

**Aus der Abteilung für klinische Biochemie und Pathobiochemie
des Deutschen Diabetes – Forschungsinstitutes
an der Heinrich Heine Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. D. Müller-Wieland**

**Charakterisierung der cPIP-Synthase in Leber Plasmamembranen
sowie Messung der Aktivität in Tieren mit Diabetes und Hypertonie**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Eftihios Psarakis

2002

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

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dieter Häussinger
Dekan

Referent: Prof. Dr. med. Dirk Müller-Wieland

Korreferent: Prof. Dr. med. Horst Lemoine

Meinen Eltern Christina und Ioannis Psarakis

Verzeichnis der Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
AC	Adenylylcyclase
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cPIP	Prostaglandylninositol-cyclo- phosphat
cpm	counts per minute
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GTP	Guanosintriphosphat
IRS	Insulinrezeptor Substrat
n-IP	neues Inositolphosphat
PGE	Prostaglandin E
PLA	Phospholipase A
PLC	Phospholipase C
PM	Plasmamembran
SHR	spontan hypertensive Ratten
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	ALLGEMEINES.....	1
1.2	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	4
2	MATERIAL UND METHODEN	5
2.1	MATERIALIEN	5
2.1.1	Chemikalien.....	5
2.1.2	Geräte und Zubehör.....	5
2.2	METHODEN.....	6
2.2.1	Versuchstiere	6
2.2.2	Herstellung des neuen Inositol-Phosphates (n-IP), dem 2. Substrat der cPIP-Synthase	6
2.2.3	Gelchromatographische Reinigung des 'n-IP' an Sephadex G-15.....	7
2.2.4	Isolierung von Ratten-Leber Plasmamembranen nach Wasner.....	7
2.2.5	Isolierung von Ratten-Leber Plasmamembran nach Neville (1968).....	8
2.2.6	Präparation unter isotoner Bedingung	8
2.2.7	Proteinbestimmung.....	9
2.2.8	c-PIP Biosynthese-Test.....	9
2.2.9	Auftrennung von $^3\text{H-PGE}_1$ und $^3\text{H-cPIP}$ an Kieselgel.....	10
2.2.10	Leitenzym für Mitochondrien (Succinat-Reduktase).....	12
2.2.11	Leitenzym für Mikrosomen (Glucose-6-phosphatase).....	13
2.2.12	Leitenzym der Plasmamembran (Adenylylzyklase).....	13
3	ERGEBNISSE.....	15
3.1	cPIP-SYNTHASE	15
3.1.1	Der Aktivitätstest.....	15
3.1.2	Herstellung von aktiviertem Inositol-phosphat, dem 2. Substrat der Reaktion.....	16
3.1.3	Plasmamembran Herstellung (Vergleich verschiedener Plasmamem- branpräparationen).....	17
3.2	CHARAKTERISIERUNG DER STABILITÄT.....	19
3.2.1	Einfrieren und Auftauen.....	19
3.2.2	Verdünnen	20

3.2.3	<i>Einfluss der Konzentration von der Saccharoselösung auf die Reinheit der Membran.....</i>	<i>21</i>
3.3	CHARAKTERISIERUNG DER ERHALTENEN ZELL-FRAKTIONEN MITTELS LEITENZYMEN.....	22
3.3.1	<i>Succinat- INT – Reduktase als Leitenzym für Mitochondrien</i>	<i>22</i>
3.3.2	<i>Glucose-6-phosphatase als Leitenzym für Mikrosomen.....</i>	<i>23</i>
3.3.3	<i>Adenylylzyklase als Leitenzym für die Plasmamembran.....</i>	<i>24</i>
3.4	AKTIVITÄT DER cPIP-SYNTASE IN TIEREN MIT DIABETES UND HYPERTONIE	28
3.4.1	<i>Aktivität der cPIP-Synthase in diabetischen Ksj-db/db und Ksj Kontroll Mäusen.....</i>	<i>28</i>
3.4.2	<i>Aktivität der cPIP Synthese in SHR sowie Wistar Kyoto Kontroll Ratten .</i>	<i>29</i>
4	DISKUSSION	31
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	35
6	LITERATUR.....	36

1 EINLEITUNG

1.1 Allgemeines

Der Diabetes Mellitus ist die häufigste endokrine Erkrankung. Das, vom altgriechischen stammende Wort, das in der wortwörtlichen Übersetzung „*honig-süßer Durchfluss*“, bedeutet, charakterisiert nur eines der vielfältigen Symptome. Tatsächlich verursacht die Erkrankung Störungen im Bereich des Stoffwechsels, bis zu Langzeitkomplikationen an Organsystemen wie Augen, Nerven, Nieren und Gefäßen. Die im Jahre 1868 von Paul Langerhans entdeckten, und nach ihm benannten Zellen im Pankreas, synthetisieren das von Frederick Banting und Charles Best im Jahre 1921 entdeckte Hormon Insulin (Banting and Best, 1922; Banting et al., 1922a; 1922b). Insulin wird als Proinsulin in den β -Zellen der Langerhans'schen Inseln der Pankreas synthetisiert und gespeichert. Seine physiologischen Wirkungen umfassen die Steigerung der Glycogen- und Triglyceridsynthese (Haysteas et al., 1988; Patel and Roach, 1990; Chiasson et al., 1980), die Regulation der Proteinexpression (Maller et al., 1986), die Aktivierung des Glucoseabbaus, die Hemmung der Gluconeogenese und die Induktion von Zellteilung und Differenzierung (Debant et al., 1988; Smith, 1989). Erhöhte Blutglucose-Spiegel (ab 7,5 mmol/l) bewirken eine erhöhte Freisetzung von Insulin aus den β -Zellen des Pankreas, das seine biologischen Aktivitäten nach Anbindung an die Insulinrezeptoren der Zielzellen entfaltet. Diese heterotetrameren $(\alpha\beta)_2$ -Rezeptoren stellen integrale Membran-glycoproteine dar, die auf intrazellulärer Seite eine Tyrosinkinase-Domäne besitzen. Nach Insulinbindung werden mindestens sechs intrazelluläre Tyrosine trans-autophosphoryliert. Hierdurch wird die Aktivierung der Tyrosinkinase des Rezeptors bewirkt (White und Kahn, 1994), und es werden Zielproteine, vor allem das Insulin-Rezeptor-Substrat-1 (IRS-1) an bestimmten Tyrosinen phosphoryliert (Ahn et al. 1993). In der Folge kommt es zur Auslösung einer Vielzahl von sowohl metabolen als auch mitogenen Zellsignalen, zu denen die Aufnahme von Glucose und anderen Molekülen und Ionen (Wheeler and Hinkle, 1985), die Regulierung der Aktivität vieler Schlüsselenzyme des Intermediärstoffwechsels (Lawrence, 1992; Hubbard and Cohen, 1993), die Regulation der Proteinexpression auf Transkriptions- und Translationsebene (O'Brien and Granner, 1991), die Induktion von Zellwachstum (Straus, 1984) und die Aktivierung von Zellproliferation und Zelldifferenzierung (Saltiel et al., 1994) zählen.

Seit vielen Jahren bewegt die Wissenschaftler, auf welche biochemische Weise Insulin in der Zielzelle alle die vielen regulatorischen Effekte bewirkt. Es gibt derzeit mehrere konkurrierende Vorstellungen zum Wirkmechanismus des Insulins. Zum einem wird angenommen, dass startend mit der Insulin-Rezeptor-Tyrosinkinase das Signal ausschließlich über Phosphorylierungskaskaden in die Zelle gebracht wird (Hunter, 2000; Hubbard and Till, 2000; Mahadev et al., 2001). Jedoch es besteht derzeit eine Lücke der Signalweiterleitung zwischen den Docking Proteinen IRS(1-4) und der Regulation der Aktivität von Serin/Threonin Proteinkinasen und Phosphatasen. Mit der Phosphotidyl-Inositol 3-Kinase und dem Ras-Komplex wird versucht diese Lücke zu schließen (Kahn, 1994; Gypakis and Wasner, 2000). Zum zweiten wird vorgeschlagen, dass diese diskutierte Lücke durch niedermolekulare Hormonboten geschlossen wird. Viel publiziert wurde über Mediatoren vom Glykan-Typ (Saltiel, 1990a,b; Varela-Nieto et al., 1996; Larner und Huang, 1999; Jones und Varela-Nieto, 1999; Shashkin et al., 2001). Diese Substanzen sind bislang nicht hinreichend gut dokumentiert und konnten bislang aus verschiedensten Gründen nicht überzeugen. Sie werden z.B. nicht intrazellulär sondern extrazellulär gebildet.

Last not least gibt es den, aufgrund seiner regulatorischen Wirkung, cAMP-Antagonist genannten Mediator, Prostaglandylinositol-cyklophosphat (cPIP), dessen Synthese dosis- und zeitabhängig von Insulin erfolgt.

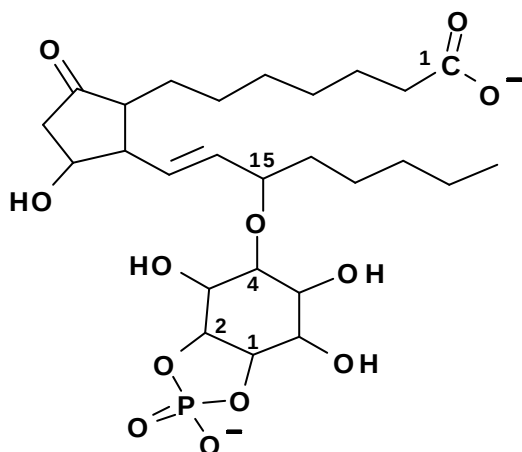


Abb. 1.1: Vorgeschlagene chemische Struktur des cAMP Antagonisten cPIP (Wasner, 1985). Ein Inositol 1:2 cyclo-phosphat ist über die C₄- Hydroxyl- an die C₁₅-Hydroxyl-Gruppe des Prostaglandins gebunden

Als antagonistische Wirkungen zum cAMP sind die primären regulatorischen Eigenschaften von cPIP zu nennen; das sind die 100%-ige Hemmung der cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA) aus Leber, Herz, Muskel und Gehirn (Wasner, 1975), sowie die siebenfache Aktivierung der Serin/Threonin-Phosphatase, dem gegenregulatorischen Enzym zur PKA (Wasner, 1975; Wasner, 1985). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Phosphoprotein-Phosphatase durch cAMP gehemmt wird (Wasner, 1975). cPIP bewirkt in intakten Zellen zahlreiche regulatorische Effekte, die von ihm als second Messenger etwa des Insulins zu erwarten sind, wie:

Hemmung der Adenylylcyclase, gemessen in Hepatocyten, in Fett-, und Herzmuskelzellen;

Aktivierung der Pyruvat-Dehydrogenase in Adipozyten;

Hemmung der Glykogen-Phosphorylase b im Muskel in Anwesenheit von Phosphorylase – Kinase und Proteinkinase A;

Inhibierung der durch Glucose stimulierten Insulin-Ausschüttung aus den β -Zellen des Pankreas;

Verminderte Glucagon-Rezeptor-Bindung in Hepatocyten und in Plasmamembranen der Leber;

Unterdrückung der high-affinity Bindung eines Katecholamins am β -Rezeptor;

Die Inhibierung der Glucagon-induzierten intrazellulären Autophagie.

Positiver inotroper Effekt am Papillar-Muskel des Katzenherzens;

Eine verstärkte Aufnahme von Glucose in Adipozyten

(Wasner, 1981; Wasner, 1985; Wasner and Salge, 1987a, b; Partke and Wasner, 1987; Wasner et al., 1991; Amini, 1993; Wasner et al., 1994; Weber et al., 2000; Gypakis and Wasner, 2000).

