, Langkjaer L, Hougaard P, Markussen J** (1989) NovoSol Basal: pharmacokinetics of a novel soluble long acting insulin analogue. *Bmj* 299:415-9.
- Kahn CR** (1995) Diabetes. Causes of insulin resistance. *Nature* 373:384-5.
- Kato H, Faria TN, Stannard B, Roberts CT, Jr., LeRoith D** (1994) Essential role of tyrosine residues 1131, 1135, and 1136 of the insulin- like growth factor-I (IGF-I) receptor in IGF-I action. *Mol Endocrinol* 8:40-50.
- Kessler A, Muller G, Wied S, Crecelius A, Eckel J** (1998) Signalling pathways of an insulin-mimetic phosphoinositolyglycan-peptide in muscle and adipose tissue. *Biochem J* 330:277-86.
- Kessler A, Uphues I, Ouwens DM, Till M, Eckel J** (2001) Diversification of cardiac insulin signaling involves the p85 alpha/beta subunits of phosphatidylinositol 3-kinase. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280:E65-74.
- Kim B, Cheng HL, Margolis B, Feldman EL** (1998) Insulin receptor substrate 2 and Shc play different roles in insulin- like growth factor I signaling. *J Biol Chem* 273:34543-50.

- Klarlund JK, Cherniack AD, Conway BR, VanRenterghem B, Czech MP** (1997) Mechanisms of insulin action. In: Porte, D., Sherwin, R.S., (eds) *Ellenberg & Rifkin's Diabetes mellitus*. Appleton & Lange, Stamford, 5th ed. 75-93
- Klein R, Klein BE, Moss SE** (1995) The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. XVI. The relationship of C-peptide to the incidence and progression of diabetic retinopathy. *Diabetes* 44:796-801.
- Kovacina KS, Roth RA** (1993) Identification of SHC as a substrate of the insulin receptor kinase distinct from the GAP-associated 62 kDa tyrosine phosphoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* 192:1303-11.
- Kublaoui B, Lee J, Pilch PF** (1995) Dynamics of signaling during insulin-stimulated endocytosis of its receptor in adipocytes. *J Biol Chem* 270:59-65.
- Kubota N, Tobe K, Terauchi Y, Eto K, Yamauchi T, Suzuki R, Tsubamoto Y, Komeda K, Nakano R, Miki H, Satoh S, Sekihara H, Sciacchitano S, Lesniak M, Aizawa S, Nagai R, Kimura S, Akanuma Y, Taylor SI, Kadowaki T** (2000) Disruption of insulin receptor substrate 2 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory beta-cell hyperplasia. *Diabetes* 49:1880-9.
- Kulkarni RN, Bruning JC, Winnay JN, Postic C, Magnuson MA, Kahn CR** (1999) Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic beta cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes. *Cell* 96:329-39.
- Kull FC, Jr., Jacobs S, Su YF, Svoboda ME, Van Wyk JJ, Cuatrecasas P** (1983) Monoclonal antibodies to receptors for insulin and somatomedin-C. *J Biol Chem* 258:6561-6.
- Kurtzhals P, Schaffer L, Sorensen A, Kristensen C, Jonassen I, Schmid C, Trub T** (2000) Correlations of receptor binding and metabolic and mitogenic potencies of insulin analogs designed for clinical use. *Diabetes* 49:999-1005.
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5.
- Lämmerhirt H** (1995) Transfektion von H9c2-Herzmuskelzellen und Expression Insulin-responsiver Gene. *Diplomarbeit, HHU-Düsseldorf*
- Lamothe B, Baudry A, Christoffersen CT, De Meyts P, Jami J, Bucchini D, Joshi RL** (1998) Insulin receptor-deficient cells as a new tool for dissecting complex interplay in insulin and insulin-like growth factors. *FEBS Lett* 426:381-5.
- Lamphere L, Lienhard GE** (1992) Components of signaling pathways for insulin and insulin-like growth factor-I in muscle myoblasts and myotubes. *Endocrinology* 131:2196-202.
- Lawrence JC, Jr.** (1992) Signal transduction and protein phosphorylation in the regulation of cellular metabolism by insulin. *Annu Rev Physiol* 54:177-93

- Lernmark A** (1995) Glutamic acid decarboxylase antibodies and diabetes complications. Assay reliability and validity. *Diabetes Care* 18:269-71.
- LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT, Jr.** (1995) Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev* 16:143-63.
- Li S, Termini J, Hayward A, Siddle K, Zick Y, Koval A, LeRoith D, Fujita-Yamaguchi Y** (1998) The carboxyl-terminal domain of insulin-like growth factor-I receptor interacts with the insulin receptor and activates its protein tyrosine kinase. *FEBS Lett* 421:45-9.
- Lindholm A, McEwen J, Riis AP** (1999) Improved postprandial glycemic control with insulin aspart. A randomized double-blind cross-over trial in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 22:801-5.
- Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A** (1993) Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* 75:59-72.
- Lomedico PT, Chan SJ, Steiner DF** (1977) Immunological and chemical characterisation of bovine preproinsulin. *J Biol Chem* 252:7971
- Luo RZ, Beniac DR, Fernandes A, Yip CC, Ottensmeyer FP** (1999) Quaternary structure of the insulin-insulin receptor complex. *Science* 285:1077-80.
- Maegawa H, Shigeta Y, Egawa K, Kobayashi M** (1991) Impaired autophosphorylation of insulin receptors from abdominal skeletal muscles in nonobese subjects with NIDDM. *Diabetes* 40:815-9.
- Markussen J, Diers I, Engesgaard A, Hansen MT, Hougaard P, Langkjaer L, Norris K, Ribel U, Sorensen AR, Sorensen E, et al.** (1987) Soluble, prolonged-acting insulin derivatives. II. Degree of protraction and crystallizability of insulins substituted in positions A17, B8, B13, B27 and B30. *Protein Eng* 1:215-23.
- Markussen J, Diers I, Hougaard P, Langkjaer L, Norris K, Snel L, Sorensen AR, Sorensen E, Voigt HO** (1988) Soluble, prolonged-acting insulin derivatives. III. Degree of protraction, crystallizability and chemical stability of insulins substituted in positions A21, B13, B23, B27 and B30. *Protein Eng* 2:157-66.
- Markussen J, Hougaard P, Ribel U, Sorensen AR, Sorensen E** (1987) Soluble, prolonged-acting insulin derivatives. I. Degree of protraction and crystallizability of insulins substituted in the termini of the B- chain. *Protein Eng* 1:205-13.
- Marshall CJ** (1995) Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80:179-85.
- Martin BC, Warram JH, Krolewski AS, Bergman RN, Soeldner JS, Kahn CR** (1992) Role of glucose and insulin resistance in development of type 2 diabetes mellitus: results of a 25-year follow-up study. *Lancet* 340:925-9.

- McClain DA** (1992) Mechanism and role of insulin receptor endocytosis. *Am J Med Sci* 304:192-201.
- McDonald NQ, Murray-Rust J, Blundell TL** (1995) The first structure of a receptor tyrosine kinase domain: a further step in understanding the molecular basis of insulin action. *Structure* 3:1-6.
- Miele C, Caruso M, Calleja V, Auricchio R, Oriente F, Formisano P, Condorelli G, Cafieri A, Sawka-Verhelle D, Van Obberghen E, Beguinot F** (1999) Differential role of insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2 in L6 skeletal muscle cells expressing the Arg1152 --> Gln insulin receptor. *J Biol Chem* 274:3094-102.
- Mielke K, Herdegen T** (2000) JNK and p38 stresskinases--degenerative effectors of signal- transduction-cascades in the nervous system. *Prog Neurobiol* 61:45-60.
- Migliaccio E, Mele S, Salcini AE, Pelicci G, Lai KM, Superti-Furga G, Pawson T, Di Fiore PP, Lanfrancone L, Pelicci PG** (1997) Opposite effects of the p52shc/p46shc and p66shc splicing isoforms on the EGF receptor-MAP kinase-fos signalling pathway. *Embo J* 16:706-16.
- Milazzo G, Sciacca L, Papa V, Goldfine ID, Vigneri R** (1997) ASPB10 insulin induction of increased mitogenic responses and phenotypic changes in human breast epithelial cells: evidence for enhanced interactions with the insulin-like growth factor-I receptor. *Mol Carcinog* 18:19-25.
- Molina L, Marino-Buslje C, Quinn DR, Siddle K** (2000) Structural domains of the insulin receptor and IGF receptor required for dimerisation and ligand binding. *FEBS Lett* 467:226-30.
- Monti LD, Poma R, Caumo A, Stefani I, Picardi A, Sandoli EP, Zoltobrocki M, Micossi P, Pozza G** (1992) Intravenous infusion of diarginylinsulin, an insulin analogue: effects on glucose turnover and lipid levels in insulin-treated type II diabetic patients. *Metabolism* 41:540-4.
- Mosekilde E, Jensen KS, Binder C, Pramming S, Thorsteinsson B** (1989) Modeling absorption kinetics of subcutaneous injected soluble insulin. *J Pharmacokinet Biopharm* 17:67-87.
- Murakami MS, Rosen OM** (1991) The role of insulin receptor autophosphorylation in signal transduction. *J Biol Chem* 266:22653-60.
- Myers MG, Jr., White MF** (1996) Insulin signal transduction and the IRS proteins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36:615-58
- Neufeld EF, Lim TW, Shapiro LJ** (1975) Inherited disorders of lysosomal metabolism. *Annu Rev Biochem* 44:357-76
- Neufeld EF, Sando GN, Garvin AJ, Rome LH** (1977) The transport of lysosomal enzymes. *J. Supramol. Struct.* 6:95-101