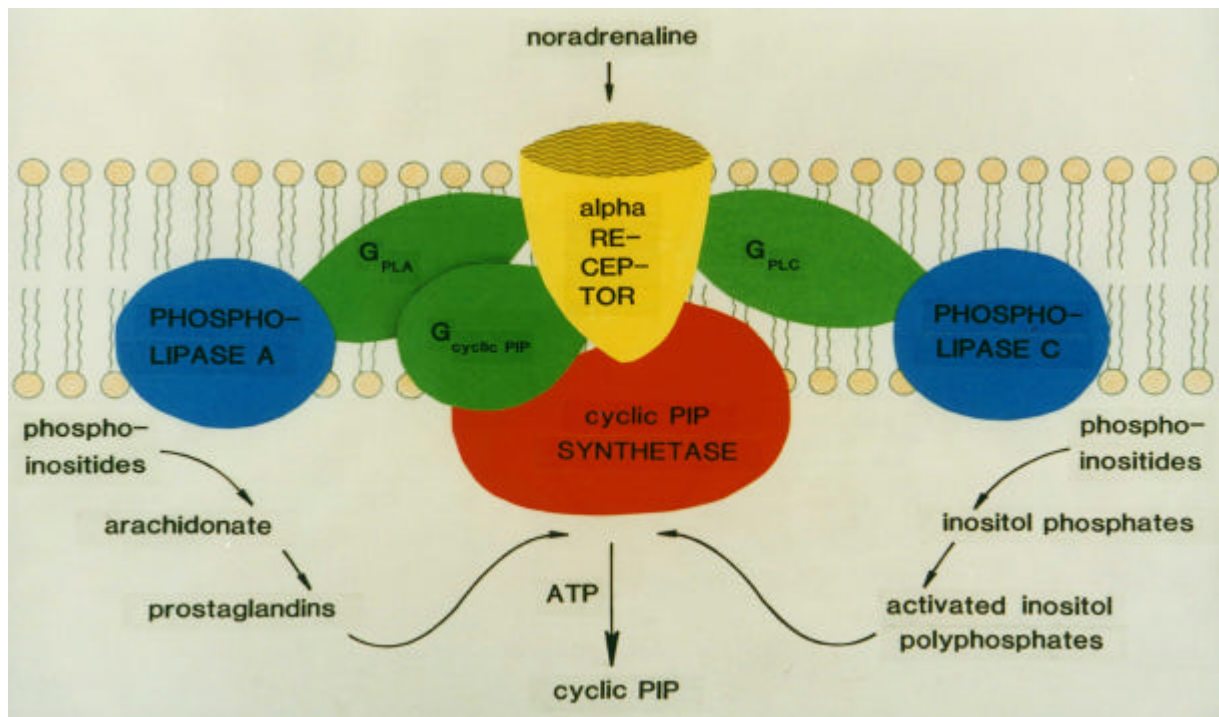


Abb. 1.2: Derzeitige Vorstellung der Biosynthese von cPIP und der Bereitstellung der benötigten Substrate (Wasner et al., 1996).
 Aus den Phosphodiestern der Plasmamembran werden durch Phospholipase A bzw. Phospholipase C ungesättigte Fettsäuren, die zu Prostaglandinen umgesetzt werden bzw. verschiedene Inositolphosphate freigesetzt, von denen z.B. Inositol 1:2 cyclo,4-bisphosphat zu aktiviertem Inositolphosphat umgesetzt wird. Prostaglandine und aktiviertes Inositol-phosphat sind Substrate der cPIP Synthase.

1.2 Zielsetzung der Arbeit

Seit einigen Jahren steht die Charakterisierung der Biosynthese von cPIP im Mittelpunkt, wobei neben der Charakterisierung der Substrate vor allem das Synthese Enzym cPIP-Synthase interessiert. Aufgrund der erheblichen Instabilität dieses membran-ständigen Enzyms wurde es bislang in einer stark verkürzten Methode zur Isolierung von Plasmamembranen gewonnen. Der Grund, das Syntheseenzym in der Plasmamembran-Fraktion zu suchen, lag vor allem in dem Analogie-Gedanken zur ausschließlich in der Plasmamembran vorliegenden Adenylzyklase, das cAMP aus ATP synthetisiert nach hormoneller Stimulierung z.B. mit Glukagon oder Adrenalin (β -Rezeptor-Wirkung).

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zur Optimierung der Gewinnung des cPIP-Synthase genannten Synthese-Enzymes erbringen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Chemikalien verwendet:

Glucose-6-phosphat, p-Nitrophenylacetat und ATP La Roche Diagnostics;

EDTA, Kieselgel SIL -350 von Sigma (Deisenhofen);

(³H)-PGE₁ , (³²P-?) - ATP von Amersham-Buchler (Braunschweig);

Sephadex G-15, Sephadex Säulenmaterialien von Pharmacia (Freiburg);

Szintillatorflüssigkeiten Rotiszint 11 und 22, Toluol, Essigsäureethylester, Methanol, Chloroform, Trichloressigsäure, Quarzwolle von Roth (Karlsruhe);

BCA- Protein- Assay-Reagenz von Pierce (Rockford/Illinois, USA);

Pentobarbital-Natrium (Nembutal®), (Wirtschaftsgenossenschaft dtsch. Tierärzte, Hannover);

sämtliche hier nicht aufgeführten übrigen Chemikalien wurden von Merck (Darmstadt) bezogen.

2.1.2 Geräte und Zubehör

Folgende Geräte und Zubehörteile wurden verwendet:

Ultrazentrifuge L5-75 mit Rotor SW28 von Beckman (München);

Zentrifuge Sorvall RC-5B und Rotoren SS34 oder GSA von Du Pont (Bad Nauheim);

Ultra-Turrax mit Messer 18k und Wasserbad Ter2 von Ika Labortechnik (Staufen i. Br.);

Gefriertrocknungsanlage WKF-L05 von der Gesellschaft für elektrophysikalischen Apparatebau (Brandau/Odw.);

Rotationsverdampfer Rotavapor R110 von Büchi (Flawil, Schweiz);

β-Counter LS-6000-IC von Beckman (München);

β-Counter MR 300 von Kontron (Eching bei München),
Photometer (Zeiss);
Dounce - Glashomogenisator (Braun, Melsungen);
Chromatographische Glassäulen (Beyer, Düsseldorf).

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden Sprague-Dawley Ratten aus der Zucht von Dr. Wasner am Diabetes - Forschungsinstitut verwendet. Die Tiere hatten freien Zugang zu Trinkwasser und Standardfutter (Ssniff). Sie wogen bei Entnahme der Leber ca. 200-300 g. Die Narkose der Tiere wurde mit einer intraperitonealen Injektion von 0,6 ml Pentobarbital-Natrium (Nembutal®) eingeleitet.

Weiterhin wurden Ksj-db/db und Ksj Kontroll Mäuse aus der Zucht von Prof. Dr. Dr. L. Herberg (DFI) zur Verfügung gestellt.

Spontan hypertensive Ratten (SHR) sowie Wistar Kyoto Kontroll-Ratten wurden von der Firma CERI (Le Cenesst St. Isle, France) erhalten.

2.2.2 Herstellung des neuen Inositol-Phosphates (n-IP), dem 2. Substrat der cPIP-Synthase

Die Rattenlebern (12 – 14 g) wurden in Millipore-Wasser mit einem Dounce Homogenisator zerkleinert, wobei pro 1 g Leber 1 ml H₂O zugesetzt wurde. Das Protein des erhaltenen Homogenates wurde durch Mischen mit Chloroform/Methanol (2:1) in einem 1:2 Verhältnis denaturiert.

Nach einer 10 min Zentrifugation bei 16000 x g (10000 rpm, Sorval-Zentrifuge GSA-Rotor) und 4° C wurden die erhaltenen Phasen in einem Scheidetrichter getrennt. Die Chloroformphase (untere Phase) mit den unpolaren Anteilen wurde verworfen. Die organischen Lösungsmittel der Methanol-Wasserphase (obere Phase) wurden für 5 - 10 min am Rotationsverdampfer bei 50 °C entfernt (die wässrige Phase enthält die polaren Substanzen, auch das 'neue Inositol-Phosphat').

Diese Phase wurde bis zur Trockne lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde in Millipore - Wasser aufgenommen (1 ml H₂O/10 g Leber-Feuchtgewicht).

2.2.3 Gelchromatographische Reinigung des 'n-IP' an Sephadex G-15

Das erhaltene Lyophilisat (Rohprodukt) wird zur Aufreinigung an Sephadex G15 gereinigt (Säulevolumen: 500 ml bzw. 2000 ml; Säulen-Durchmesser 2,5 bzw. 5 cm; Länge: 100 cm). 30 bis 70 ml des Rohprodukts wird auf die Säule aufgetragen. Die Elution erfolgt mit Millipore-Wasser. Die Flussrate betrug 2,1 ml/min. Es wurden 100 Fraktionen von je 6 ml bzw. 18 ml Eluat gesammelt. Die Absorption des Eluats wurde mit dem Durchflussphotometer bei 254 nm registriert. Die n-IP Menge der einzelnen Fraktionen wird mit dem cPIP-Biosynthese Test ermittelt. Die Fraktionen mit hohem n-IP-Gehalt wurden vereinigt, mit 1 M Essigsäure auf pH 7 eingestellt und lyophilisiert. Die Lagerung erfolgt bei -80° C.

2.2.4 Isolierung von Ratten-Leber Plasmamembranen nach Wasner

Die Gewinnung der Plasmamembran erfolgte nach der modifizierten Methode von Wasner (1976). Nach der Narkose der Tiere erfolgt die Entnahme der Leber. Diese wurde dann von restlichen Fett- und Bindegewebsanteilen befreit, zerkleinert und mit einem Glashomogenisator nach Dounce in Plasmamembran-Puffer homogenisiert. Für die Herstellung des Puffers (20 mM Tris/HCL, pH 7,5) wurden 2 ml Tris/HCL (1 M), 1 ml EGTA (0,1 M), 240 µl ATP (0,4 M), 7 µl Mercaptoethanol (14,2 M) auf 100 ml Wasser aufgefüllt. Das Homogenat wird dann 2x durch Verbandmull filtriert (zuerst 8-lagig und dann 16-lagig) und auf einen einstufigen 48 %-igen Saccharose Gradienten aufgetragen. Danach erfolgt eine 90-minütige Zentrifugation in einem SW 27-Rotor bei 4° C und 24000 rpm. Die plasmamembranhaltige Schicht wurde mit einer Pasteur-Pipette von der Oberfläche der Saccharose-Schicht abgeerntet und im Verhältnis 1:7 mit dem Plasmamembranpuffer (1 ml 1 M Tris/HCL- Puffer von pH 7,6 in 100 ml H₂O) verdünnt, und die PM sedimentiert (Sorvall GSA Rotor). Das Pellet wurde in 4-5 ml Puffer (s.o.) resuspendiert. Der verbleibende leicht trübe Überstand

wird noch zweimal zentrifugiert und die erhaltenen Pellets wurden ebenfalls in wenig Puffer aufgenommen und dann mit flüssigem Stickstoff eingefroren.

Der das Zytosol enthaltende Überstand des Saccharosegradienten, sowie die Saccharose-Schicht und das Pellet unterhalb dieser Schicht wurden ebenfalls entnommen. All diese Schichten werden auf ihre cPIP-Synthase Aktivität untersucht.

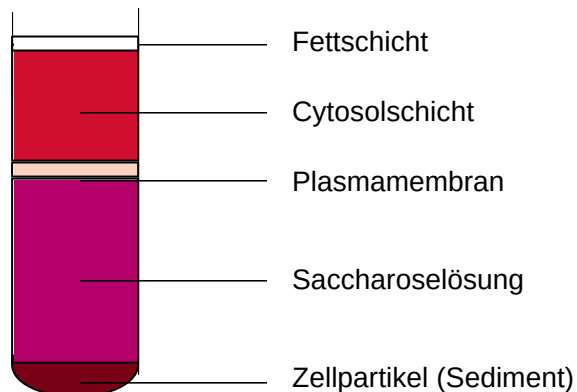


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Auftrennung der verschiedenen Homogenatbestandteile nach der 1. Zentrifugation.

2.2.5 Isolierung von Ratten-Leber Plasmamembran nach Neville (1968)

Die Präparation entspricht im Wesentlichen der oben beschriebenen Vorgehensweise. Der Unterschied besteht in dem Homogenisationspuffer. Hier wurde hypotoner 1 mM Natriumhydrogencarbonatpuffer verwendet. Für die Herstellung des Puffers werden 1 ml NaHCO_3 (1 M) auf 1 Liter aufgefüllt.