- Nolan JJ, Freidenberg G, Henry R, Reichart D, Olefsky JM** (1994) Role of human skeletal muscle insulin receptor kinase in the in vivo insulin resistance of noninsulin-dependent diabetes mellitus and obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 78:471-7.
- O'Farrell PH** (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250:4007-21.
- Oh Y, Muller HL, Neely EK, Lamson G, Rosenfeld RG** (1993) New concepts in insulin-like growth factor receptor physiology. *Growth Regul* 3:113-23.
- Okkubo Y, Kishikawa H, Araki E** (1995) Intensive insulin therapy prevents the progression of diabetic microvascular complications in Japanese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: a randomized prospective 6-year study. *Diabetes Res Clin Pract* 28(2):103-117
- Olefsky JM, Nolan JJ** (1995) Insulin resistance and non-insulin-dependent diabetes mellitus: cellular and molecular mechanisms. *Am J Clin Nutr* 61:980S-986S.
- O'Neill TJ, Craparo A, Gustafson TA** (1994) Characterization of an interaction between insulin receptor substrate 1 and the insulin receptor by using the two-hybrid system. *Mol Cell Biol* 14:6433-42.
- Ouwens DM, van der Zon GC, Pronk GJ, Bos JL, Moller W, Cheatham B, Kahn CR, Maassen JA** (1994) A mutant insulin receptor induces formation of a Shc-growth factor receptor bound protein 2 (Grb2) complex and p21ras-GTP without detectable interaction of insulin receptor substrate 1 (IRS1) with Grb2. Evidence for IRS1-independent p21ras-GTP formation. *J Biol Chem* 269:33116-22.
- Pelech SL, Sanghera JS** (1992) MAP kinases: charting the regulatory pathways. *Science* 257:1355-6.
- Pellicci G, Lanfrancone L, Grignani F, McGlade J, Cavallo F, Forni G, Nicoletti I, Pawson T, Pellicci PG** (1992) A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction. *Cell* 70:93-104.
- Pieber TR, Eugene-Jolchine I, Derobert E** (2000) Efficacy and safety of HOE 901 versus NPH insulin in patients with type 1 diabetes. The European Study Group of HOE 901 in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 23:157-62.
- Porzio O, Federici M, Hribal ML, Lauro D, Accili D, Lauro R, Borboni P, Sesti G** (1999) The Gly972-->Arg amino acid polymorphism in IRS-1 impairs insulin secretion in pancreatic beta cells. *J Clin Invest* 104:357-64.
- Pronk GJ, de Vries-Smiths AM, Buday L, Downward J, Maassen JA, Medema RH, Bos JL** (1994) Involvement of Shc in insulin- and epidermal growth factor-induced activation of p21ras. *Mol Cell Biol* 14:1575-81.
- Ratzmann KP** (1991) Eine Analyse von alters- und geschlechtsspezifischer Diabetesprävalenz sowie Behandlungsart: die Berlin-Studie. *Akt. Endokr. Stoffw.* 12:220-223

- Reuther GW, Der CJ** (2000) The Ras branch of small GTPases: Ras family members don't fall far from the tree. *Curr Opin Cell Biol* 12:157-65.
- Rosenstock J, Park G, Zimmerman J** (2000) Basal insulin glargine (HOE 901) versus NPH insulin in patients with type 1 diabetes on multiple daily insulin regimens. U.S. Insulin Glargine (HOE 901) Type 1 Diabetes Investigator Group. *Diabetes Care* 23:1137-42.
- Rosenstock J, Schwartz S, Clark C, Edwards M, Donley D** (1999) Efficacy and safety of HOE901 (Insulin Glargine) in subjects with type 2 DM: A 28-week randomized, NPH insulin-controlled trial (Abstract). *Diabetes* 48 (Suppl 1):A100
- Roskamp RH, Park G** (1999) Long-acting insulin analogs. *Diabetes Care* 22 Suppl 2:B109-13.
- Rother KI, Imai Y, Caruso M, Beguinot F, Formisano P, Accili D** (1998) Evidence that IRS-2 phosphorylation is required for insulin action in hepatocytes. *J Biol Chem* 273:17491-7.
- Ruff-Jamison S, Campos-Gonzalez R, Glenney JR, Jr.** (1991) Heavy and light chain variable region sequences and antibody properties of anti-phosphotyrosine antibodies reveal both common and distinct features. *J Biol Chem* 266:6607-13.
- Saltiel AR** (1994) The paradoxical regulation of protein phosphorylation in insulin action. *Faseb J* 8:1034-40.
- Sasaoka T, Ishiki M, Sawa T, Ishihara H, Takata Y, Imamura T, Usui I, Olefsky JM, Kobayashi M** (1996) Comparison of the insulin and insulin-like growth factor 1 mitogenic intracellular signaling pathways. *Endocrinology* 137:4427-34.
- Sasaoka T, Kobayashi M** (2000) The functional significance of Shc in insulin signaling as a substrate of the insulin receptor. *Endocr J* 47:373-81.
- Sawka-Verhelle D, Baron V, Mothe I, Filloux C, White MF, Van Obberghen E** (1997) Tyr624 and Tyr628 in insulin receptor substrate-2 mediate its association with the insulin receptor. *J Biol Chem* 272:16414-20.
- Sawka-Verhelle D, Tartare-Deckert S, White MF, Van Obberghen E** (1996) Insulin receptor substrate-2 binds to the insulin receptor through its phosphotyrosine-binding domain and through a newly identified domain comprising amino acids 591-786. *J Biol Chem* 271:5980-3.
- Schreiber B** (2001) Untersuchungen zu Protein-Protein-Interaktionen unter Verwendung der Oberflächen-Plasmon-Resonanz am Beispiel von Insulin und seinem Rezeptor. *Diplomarbeit, HHU-Düsseldorf*
- Seabright PJ, Smith GD** (1996) The characterization of endosomal insulin degradation intermediates and their sequence of production. *Biochem J* 320:947-56.
- Seger R, Krebs EG** (1995) The MAPK signaling cascade. *Faseb J* 9:726-35.

Shalev A (1998) Insulin receptor substrate-2--a new candidate gene for NIDDM? *Eur J Endocrinol* 139:263-4.

Shepherd PR, Withers DJ, Siddle K (1998) Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem J* 333:471-90.

Shneine J, Voswinkel M, Federwisch M, Wollmer A (2000) Enhancing the T-->R transition of insulin by helix-promoting sequence modifications at the N-terminal B-chain. *Biol Chem* 381:127-33.

Skolnik EY, Lee CH, Batzer A, Vicentini LM, Zhou M, Daly R, Myers MJ, Jr., Backer JM, Ullrich A, White MF, et al. (1993) The SH2/SH3 domain-containing protein GRB2 interacts with tyrosine- phosphorylated IRS1 and Shc: implications for insulin control of ras signalling. *Embo J* 12:1929-36.