2.2.6 Präparation unter isotoner Bedingung

Bei dieser Präparation wird die entnommene Rattenleber zunächst mit einer 0,32 M Saccharose-Lösung im Verhältnis 1:3 homogenisiert. Nach der Filtration wurden 12,5 ml Homogenat mit einer 0,25 M Saccharose-Lösung auf 20 ml verdünnt und mit weiteren 20 ml der 0,25 M Saccharose-Lösung im SS34-Rotor für 10 min bei 2500

rpm zentrifugiert. Der erhaltene resuspendierte Pellet wurde in 4 Röhrchen mit 3 ml gef llt und im SW 27-Rotor für 90 min bei 24000 rpm zentrifugiert. Die Plasmamembranschicht sowie der Pellet werden im Verhältnis 1:6 mit 10 mM Tris-Puffer verdünnt und im GSA-Rotor für 15 min bei 10000 rpm resedimentiert. Die anschließend gewonnenen Pellets werden mit wenig 10 mM Tris-Puffer resuspendiert und auf ihre cPIP - Synthase Aktivität geprüft.

2.2.7 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt der Leber-Plasmamembran wurde mit dem BCA-Protein Assay der Fa. Pierce nach der Methode von Smith (Smith et al., 1985) bestimmt. Hierbei wird Cu^{2+} im alkalischen Medium durch Protein zu Cu^{1+} reduziert, welches mit je zwei Bicinchoninsäure-Molekülen (BCA) zu einem purpurnen wasserlöslichen Komplex reagiert. Die Farbintensität des Komplexes entspricht der Proteinkonzentration und wurde spektralphotometrisch bei 562 nm gemessen.

2.2.8 c-PIP Biosynthese-Test

Der cPIP Biosynthese-Test enthält in einem Gesamtvolumen von 0,3 ml folgende Substanzen nach Leßmann (1991):

- 20 mM Tris/HCl - Inkubationspuffer pH 7,5
- 1 mM EGTA
- 1 mM Mercaptoethanol
- 20 mM Li^{+}
- 20 mM Mg^{2+}
- 20 mM F?
- 20 mM reduziertes Glutathion
- 15 mM ATP pH 7,5
- 50 pmol/ 50000 dpm (5,6(n)- ^3H)- PGE_1

Für den Test wurden folgende Volumina in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert:

Plasmamembran: 50 µl mit einem Proteingehalt von 60 – 100 µg.

Salzlösungen und Glutathion: je 15 µl (für 130 Testansätze wurden jeweils 2 ml 0,4 M Stocklösungen hergestellt: 116 µg KF; 156 µg LiCl; 188 µg MnCl₂; 614 µg red. Glutathion)

Inkubationspuffer: 9 µl (für 100 Testansätze wird eine Stocklösung aus 600 µl 1 M Tris HCl-Puffer vom pH 7,5, 300 µl 0,1 M EGTA, 2 µl 14,2 M Mercaptoethanol hergestellt).

ATP: 45 µl 0,1 M ATP im Standardtest (beim Test von gereinigten Eluaten des Rohprodukts, die ein maximales Volumen wegen geringerer n-IP-Konzentration erfordern, werden 9 µl 0,5 M ATP eingesetzt).

³H-PGE₁: 20 µl der oben genannten Lösung.

n-IP-Rohprodukt: 100 µl (im Standardtest).

H₂O: ad 300 µl Inkubationsvolumen.

Gestartet wurde die Testreaktion mit der Zugabe des 2. Substrates nIP bei einer Inkubationstemperatur von 37° C.

Jeder Testansatz von 300 µl enthält 60 µg Protein (2 mg/ml) der Leber-Plasmamembran, was nach Mirmohammadsadegh (1993) das Optimum darstellt. Nach einem Versuch, bei dem die Inkubationsdauer zwischen 4 und 60 min variiert wurde, wird die optimale Inkubationsdauer auf 12 bzw. 40 min festgelegt, je nachdem, ob die Enzymaktivität, (was nur im linearen Bereich der Zeitkinetik möglich ist) oder der Gehalt an 'neuem Inositol-Phosphat' in einer Fraktion bestimmt werden sollen (was nur nach komplettem Umsatz des eingesetzten Substrates möglich ist).

2.2.9 Auftrennung von ³H-PGE₁ und ³H-cPIP an Kieselgel

Eine ursprünglich zur Auftrennung von verschiedenen Prostaglandinen entwickelte Adsorptionschromatographie an Kieselsäure (Jaffe et al. 1973) wurde zur Trennung des Substrates ³H-PGE₁ vom Produkt cPIP von Wasner (Wasner et al., 1993) modifiziert. ³H-PGE₁ und synthetisiertes ³H-cPIP wurden entsprechend ihrer Polarität fraktioniert. Dazu werden Lösungsmittel-Gemische mit steigender Polarität eingesetzt, wobei der Methanolanteil im Lösungsmittel-Gemisch kontinuierlich erhöht wird.

Für die Auftrennung wurden folgende Lösungsmittelgemische (LM) verwendet:

LM I :	Toluol: Essigsäureethylester	(60:40)
LM II :	Toluol: Essigsäureethylester:Methanol	(60:40:20)
LM III :	Toluol: Essigsäureethylester:Methanol	(60:40:40)
LM IV :	Toluol: Essigsäureethylester:Methanol	(60:40:120)
LM V :	Methanol	

Arbeitsvorschrift:

- 1) Kieselsäure (SIL -350; 0,25 g/ml) in LM I suspendieren.
- 2) Säulen (Glassäulen 1 cm x 13 cm) am Auslauf mit Pfropfen aus Quarzwolle versehen.
- 3) Säulen mit 3 ml Methanol waschen und von der gut mit einem Magnetrührer gemischten Kieselsäure-Suspension 2 ml (= 0,5 g Gel) entnehmen und in die Säule geben. Das Gel absetzen und das Lösungsmittel auslaufen lassen.
- 4) Säule mit 6 ml LM I äquilibrieren.
- 5) 100 µl Inkubationsansatz sorgfältig auf die Säule auftragen (entspricht Stopp der Reaktion).
- 6) Säule zweimal mit je 6 ml LM II eluieren. Das Eluat enthält $^3\text{H-PGE}_1$.
- 7) Säule mit 6 ml LM III eluieren.
- 8) Säule mit 6 ml LM IV eluieren. Das Eluat enthält $^3\text{H-cPIP}$.
- 9) Säule mit 6 ml LM V eluieren. Das Eluat enthält ebenfalls $^3\text{H-cPIP}$.

In der Regel wird so die gesamte Radioaktivität von den Säulen ausgewaschen. Die Eluate werden mit jeweils 10 ml Rotiszint 11 versetzt und im β -Counter gezählt. Die Radioaktivitätswerte der Fraktionen werden quenchkorrigiert, wobei der ermittelte Quench-Faktor der Fraktionen A und B 1,34 beträgt, der der Fraktion C 1,45, der der Fraktion D 1,7 und der der Fraktion E 2,1. Diese Faktoren werden durch die Bestimmung der Zählausbeute einer ^3H -Standardlösung (20 µl $^3\text{H-PGE}_1$), die im betreffenden Lösungsmittelgemisch gezählt wurde, ermittelt.

Die quenchkorrigierten Werte werden summiert und auf die Ausgangsmenge von 50 pmol ^3H -PGE₁ normiert. Von der Summe der Radioaktivitätswerte der Fraktionen D und E wird der entsprechende Wert einer Kontrollinkubation (sämtliche Bestandteile des Testes ohne 'neues Inositol-Phosphat' bei gleicher Inkubationszeit wie die Proben) abgezogen.

Diese erhaltenen Werte sind äquivalent zur synthetisierten Menge an polarem PGE₁-Derivat, dem cPIP.

2.2.10 Leitenzym für Mitochondrien (Succinat-Reduktase)

Als Leitenzym für Mitochondrien wurde die Succinat-Reduktase ausgewählt. Als Substrat wurde 2-(4 Iodphenyl)-3-(4 Nitrophenyl)-5-phenyltetrazoliumchlorid (INT) verwendet, welches enzymatisch reduziert wird.

Die Bestimmung erfolgte nach Morre (1971).

Ein Inkubationsansatz enthielt:	0,9 ml Substratpuffer (50 mM KH ₂ P ₀₄ von pH 7,4)
	25 mM Sucrose,
	55 mM Succinat,
	0,1 %-ig INT von pH 7,4,
	0,1 ml Leberfraktion.

Nach 20 min Inkubation bei 37°C wurden 2 ml 10 %-ige TCA zugegeben, dabei fiel reduziertes Substrat (INT) aus. Der Niederschlag löste sich durch Zugabe von 4 ml Essigsäureethylester. Nach Abkühlen der Proben auf 40°C wurde kurz in der Tischzentrifuge zentrifugiert und die Extinktion bei 492 nm gemessen; der Extinktionskoeffizient für red. INT bei 492 nm beträgt: 20,1 x 1000 [1/Mol x cm].

2.2.11 Leitenzym für Mikrosomen (Glucose-6-phosphatase)

Glucose-6-phosphatase spaltet Glucose-6-phosphat in Glucose und Phosphat, das nach Fiske und Subbarow (1925) bestimmt wurde. Die Messung erfolgte wie bei Bergmeier (1974) beschrieben.

Ein Inkubationsansatz enthielt:

- 0,1 ml Sucrose/EDTA-Lösung (0,25 M pH 7),
- 0,1 ml Kakodylatpuffer (0,1 M pH 6,5),
- 0,1 ml Glukose-6-phosphat (0,1 M pH 7),
- 16 µl 1 %-iges Triton X - 100.

Nach 10 min Erwärmen wurden 0,1 ml Enzymlösung zugefügt und 30 min bei 37° C inkubiert. Die Reaktion wurde mit der Zugabe von 1,5 ml 8 %-iger TCA beendet, und anschließend das freigesetzte anorganische Phosphat bestimmt.

2.2.12 Leitenzym der Plasmamembran (Adenylylzyklase)

Die Aktivität der Adenylylzyklase wird bestimmt, wie bei Lemoine (Lemoine und Kaumann 1991) beschrieben:

Im Adenylylzyklase-Test wurde die cAMP-Stimulierbarkeit an Membranfragmenten untersucht. Die Messung der Aktivität der Adenylylzyklase (AC) beruht auf der Umwandlung von $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ zu $^{32}\text{P}\text{-cAMP}$. Die Abtrennung des gebildeten $^{32}\text{P}\text{-cAMP}$ vom Substrat erfolgt in einer zweistufigen Säulenchromatographie. Die Membranfragmente wurden mit AC-Stimulatoren in einem Inkubationspuffersystem (MIX-Reagenz) inkubiert, das in einem Endvolumen von 60 µl 0,1 mmol/l $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (1 Mio. cpm pro Ansatz), 100 mmol/l Tris-HCL (pH 7,4), 2 mmol/l MgCl_2 , 1 mmol/l EGTA, 0,1 mmol/l GTP und 20 mmol/l Creatinphosphat als Substrat eines regenerierenden Enzymsystems mit den Enzymen Creatinphosphokinase (15 U/ml) und Myokinase (9,8 U/ml) enthielt. Die Plasmamembran wird bei 40000 g (10 min) pelletiert und in 3 mM EGTA-Lösung aufgenommen. Der Proteingehalt wird auf ca. 10 µg pro Assayansatz eingestellt. Der Inkubationsansatz enthält 20 µl eines

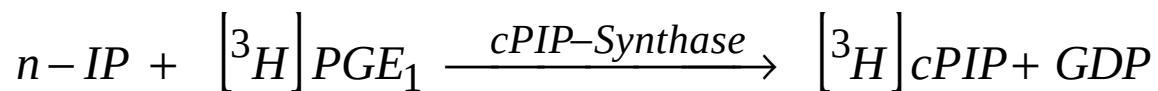
Stimulators, 20 μ l radioaktiver Inkubationspuffer und 20 μ l membranhaltige Suspension. Als Stimulatoren werden 5×10^{-8} M Glucagon, 1×10^{-4} M Adrenalin, 3×10^{-5} M Forskolin und 1×10^{-5} M NaF eingesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe der Membransuspension gestartet, bei 32,5°C inkubiert und nach 20 min durch Gefrieren in flüssigem Stickstoff und Zugabe von 50 μ l Stopplösung, die 10 mmol/l cAMP, 40 mmol/l ATP, 1% Natriumdodecylsulfat und als „Recoverymarker“ 1mmol/l ^3H -cAMP (ca. 3500 cpm/Ansatz) enthielt, beendet. Die Trennung von [α - ^{32}P]ATP und ^{32}P -cAMP erfolgte durch eine zweistufige Säulenchromatographie modifiziert nach Salomon und Mitarbeiter (1974). Die Proben wurden auf eine Kationenaustauschersäule (Dowex-50W 50x4-400, H^+ -Form) aufgetragen, nach mehreren Chromatographieschritten auf Aluminiumoxidsäulen (Adsorptionschromatographie) übertragen und mit Imidazolpuffer (0,1 mmol/l Imidazol, pH 7,0) eluiert. 2,5 ml Eluat wurden mit 3ml Szintillator (Ultima Gold, Packard) versetzt und die Menge der Strahlung im β -Szintillationszähler (Packard 1500) gemessen. Das Analysat wurde in zwei verschiedenen Kanälen (A: 16-700 keV; B: 0,3-5 keV) gemessen. Im A-Kanal wurde das energiereiche ^{32}P -cAMP, das um die Halbwertszeit korrigiert wurde, im B-Kanal das energieärmere ^3H -cAMP erfasst. Die Wiederauffindungsrate betrug ca. 70 %.