Slieker LJ, Brooke GS, Chance RE (1994) Insulin and IGF-I analogs: Novel approaches to improved insulin pharmacokinetics. Current directions in insulin-like growth factor research. In: LeRoith, D. & Raizada, M.K. (eds) *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Plenum Press, New York. 343:25-32

Slieker LJ, Brooke GS, DiMarchi RD, Flora DB, Green LK, Hoffmann JA, Long HB, Fan L, Shields JE, Sundell KL, Surface PL, Chance RE (1997) Modifications in the B10 and B26-30 regions of the B chain of human insulin alter affinity for the human IGF-I receptor more than for the insulin receptor. *Diabetologia* 40 Suppl 2:S54-61.

Smith TR, Elmendorf JS, David TS, Turinsky J (1997) Growth hormone-induced insulin resistance: role of the insulin receptor, IRS-1, GLUT-1, and GLUT-4. *Am J Physiol* 272:E1071-9.

Soos MA, Field CE, Lammers R, Ullrich A, Zhang B, Roth RA, Andersen AS, Kjeldsen T, Siddle K (1992) A panel of monoclonal antibodies for the type I insulin-like growth factor receptor. Epitope mapping, effects on ligand binding, and biological activity. *J Biol Chem* 267:12955-63.

Soos MA, Siddle K, Baron MD, Heward JM, Luzio JP, Bellatin J, Lennox ES (1986) Monoclonal antibodies reacting with multiple epitopes on the human insulin receptor. *Biochem J* 235:199-208.

Standaert ML, Schimmel SD, Pollet RJ (1984) The development of insulin receptors and responses in the differentiating nonfusing muscle cell line BC3H-1. *J Biol Chem* 259:2337-45.

Stannard B, Blakesley V, Kato H, Roberts CT, Jr., LeRoith D (1995) Single tyrosine substitution in the insulin-like growth factor I receptor inhibits ligand-induced receptor autophosphorylation and internalization, but not mitogenesis. *Endocrinology* 136:4918-24.

Stewart CE, Rotwein P (1996) Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors. *Physiol Rev* 76:1005-26.

- Straus DS** (1989) Regulation by insulin of cellular growth and proliferation: Relationship to the insulin-like growth factors. In: Draznin, B., Melmed, S. and LeRoith, D. (eds) *Insulin Action*. A.R. Liss, New York:143, 1989.
- Stumvoll M, Nurjhan N, Perriello G, Dailey G, Gerich JE** (1995) Metabolic effects of metformin in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 333:550-4.
- Sun XJ, Wang LM, Zhang Y, Yenush L, Myers MG, Jr., Glasheen E, Lane WS, Pierce JH, White MF** (1995) Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. *Nature* 377:173-7.
- Taha C, Klip A** (1999) The insulin signaling pathway. *J Membr Biol* 169:1-12.
- Takahashi Y, Tobe K, Kadowaki H, Katsumata D, Fukushima Y, Yazaki Y, Akanuma Y, Kadowaki T** (1997) Roles of insulin receptor substrate-1 and Shc on insulin-like growth factor I receptor signaling in early passages of cultured human fibroblasts. *Endocrinology* 138:741-50.
- Tang L, Whittingham JL, Verma CS, Caves LS, Dodson GG** (1999) Structural consequences of the B5 histidine --> tyrosine mutation in human insulin characterized by X-ray crystallography and conformational analysis. *Biochemistry* 38:12041-51.
- Tartare-Deckert S, Sawka-Verhelle D, Murdaca J, Van Obberghen E** (1995) Evidence for a differential interaction of SHC and the insulin receptor substrate-1 (IRS-1) with the insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor in the yeast two-hybrid system. *J Biol Chem* 270:23456-60.
- Taylor R, Hetherington CS, Tolley S** (1989) Receptor binding and biological potency of despentapeptide insulin. *Horm Metab Res* 21:249-52.
- Tibbles LA, Woodgett JR** (1999) The stress-activated protein kinase pathways. *Cell Mol Life Sci* 55:1230-54.
- Till M, Ouwens DM, Kessler A, Eckel J** (2000) Molecular mechanisms of contraction-regulated cardiac glucose transport. *Biochem J* 346 Pt 3:841-7.
- Treadway JL, Morrison BD, Soos MA, Siddle K, Olefsky J, Ullrich A, McClain DA, Pessin JE** (1991) Transdominant inhibition of tyrosine kinase activity in mutant insulin/insulin-like growth factor I hybrid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:214-8.
- Ullrich A, Bell JR, Chen EY, Herrera R, Petruzzelli LM, Dull TJ, Gray A, Coussens L, Liao YC, Tsubokawa M, et al.** (1985) Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature* 313:756-61.
- Ullrich A, Gray A, Tam AW, Yang-Feng T, Tsubokawa M, Collins C, Henzel W, Le Bon T, Kathuria S, Chen E, et al.** (1986) Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *Embo J* 5:2503-12.