3 ERGEBNISSE

3.1 cPIP-Synthase

3.1.1 Der Aktivitätstest

cPIP wird nach folgender Gleichung aus Prostaglandin E (PGE) und aktiviertem Inositolphosphat (n-IP) synthetisiert:



Wie in den Abbildungen 3.1 und 3.2 veranschaulicht, wird das radioaktivmarkierte Substrat PGE vom entsprechend markierten Produkt cPIP durch Chromatographie an Kieselsäure abgetrennt. Die Details der Chromatographie sind im Methodenteil beschrieben.

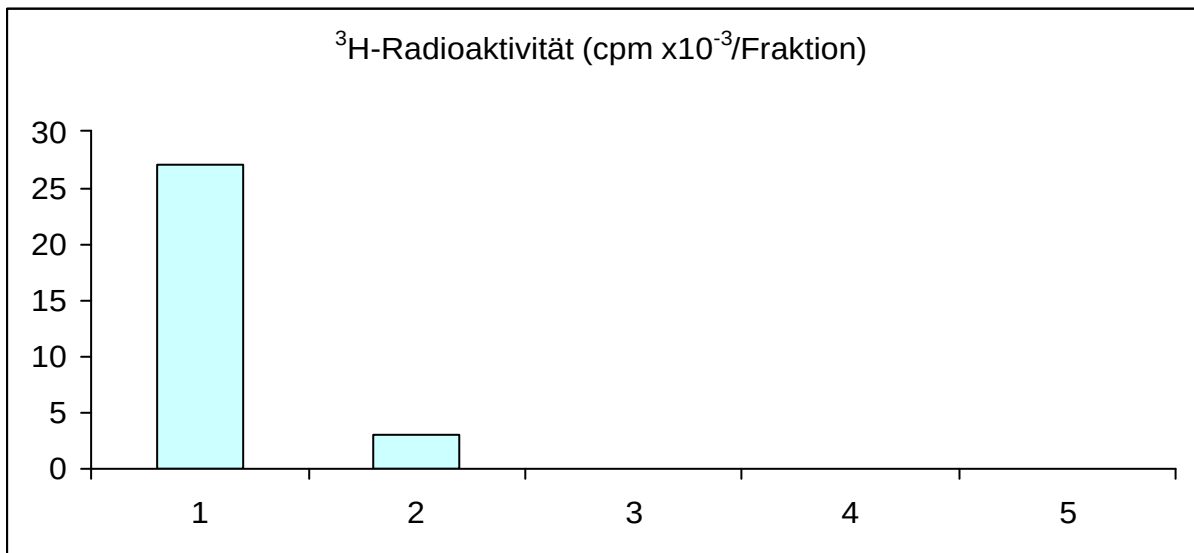


Abb. 3.1.: Chromatographische Auftrennung von nicht umgesetzten Substrat PGE und synthetisiertem Produkt cPIP an Kieselgel.
In der 0 min Kontrollinkubation wurde nur PGE eluiert.

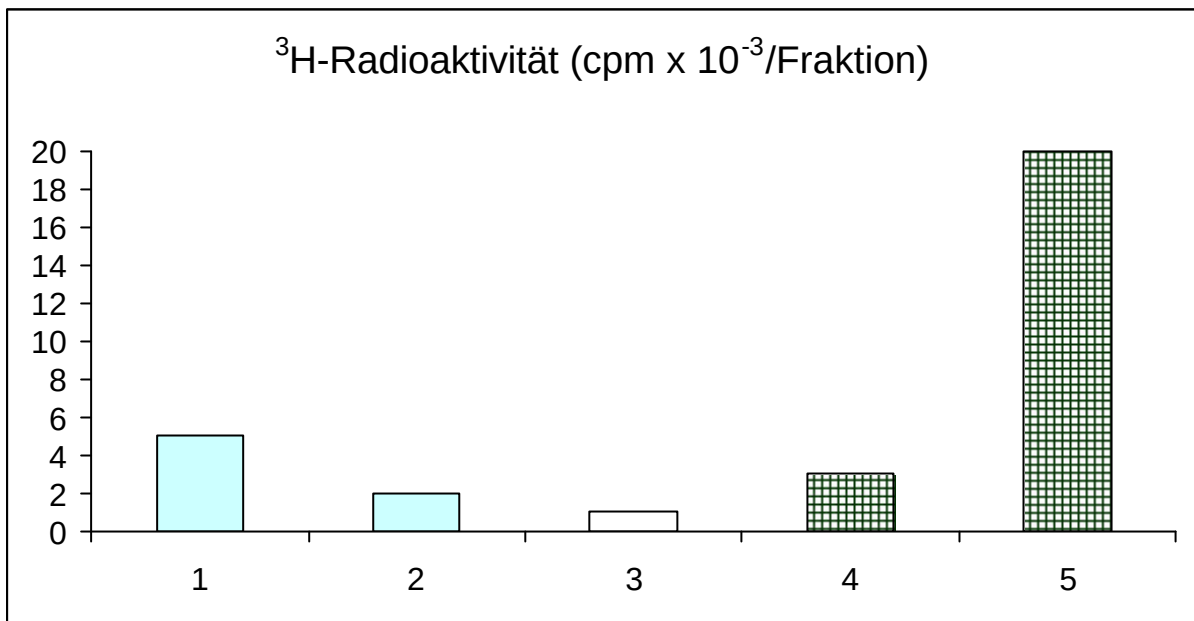


Abb. 3.2.: Chromatographische Auftrennung von nicht umgesetzten Substrat PGE und synthetisiertem Produkt cPIP an Kieselgel.

Es wurde mit Essigester/Toluol/Methanol mit steigender Polarität von Fraktion 1 bis 5 eluiert. PGE eluiert in Fraktion 1+2 und cPIP in Fraktion 4+5. In der 10 min Umsetzung wurde das PGE zu einem großen Teil zu cPIP (Elution in der 4. + 5. Fraktion) umgesetzt. (Detaillierte Beschreibung in 2.2.8 und 2.2.9)

3.1.2 Herstellung von aktiviertem Inositol-phosphat, dem 2. Substrat der Reaktion

In der Abbildung 3.3 ist zu ersehen, dass bei der Gelfiltration an Sephadex G15 n-IP im Bereich der 43. – 50. Fraktion eluiert. Unter den angewandten Bedingungen ist das Ausschlussvolumen der Chromatographie-Säule in Fraktion 29 erreicht und das Säulenvolumen in Fraktion 85. Wenn auch noch nicht endgültig bewiesen, wird angenommen, dass das n-IP als Doppelgipfel eluiert: von Fraktion 42 – 46 eluiert der Monoester und von Fraktion 47 – 51 der Phosphodiester des n-IP (siehe auch Gypakis, 1999).

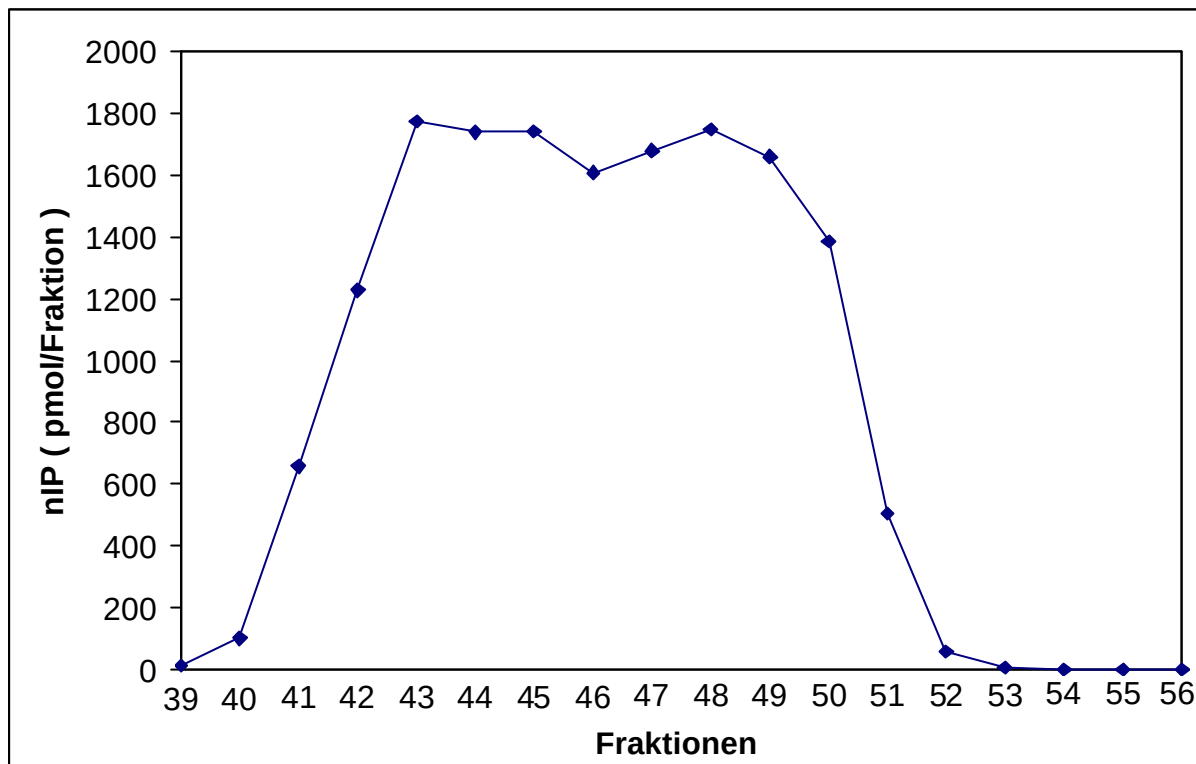


Abb. 3.3.: Anreicherung des aktivierten Inositolphosphates α IP durch Gelfiltration an Sephadex G15. Die Chromatographie Bedingungen sind in Kapitel 2.2.3 beschrieben. Die α -IP Menge wurde durch Umsetzung zu cPIP und dessen quantitative Bestimmung ermittelt.

3.1.3 Plasmamembran Herstellung (Vergleich verschiedener Plasmamembranpräparationen)

Wie im Methodenteil beschrieben wurden Plasmamembranen von Rattenleber auf 3 verschiedene Weisen hergestellt und deren cPIP Synthase-Aktivität sodann bestimmt. Neville gewinnt die Plasmamembran unter hypotoner Bedingung, es wird in 1 mM NaHCO_3 Puffer homogenisiert; die von Wasner erarbeitete Vorschrift enthält im Homogenisationspuffer neben Mercaptoethanol zum Schutz von SH-Gruppen auch noch 1 mM ATP; im Falle der Homogenisation der Leber unter isotoner Bedingung wurde der Puffer durch Saccharose-Zusatz isoton gemacht. In der nachfolgenden Tabelle sind die erzielten Ergebnisse gezeigt.

Präparation	PM - Fraktion cpm/mg-Protein	Pellet - Fraktion cpm /mg-Protein Pellet
nach Neville	11459	13438
nach Wasner	36476	6931
unter isotoner Bedingung	14318	6508

Tabelle 3.1.: Vergleich der cPIP-Synthase Aktivität in Plasmamembran sowie der die Mitochondrien und Mikrosomen enthaltenden Pellet-Fractionen (n=1).

Die Präparationen unterschieden sich im Wesentlichen durch die Verwendung unterschiedlichen Homogenisationspuffer (siehe Methodenteil Seite 8-10). Plasmamembran und Pelletfraktion werden durch den einstufigen Saccharose-Gradienten erhalten (siehe Methodenteil Seite 9).