- Ullrich A, Schlessinger J** (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61:203-12.
- Urso B, Cope DL, Kalloo-Hosein HE, Hayward AC, Whitehead JP, O'Rahilly S, Siddle K** (1999) Differences in signaling properties of the cytoplasmic domains of the insulin receptor and insulin-like growth factor receptor in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 274:30864-73.
- Vajo Z, Duckworth WC** (2000) Genetically engineered insulin analogs: diabetes in the new millenium. *Pharmacol Rev* 52:1-9.
- Valverde AM, Lorenzo M, Pons S, White MF, Benito M** (1998) Insulin receptor substrate (IRS) proteins IRS-1 and IRS-2 differential signaling in the insulin/insulin-like growth factor-I pathways in fetal brown adipocytes. *Mol Endocrinol* 12:688-97.
- Valverde AM, Teruel T, Lorenzo M, Benito M** (1996) Involvement of Raf-1 kinase and protein kinase C zeta in insulin-like growth factor I-induced brown adipocyte mitogenic signaling cascades: inhibition by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. *Endocrinology* 137:3832-41.
- van der Geer P, Pawson T** (1995) The PTB domain: a new protein module implicated in signal transduction. *Trends Biochem Sci* 20:277-80.
- van der Geer P, Wiley S, Gish GD, Lai VK, Stephens R, White MF, Kaplan D, Pawson T** (1996) Identification of residues that control specific binding of the Shc phosphotyrosine-binding domain to phosphotyrosine sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:963-8.
- Ward CW** (1999) Members of the insulin receptor family contain three fibronectin type III domains. *Growth Factors* 16:315-22
- White J, Campbell RK** (1996) Diabetes mellitus. In: Herfindal E.T., Gourley D.R. (eds) Textbook of therapeutics: drug and disease management, 6th ed. Baltimore: Williams & Wilkins:. 357-386
- White MF** (1997) The insulin signalling system and the IRS proteins. *Diabetologia* 40 Suppl 2:S2-17.
- White MF, Kahn CR** (1994) The insulin signaling system. *J Biol Chem* 269:1-4.
- White MF, Livingston JN, Backer JM, Lauris V, Dull TJ, Ullrich A, Kahn CR** (1988) Mutation of the insulin receptor at tyrosine 960 inhibits signal transmission but does not affect its tyrosine kinase activity. *Cell* 54:641-9.
- Wilden PA, Kahn CR, Siddle K, White MF** (1992) Insulin receptor kinase domain autophosphorylation regulates receptor enzymatic function. *J Biol Chem* 267:16660-8.
- Wilden PA, Siddle K, Haring E, Backer JM, White MF, Kahn CR** (1992) The role of insulin receptor kinase domain autophosphorylation in receptor-mediated activities. Analysis with insulin and anti-receptor antibodies. *J Biol Chem* 267:13719-27.

Withers DJ, Burks DJ, Towery HH, Altamuro SL, Flint CL, White MF (1999) Irs-2 coordinates Igf-1 receptor-mediated beta-cell development and peripheral insulin signalling. *Nat Genet* 23:32-40.

Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S, Zhang Y, Bernal D, Pons S, Shulman GI, Bonner-Weir S, White MF (1998) Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 391:900-4.

Wolf G, Trub T, Ottinger E, Groninga L, Lynch A, White MF, Miyazaki M, Lee J, Shoelson SE (1995) PTB domains of IRS-1 and Shc have distinct but overlapping binding specificities. *J Biol Chem* 270:27407-10.

Yamada K, Carpentier JL, Cheatham B, Goncalves E, Shoelson SE, Kahn CR (1995) Role of the transmembrane domain and flanking amino acids in internalization and down-regulation of the insulin receptor. *J Biol Chem* 270:3115-22.