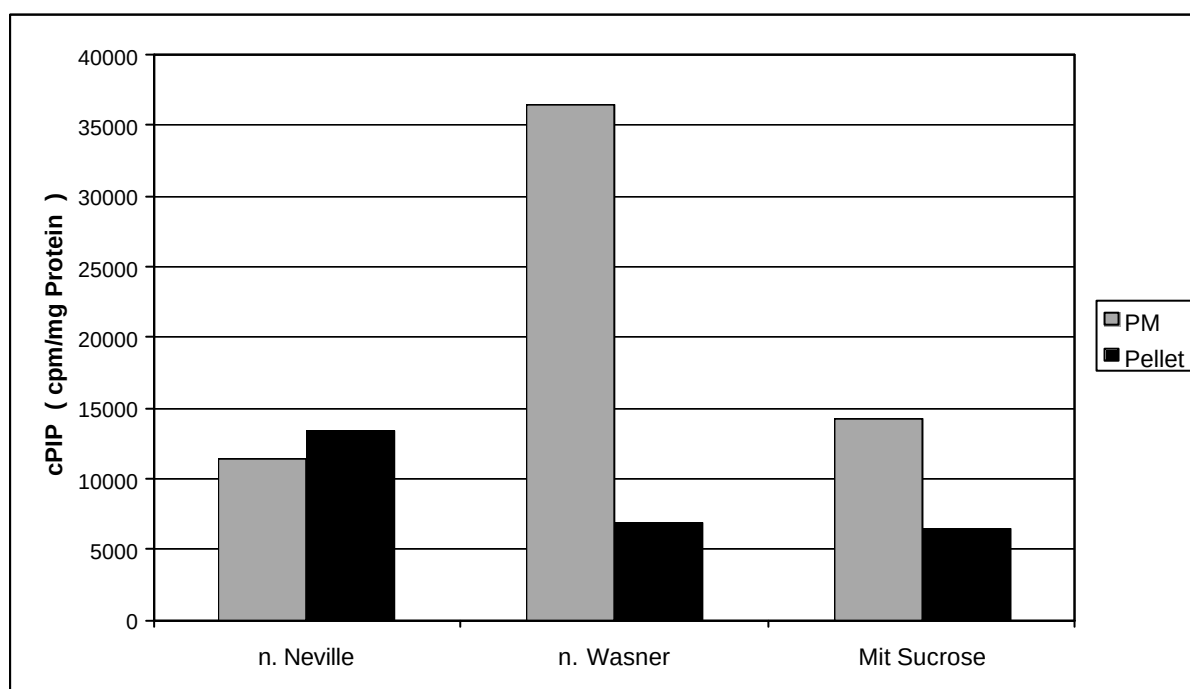


Abb. 3.4.: Spezifische cPIP-Synthase Aktivität in verschiedenen hergestellten Plasmamembranen. Wie im Methodenteil beschrieben, wurden Plasmamembranen 1. nach Neville (1968), 2. nach Wasner (1976) und 3. unter isotonen Homogenisationsbedingungen hergestellt. Zu Beschreibung der Methoden siehe 2.2.4, 2.2.5, 2.2.6. (PM = Plasmamembran; Pellet = Mitochondrien und Mikrosomen haltiges Sediment). In der modifizierten Methode nach Wasner wurde die beste Ausbeutung erzielt. Für alle weiteren Versuche in dieser Arbeit wurde diese Methode angewendet.

Aus der Abbildung 3.4 ist zu ersehen, dass nach der vereinfachten Methode nach Wasner in der Plasmamembranfraktion weitab die höchste cPIP-Synthase-Aktivität gefunden wurde. Möglicherweise ist die wesentlich höhere Ausbeute an cPIP-Synthase Aktivität auf die Anwesenheit von ATP in den Pufferlösungen zurückzuführen. Des Weiteren ist nicht zu übersehen, dass die die subzellulären Partikeln enthaltende Pelletfraktion überraschend viel cPIP-Synthase-Aktivität enthält.

3.2 Charakterisierung der Stabilität

3.2.1 Einfrieren und Auftauen

Zwei verschiedene Plasmamembranen werden 5mal aufgetaut und eingefroren im flüssigem Stickstoff (-196°C). Danach wird die verbliebene Aktivität der cPIP – Synthase gemessen. Es zeigt sich, wie in der Abbildung 3.5 zu sehen ist, dass die cPIP-Synthase Aktivität unabhängig von der Herstellung der PM um etwa 50 – 60% bei dieser verhältnismäßig schonenden Behandlung abnimmt.

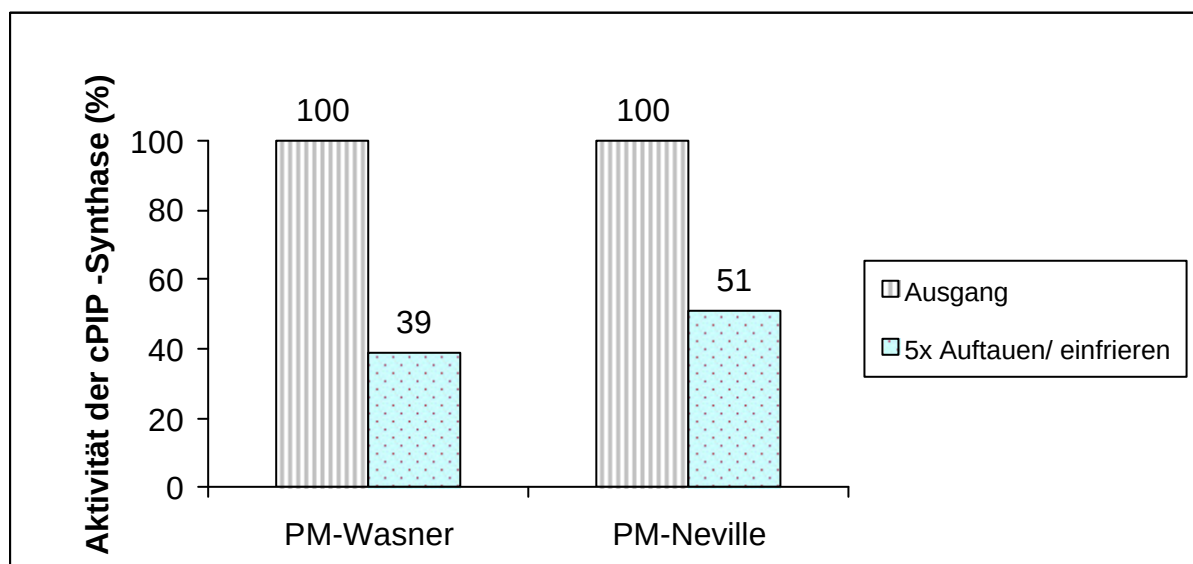


Abb. 3.5.: Einfluss von Auftauen und Einfrieren der Plasmamembranen auf die Aktivität der cPIP-Synthase. Die Aktivität der cPIP-Synthase zu Beginn des Versuches wurde 100 Prozent gesetzt und die nach 5-maligen Einfrieren und Auftauen verbliebene Aktivität in Prozenten des Ausgangswertes angegeben. Gemessen wurde an zwei verschieden hergestellte Plasmamembranen.

3.2.2 Verdünnen

Es werden wiederum zwei verschiedene Plasmamembranen 2mal mit 20 ml 10 mM Tris Puffer 20-fach verdünnt und danach sedimentiert (im SS-34 Rotor) bei 15000 rpm für 15 min. Die cPIP-Synthase-Aktivität der resuspendierten Plasmamembran wird dann gemessen. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 3.6 zu sehen. Es zeigt sich ein verhältnismäßig geringer Aktivitätsverlust von 15-30%, das heißt die cPIP-Synthase muss einigermaßen fest in der Membran-Struktur verankert sein.

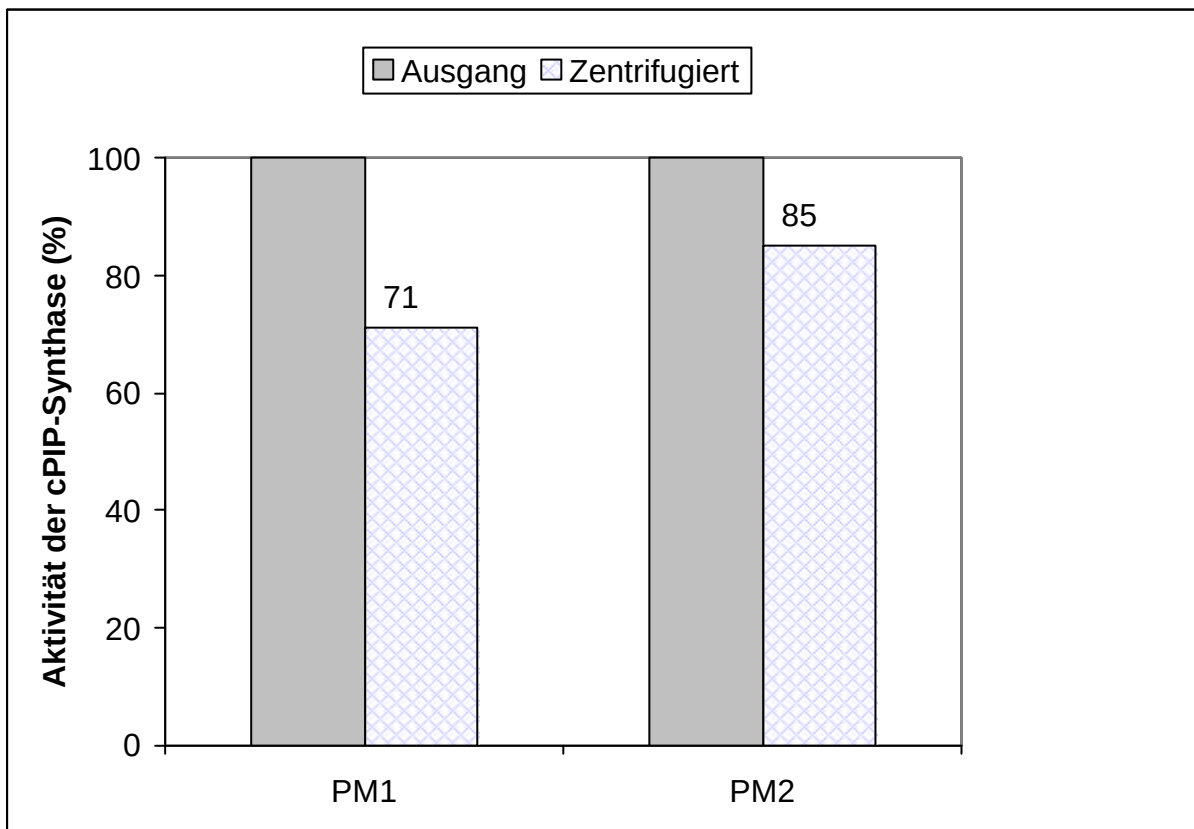


Abb. 3.6.: Sedimentierbarkeit der cPIP Synthase.

Die Aktivität der cPIP-Synthase zu Beginn des Versuches wurde 100 Prozent gesetzt und die nach 2-maligem 20-fachen Verdünnen und Resuspendieren verbliebene Aktivität wurde in Prozent des Ausgangswertes angegeben. PM1 bzw. PM2 sind zwei verschiedene Membranpräparationen.

3.2.3 Einfluss der Konzentration von der Saccharoselösung auf die Reinheit der Membran

Bei der Präparation der Plasmamembranen wurde das Leberhomogenat auf eine 48 %-ige Saccharose Lösung überschichtet. Es wurden verschieden konzentrierte Saccharose-Lösungen eingesetzt um zu überprüfen, ob dadurch bessere Ausbeuten zu erzielen sind. Die PM-Präparation erfolgte mit einer 49 %, und einer 50 %-igen Saccharoselösung sowie mit einem kontinuierlichen Saccharosegradienten.

Die cPIP – Synthase - Aktivität aller so gewonnenen Membranen wurden überprüft.

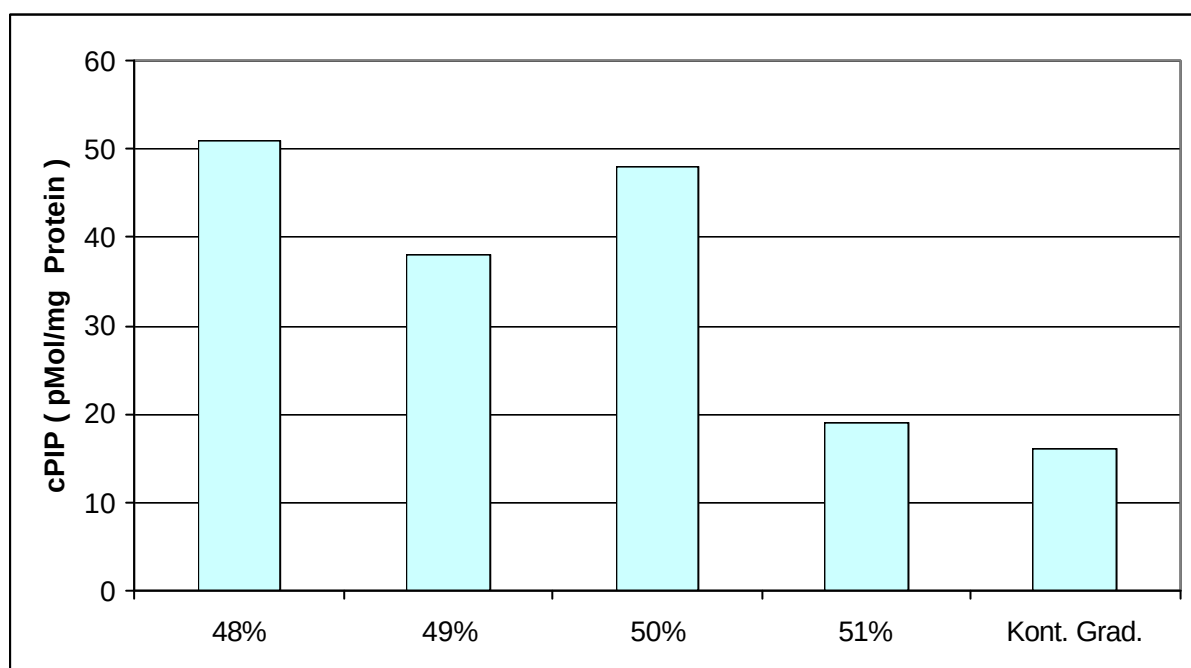


Abb. 3.7.: Anwendung und Einfluss verschiedener Saccharosekonzentrationen, bei der Plasmamembran Herstellung, auf die spezifische cPIP-Synthase Aktivität. Wie im Methodenteil (2.2.4) beschrieben wird das Leberhomogenat bei der primären Zentrifugation auf einem Saccharosegradienten aufgetragen. Die Abbildung zeigt den Einfluss von verschiedenen Konzentrationen der Saccharoselösung auf Ausbeute bzw. Reinheit der Plasmamembran, anhand der cPIP-Synthase Aktivität im Vergleich zu einem kontinuierlichen Gradienten (Kont. Grad.).

Aus der Abbildung 3.7 ist zu entnehmen, dass die Änderung der Saccharoselösung in gewissen Grenzen, d.h. zwischen 48 – 50%, keinen nennenswerten Einfluss auf die cPIP-Synthase-Aktivität pro mg Protein hat. Erst ab einer Saccharose Konzentration von 51% wird ein starker Abfall der Aktivität pro mg Protein beobachtet. Warum die Aktivitätsausbeute bei Anwendung eines linearen Saccharose Gradienten unvergleichlich niedrig war kann derzeit nicht beantwortet werden.

3.3 Charakterisierung der erhaltenen Zell-Fractionen mittels Leitenzymen

3.3.1 Succinat- INT – Reduktase als Leitenzym für Mitochondrien

In der Abbildung 3.8 sind die, in den verschiedenen Fraktionen, nämlich Plasmamembranen sowie subzellulären Partikeln wie Mitochondrien und Mikrosomen, gemessenen Aktivitäten veranschaulicht. Es ist zu sehen, dass in den 3 gemessenen Präparationen in der Plasmamembranfraktion nur sehr wenig, 2 – 3 % Prozent Succinat-Reduktase Aktivität gemessen werden konnte, also in der so erhaltenen Plasmamembranfraktion kaum Mitochondrien vorhanden sind.

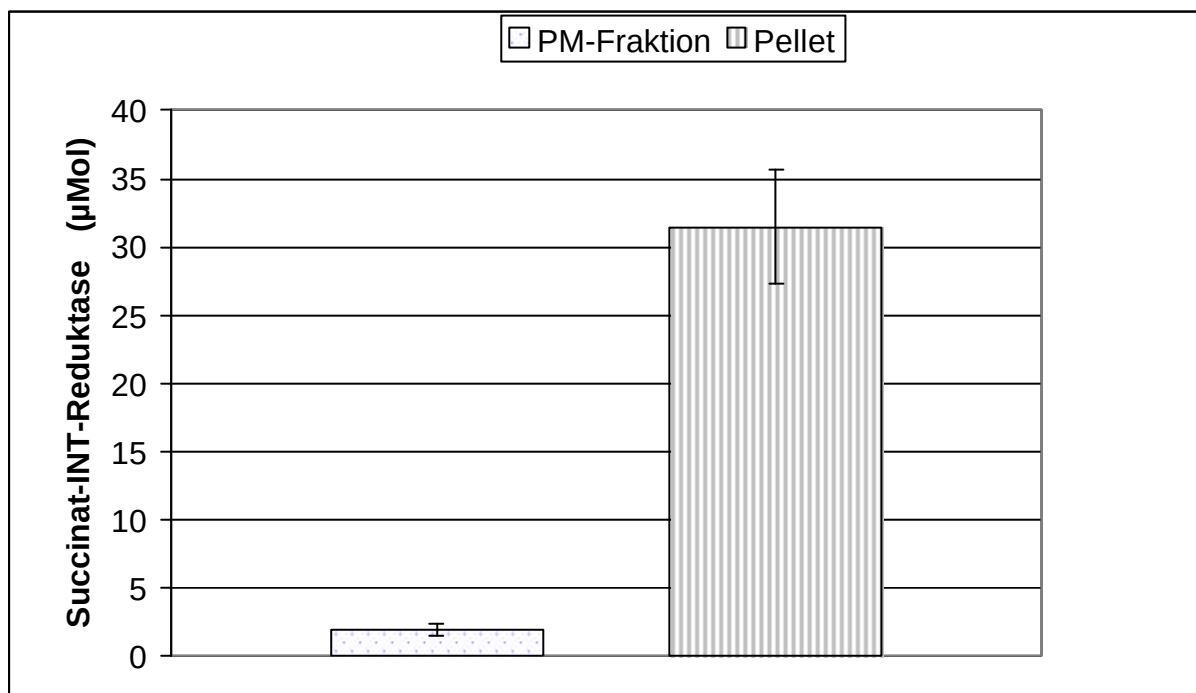


Abb. 3.8.: Als Leitenzym für Mitochondrien wurde die Succinat-INT-Reduktase gemessen.

In der Abbildung ist die Gesamtaktivität (Mittelwerte ($\pm$ SEM) $n=3$) pro Leber gezeigt. Es ist zu ersehen dass in der PM-Fraktion kaum Succinat-Dehydrogenase Aktivität vorhanden ist und daher kaum Mitochondrien enthält.

3.3.2 Glucose-6-phosphatase als Leitenzym für Mikrosomen

Das Ergebnis zeigt die Abbildung 3.9, bezogen auf die Gesamtmenge findet sich relativ geringe Aktivität von 11-16 Prozent der mikrosomalen Glucose-6-phosphatase in der Plasmamembran Fraktion. Jedoch, gibt man die Glucose-6-Phosphatase nicht als Gesamtaktivität an, sondern als Aktivität pro mg Protein, so ergeben sich die in dem Bild 3.10 gezeigten Werte, d.h. auf mg Protein bezogen ist die Glucose-6-Phosphatase Aktivität in der Plasmamembran höher als in der "Pellet" Fraktion. Zu erwarten wäre jedoch, dass die Glucose-6-phosphatase Aktivität in der Pellet Fraktion höher sein sollte. Eine mögliche Erklärung für diesen Befund könnte sein, dass die Pellet-Fraktion vor allem die Mitochondrien sowie andere subzelluläre Partikel enthält so, dass die Glucose-6-Phosphatase Aktivität bezogen auf mg Protein in dieser Fraktion niedrig aussieht aufgrund des Verdünnungseffektes. Jedoch, die Daten der Abbildung 3.10 veranschaulichen auch, dass die Plasmamembranfraktion Mikrosomen enthalten muss.

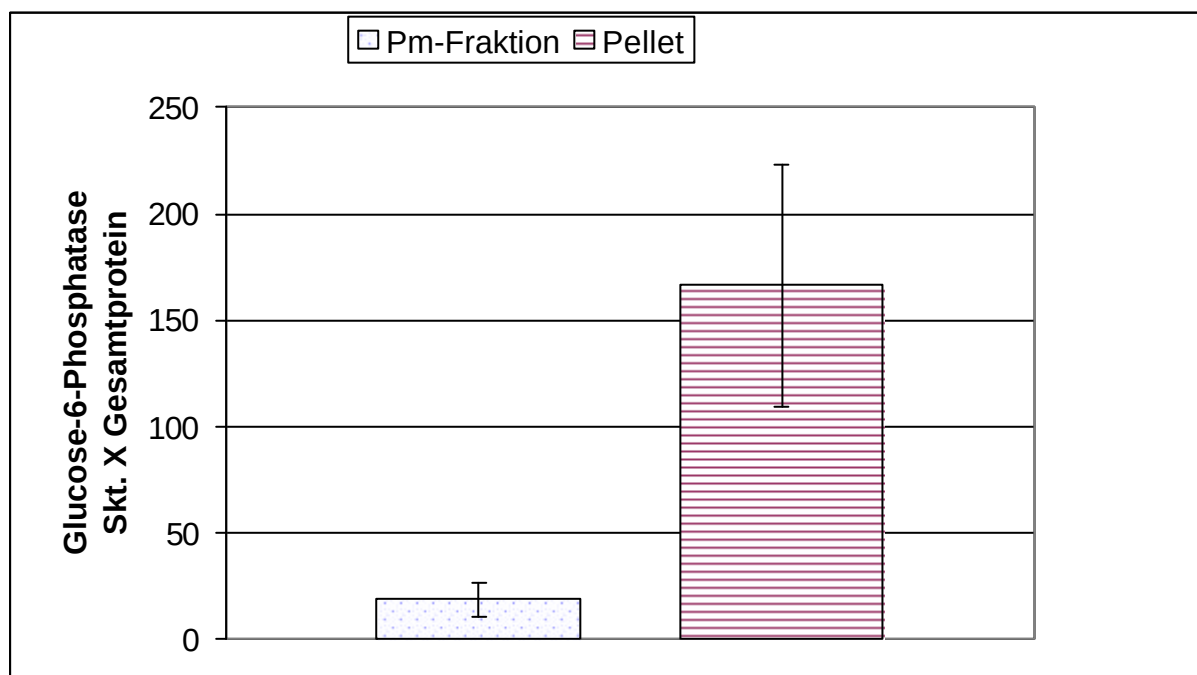


Abb. 3.9.: Gesamtaktivität an Glucose-6-Phosphatase in der Plasmamembran- und Pellet Fraktion. Es findet sich knapp zehnmal mehr Aktivität in der, die Mitochondrien und Mikrosomen enthaltenden, Pellet-Fraktion. Es sind Mittelwerte ($\pm$ SEM) aus $n=4$ Messwerten angegeben. (Skt.= Skalenteile)