Yamauchi T, Tobe K, Tamemoto H, Ueki K, Kaburagi Y, Yamamoto-Honda R, Takahashi Y, Yoshizawa F, Aizawa S, Akanuma Y, Sonenberg N, Yazaki Y, Kadowaki T (1996) Insulin signalling and insulin actions in the muscles and livers of insulin-resistant, insulin receptor substrate 1-deficient mice. *Mol Cell Biol* 16:3074-84.

Yenush L, White MF (1997) The IRS-signalling system during insulin and cytokine action. *Bioessays* 19:491-500.

Zeuzem S, Stahl E, Jungmann E, Zoltbrocki M, Schoffling K, Caspary WF (1990) In vitro activity of biosynthetic human diarginylinsulin. *Diabetologia* 33:65-71.

Zhang Q, Berggren PO, Hansson A, Tally M (1998) Insulin-like growth factor-I-induced DNA synthesis in insulin-secreting cell line RINm5F is associated with phosphorylation of the insulin-like growth factor-I receptor and the insulin receptor substrate-2. *J Endocrinol* 156:573-81.

Zhang W, Gustafson TA, Rutter WJ, Johnson JD (1994) Positively charged side chains in the insulin-like growth factor-1 C- and D-regions determine receptor binding specificity. *J Biol Chem* 269:10609-13.

7. Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäure
BrdU	S-Brom-2'-desoxy-Uridin
BSA	Rinderserum Albumin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiotreitol
ECL	Verstärkte Chemielumineszenz
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
ERK	Extrazellulär regulierte Kinase
Grb2	Wachstumsfaktor-Rezeptor Bindeprotein 2
GLUT	Glucosetransporter
IGF-I	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor I
IRS	Insulinrezeptor Substrat
JNK	c-Jun-NH ₂ -terminale Kinase
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPKK	MAPK-Kinase
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PH-Domäne	Pleckstrin homologe Domäne
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol-Kinase
PKB	Proteinkinase-B
PKC	Proteinkinase-C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTB-Domäne	Phosphotyrosin-Bindedomäne

PVDF	Polyvinylidifluorid
RIPA	Radioimmunopräzipitation
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH2-Domäne	Src homologe Domäne 2
Shc	Src-homologes Kollagen Protein
Sos	Son of sevenless
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	t-Octylphenoxypolyethoxyethanol
Tween	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat

8. Abbildungsverzeichnis

Abb.1.: Intrazelluläre Mechanismen der Insulinwirkung	5
Abb.2.: Wirkungsprofil verschiedener Insulinpräparationen bzw. Insulinanaloga nach subkutaner Injektion	11
Abb.3.: Lichtmikroskopische Aufnahme von K6-Myoblasten im konfluenten Wachstumsstadium	42
Abb.4.: Bindung von ¹²⁵ I-markierten Insulinen an K6-Myoblasten	44
Abb.5.: Internalisierung von ¹²⁵ I-markierten Insulinen in K6-Myoblasten	45
Abb.6.: Intrazelluläre Degradierung von ¹²⁵ I-markierten Insulinen in K6-Myoblasten	46
Abb.7.: Einfluß von Humaninsulin bzw. Insulinanaloga auf die Autophosphorylierung des IGF-I Rezeptors in K6-Myoblasten	48
Abb.8.: Aktivierung der p44/p42 MAP-Kinase durch Humaninsulin bzw. Analoga in K6-Myoblasten	52
Abb.9.: Quantifizierung der Humaninsulin- bzw. Insulinanaloga-induzierten Phosphorylierung der p44/42 MAPK-Isoformen	53
Abb.10.: Einfluß der Humaninsulin- bzw. Insulinanaloga-Stimulation auf die Assoziation der Shc Proteine mit der β -Untereinheit des aktivierten IGF-I Rezeptors in K6-Myoblasten	55
Abb.11.: Tyrosinphosphorylierung der Shc Proteine nach Stimulation mit Humaninsulin bzw. Insulinanaloga in K6-Myoblasten	57
Abb.12.: Quantifizierung der Insulin- bzw. Insulinanaloga-induzierten Tyrosinphosphorylierung der 66 und 52 kDa Shc Proteine	58
Abb.13.: Einfluß von Humaninsulin bzw. Insulinanaloga auf die Tyrosinphosphorylierung der IRS Proteine in K6-Myoblasten	61
Abb.14.: Quantifizierung der Insulinpeptide-vermittelten Tyrosinphosphorylierung der IRS-1/2 Proteine in K6-Myoblasten	62
Abb.15.: Tyrosinphosphorylierung der IRS Proteine nach Stimulation mit Humaninsulin bzw. Insulinanaloga in adulten Kardiomyozyten der Ratte	64
Abb.16.: Quantifizierung der durch die einzelnen Insulinpeptide induzierten Steigerung der IRS-1/2 Phosphotyrosinsignale in adulten Kardiomyozyten	65