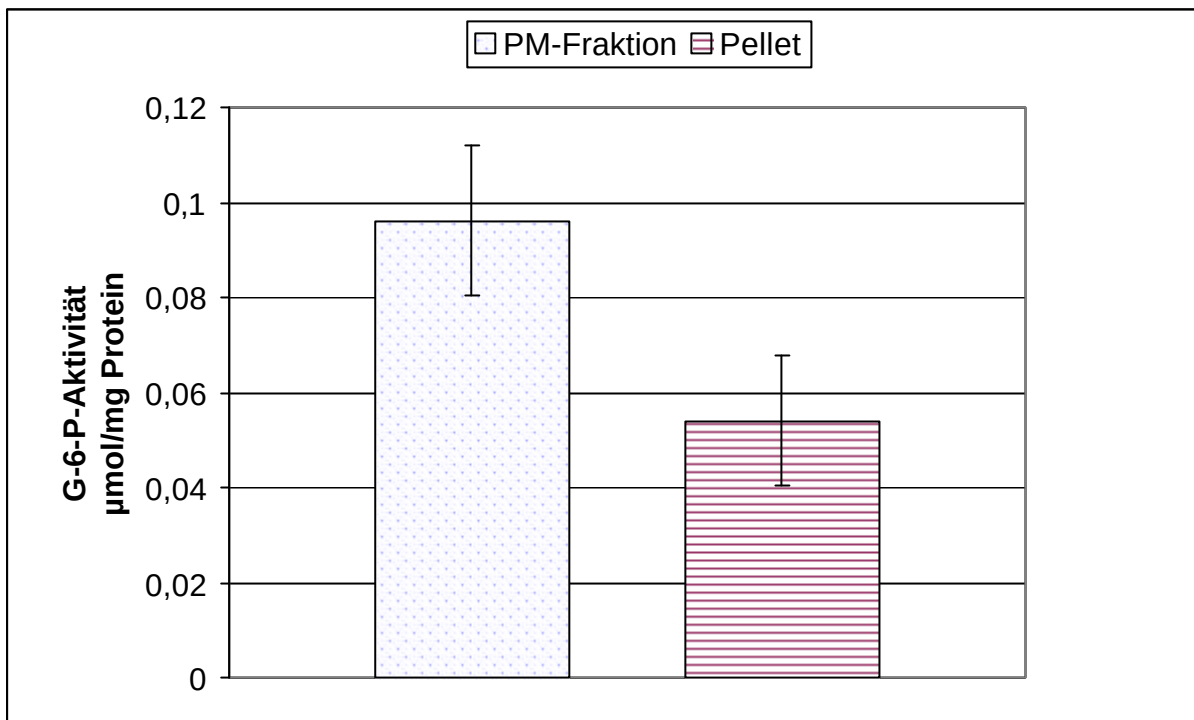


Abb. 3.10.: Die spezifische Aktivität an Glucose-6-phosphatase pro mg Protein der Plasmamembran- bzw. Pelletfraktion.
Es sind Mittelwerte ($\pm$ SEM) aus $n=4$ Messwerten angegeben.

3.3.3 Adenylylzyklase als Leitenzym für die Plasmamembran

Als Leitenzym für die Plasmamembran wurde die Adenylylzyklase verwendet. Es wurden basale, Glukagon sowie Forskolinstimulierte Aktivitäten gemessen. In der Abbildung 3.11 sind die Ergebnisse von 4 unterschiedlichen Präparationen zu sehen. Adenylylzyklase Aktivität wurde im Wesentlichen in der Plasmamembran-Fraktion gefunden. In der die subzellulären Partikel enthaltenden Pelletfraktion wurde in der Regel weniger als 20% der Zyklase-Aktivität gefunden. So gesehen, könnte man den Schluss ziehen, dass die Plasmamembran-Fraktion vor allem mit Mikrosomen verunreinigt ist und, dass die cPIP-Synthase analog der Adenylylzyklase dominant in der Plasmamembran lokalisiert ist. Es wurde jedoch folgende Beobachtung gemacht: Es ist daran zu erinnern, dass nach Abpipettieren der plasmamembranhaltigen Schicht nach dem einstufigen Saccharosegradienten in der Regel aus der erhaltenen Lösung, Plasmamembran durch 2-3-maliges Abzentrifugieren erhalten wurde.

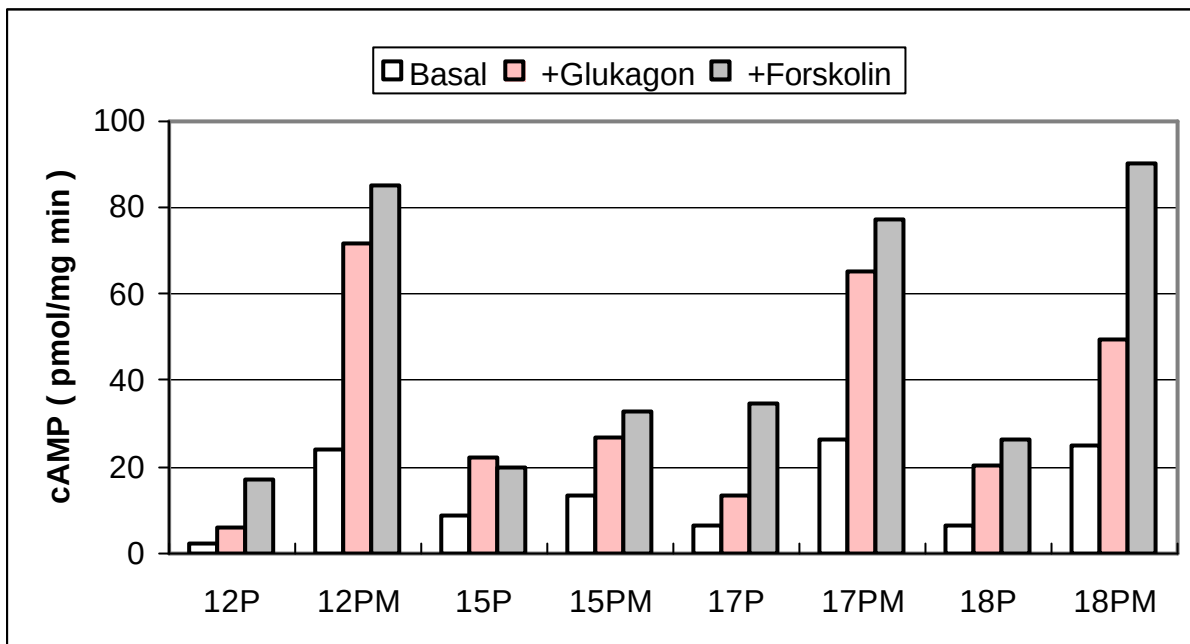


Abb. 3.11.: Adenylylzyklase als Leitenzym für die Plasmamembran.

Es wurde die basale, die durch Glukagon und Forskolin stimulierte Aktivität bestimmt. Die Nummerierungen 12 bis 18 stellen verschiedene Präparationen dar; P steht für Pelletfraktion und PM für Plasmamembranfraktion. Die Konzentration von Glukagon im Test war 5×10^{-8} M von Forskolin 3×10^{-5} M. Die Ausführung des Tests und die Auswertung sind unter 2.2.12 beschrieben.

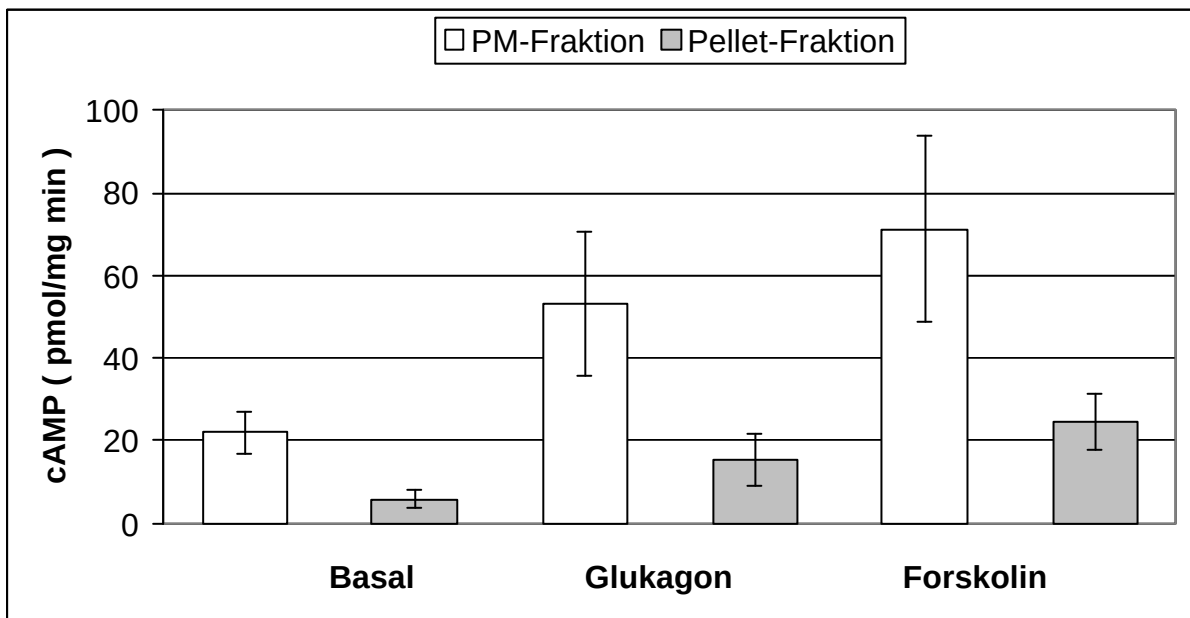


Abb. 3.12.: Adenylylzyklase Aktivität in der Plasmamembran Fraktion sowie in der, die innerzellulären Partikel (Mitochondrien und Mikrosomen) enthaltenden Pellet-Fraktion. Es sind Mittelwerte ($\pm$ SEM) aus den 4 Pellet- und Plasmamembran Fraktionen von Abb. 3.11 angegeben. Die Konzentration von Glukagon im Test war 5×10^{-8} M von Forskolin 3×10^{-5} M. Die Ausführung des Tests und die Auswertung sind unter 2.2.12 beschrieben.

Es ist der Abbildung 3.13 zu entnehmen, dass die Zykase Aktivität in dem Pellet der 1. Zentrifugation meist 3-4 fach höher ist als im Pellet der 2. Zentrifugation, während andererseits die cPIP-Synthase Aktivität meist in dem Pellet der 2. Zentrifugation höher war (Abbildung 3.14), d.h. diese Beobachtung legt nahe, dass es nicht eindeutig ist, dass die cPIP-Synthase ausschließlich in der Plasmamembran lokalisiert ist, sondern zeigt vielmehr auf, dass die cPIP-Synthase vermutlich auch in den, die Plasmamembran verunreinigenden Mikrosomen vorliegen muss.

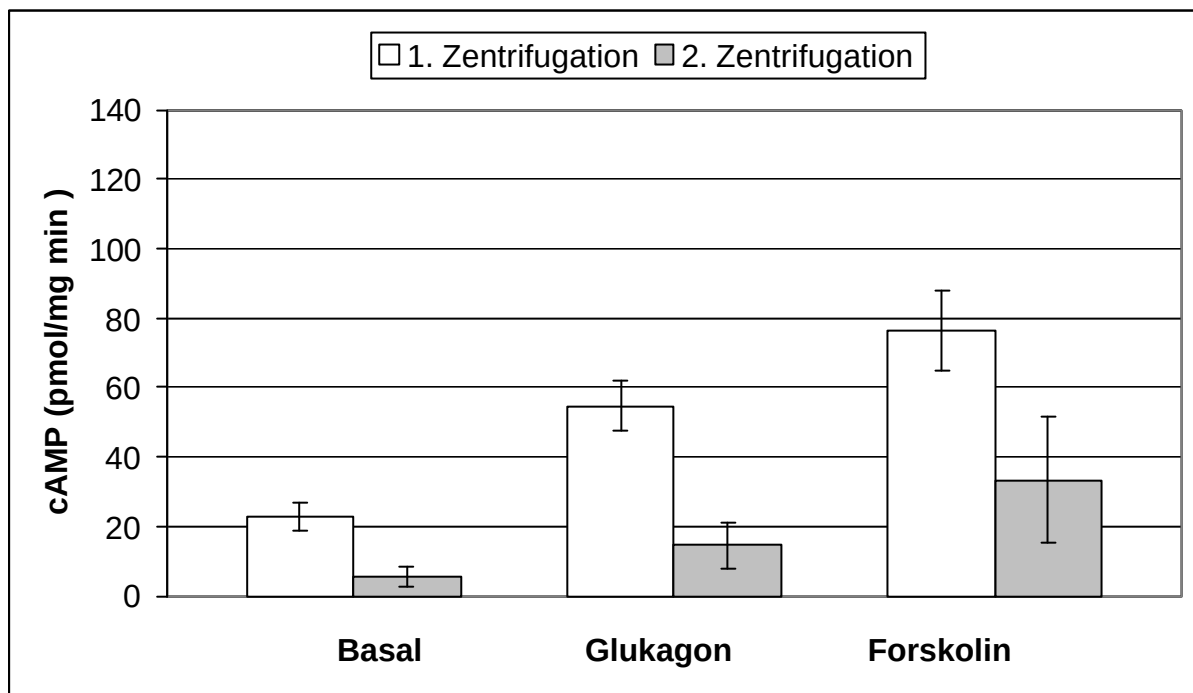


Abb. 3.13.: Aktivität der Adenylylzyklase der Plasmamembran Fraktion in der 1. sowie 2. Zentrifugation der Plasmamembran – Herstellung. Nach dem Saccharose-Gradienten wird die Plasmamembran-haltige Schicht mit Puffer verdünnt und die gewonnene Plasmamembran abzentrifugiert. Diese Zentrifugation wird wiederholt, da der Überstand nach der 1. Abzentrifugation noch sichtbar trüb war. Es sind Mittelwerte ($\pm$ SEM) aus n=3.