Abb.17.: Lichtmikroskopische Aufnahme von menschlichen Myoblasten aus der Skelettmuskulatur im konfluenten Zustand	68
Abb.18.: Einfluß von Humaninsulin bzw. modifizierten Insulinpeptiden auf die Tyrosinphosphorylierung der IRS Proteine in proliferierenden menschlichen Skelettmuskelzellen	69
Abb.19.: Quantifizierung der durch die verschiedenen Insulinstimuli induzierten Tyrosinphosphorylierung der IRS-1/2 Proteine in menschlichen Skelettmuskelzellen	70
Abb.20.: Hemmung der Insulineffekte auf die Tyrosinphosphorylierung von IRS-1 durch das Blockieren des IGF-I bzw. Insulinrezeptors in menschlichen Skelettmuskelzellen	73
Abb.21.: Quantifizierung der Inhibitionseffekte der Blockade des IGF-I- bzw. Insulinrezeptors auf die Insulin- und Insulinanaloga-vermittelte IRS-1 Stimulation	75
Abb.22.: Hemmung der Insulineffekte auf die IRS-2 Tyrosinphosphorylierung durch das Blockieren des IGF-I- bzw. Insulinrezeptors in menschlichen Skelettmuskelzellen	76
Abb.23.: Quantifizierung der Inhibitionseffekte der Blockade des IGF-I- bzw. Insulinrezeptors auf die Insulin- und Insulinanaloga-vermittelte IRS-2 Stimulation	77
Abb.24.: Effekte von Humaninsulin, Insulinanaloga, IGF-I und FCS auf den Einbau des 5-Brom-2'-desoxyuridins (BrdU) in die DNA in K6-Myoblasten	79
Abb.25.: Silbergefärbte Gele nach zweidimensionaler Elektrophorese der mit [³³ P]-Orthophosphat markierten Proteinen aus H9-Lysaten von unbehandelten und mit Insulinanaloga behandelten Zellen	81
Abb.26.: Zweidimensionale Analyse von Phosphoproteinen in H9-Myoblasten nach Stimulation mit Humaninsulin bzw. Insulinanaloga	82

Danksagung:

Die vorliegende Arbeit wurde durch das Ministerium für Wissenschaft und Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen und die Firma Aventis unterstützt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jürgen Eckel. Ihm möchte ich ganz besonders danken, daß er es mir ermöglichte, diese interessante Arbeit in seiner Arbeitsgruppe am Deutschen-Diabetes-Forschungsinstitut durchzuführen. Ihm danke ich für die intensive Unterstützung, seine stete Diskussionsbereitschaft, sein entgegengebrachtes Interesse an meiner Arbeit und seine hilfreichen Ratschläge. Außerdem ermöglichte er mir durch die Teilnahme an einer Reihe von Kongressen Anregungen und Ideen für die vorliegende Arbeit zu sammeln.

Herrn Prof. Dr. Frank Wunderlich möchte ich für die Übernahme des Korreferats und das Interesse an der Arbeit danken.

Allen in der Arbeitsgruppe danke ich für die freundliche Atmosphäre und die gegenseitige Rücksichtnahme, die diese Arbeit stets erleichterte. Besonders danke ich unseren TA's Heidi, Waltraud und Marlis für die Hilfe und Unterstützung bei großen und kleinen Problemen.

Schließlich danke ich ganz besonders meinen Eltern Apostolos und Anna für die lange und liebevolle Unterstützung, meinem Bruder Alexandros, allen meinen Freunden und vor allem meinem Freund Christian für seine Geduld, sein Verständnis und die Lösung vielfältiger Computerprobleme.