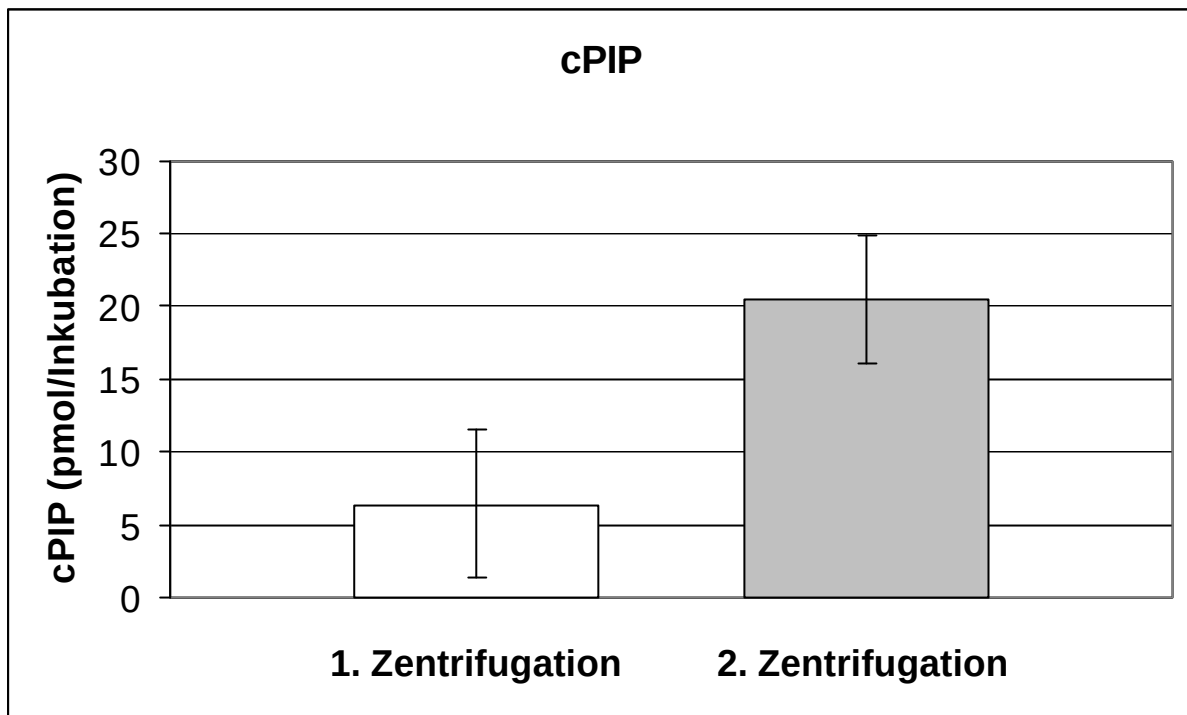


Abb. 3.14.: Verteilung cPIP-Synthase Aktivität in dem Sediment der 1. sowie 2. Zentrifugation der Plasmamembran-Herstellung. Membranen sind identisch mit denen aus Abb.3.13.

3.4 Aktivität der cPIP-Synthase in Tieren mit Diabetes und Hypertonie

3.4.1 Aktivität der cPIP-Synthase in diabetischen Ksj-db/db und Ksj Kontroll Mäusen

Aufgrund der Beobachtung, dass in diabetischen Tieren wesentlich geringere Mengen an cPIP nachgewiesen werden konnten (Wasner et al., 1994; 1997; Salge, 1987), war zu untersuchen, ob diese Beobachtung auf eine niedrigere cPIP-Synthase-Aktivität zurückgeführt werden kann. Um diesen Effekt überzeugend aufzuzeigen, wurde einmal die cPIP-Synthase-Aktivität der Plasmamembran-Fraktion pro mg Protein gemessen und zum zweiten wurde die cPIP-Synthase-Aktivität aller erhaltenen Fraktionen einer Plasmamembran-Präparation summiert und so die gesamte cPIP-Synthase Aktivität als pmol cPIP pro Gramm Leber bzw. pro Gesamtleber angegeben.

	c -PIP							
c-PIP Biosynthese In Ksj Mäuse	pMol/ mg Protein	(%)	pMol/ gr Leber	(%)	pMol/ Leber	(%)	Leber Gewicht (gr)	(%)
Kontroll	69,9	100	76,9	100	88,5	100	1,2	100
Ksj-db/db	44,7	64	45,3	59	128,9	145	2,8	246

Tabelle 3.2.: cPIP – Synthase Aktivität in der Plasmamembran-Fraktion der Leber von diabetischen Ksj-db/db und Ksj Kontroll Mäusen.

Aus jeweils 2 Lebern dieser Mäusearten wurde Plasmamembran hergestellt und dann die cPIP- Synthase Aktivität gemessen und die spezifische Aktivität pro mg Protein errechnet.

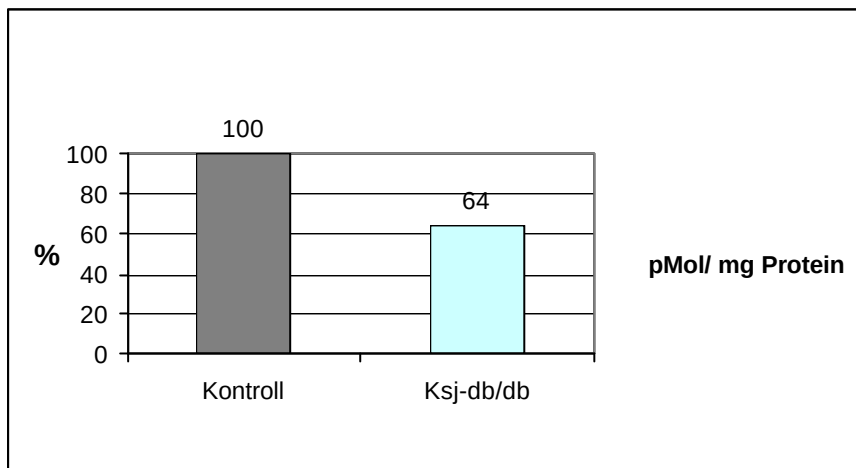


Abb. 3.15.: Versuche mit diabetischen Ksj-db/db Mäusen, sowie gesunden Kontroll-Tieren.

Aus der Abbildung ist zu ersehen dass die cPIP-Synthase Aktivität in der Plasmamembran der diabetischen Tiere deutlich reduziert ist. Angabe in % von 100 Ausgangwert bei den gesunden Tieren (n=2).

In Abbildung 3.15 ist zu ersehen, dass die cPIP-Synthase Aktivität in den diabetischen Mäusen um 40% niedriger ist als in gesunden Kontroll-Mäusen, unabhängig davon, ob diese Aktivität auf mg Protein oder Gramm Lebergewicht bezogen wird.

3.4.2 Aktivität der cPIP Synthase in SHR sowie Wistar Kyoto Kontroll Ratten

Es ist seit langem bekannt und vor allem durch die Arbeiten von Ferranini (Ferranini et al., 1987, 1997) erneut diskutiert worden, dass Typ -2- Diabetiker eine Prädisposition für Bluthochdruck haben, ebenso wie Patienten mit Bluthochdruck eine Prädisposition für Diabetes vom Typ -2- haben. Man kann sicher davon ausgehen, dass Typ -2-Diabetes mit dem Hormon Insulin in Zusammenhang steht, ebenso wie Bluthochdruck vor allem mit dem Hormon Noradrenalin zusammenhängt.

Beide Hormone, Insulin wie Noradrenalin, stimulieren die cPIP-Synthase (Wasner, 1981; Wasner et al., 1993). Es stellt sich daher die Frage, ob auch in Tieren mit Bluthochdruck, wie der spontan-hypertensiven SHR-Ratte, ebenfalls die cPIP-Synthase Aktivität erniedrigt sein könnte, wie in den diabetischen Mäusen.

Um das zu prüfen wurden Membranen mit aktiver cPIP-Synthase wie beschrieben hergestellt und zwar von 2 Monate alten SHR-Ratten und entsprechenden Kontrolltieren. Wie der Abbildung 3.16 zu entnehmen ist, wurde auch im Falle der SHR - Ratten eine signifikant reduzierte cPIP - Synthase - Aktivität von 25-30 % gefunden in 3-Wiederholungs-Versuchen, so dass der oben angesprochene spekulative Zusammenhang durchaus richtig zu sein scheint.

c-PIP Biosynthese	c -PIP						Leber Gewicht (gr)	(%)
	pMol/ mg Protein	(%)	pMol/ gr Leber	(%)	pMol/ Leber	(%)		
Wistar Kyoto	27,0	100	52,2	100	721,4	100	13,8	100
SHR Ratten	19,7	73,4	44,1	84,4	462,6	64,1	10,5	76

Tabelle 3.3.: cPIP - Synthase Aktivität in der Plasmamembran-Fraktion der Leber von SHR sowie Wistar Kyoto Kontroll-Ratten.

Aus jeweils 2 Lebern der angegebenen Rattenarten wurde Plasmamembran hergestellt und dann die cPIP-Synthase Aktivität gemessen und die spezifische Aktivität pro mg Protein und pro gr Lebergewicht errechnet.

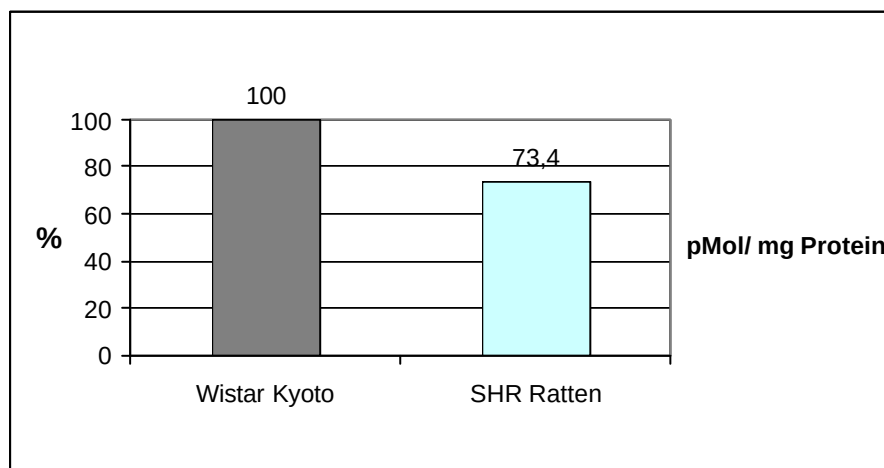


Abb. 3.16.: cPIP-Synthase Aktivität der Leber in hypertensiven SHR-Ratten und in Wistar-Kyoto Ratten (Kontrolle).

Analog wie bei den diabetischen Tieren zeigt sich auch hier eine erniedrigte cPIP-Synthase Aktivität bei den hypertensiven Ratten (n=3).

4 DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Präparation aktiver cPIP-Synthase zu charakterisieren und zu optimieren. Die ausgeführten Versuche zeigen, dass die cPIP-Synthase fest an Membran-Strukturen gebunden ist und sich nicht durch Verdünnen und Zentrifugieren abdissoziieren lässt (Abbildung 3.6). Andererseits gibt der in der Abbildung 3.5 gezeigte Versuch einen klaren Hinweis dafür, dass die cPIP-Synthase ein Enzym mit ausgeprägter Labilität ist, da bereits der relativ schonende Vorgang des mehrmaligen Einfrierens und Auftauens zu einem erheblichen Aktivitätsverlust von 50% führt. In jüngeren Arbeiten (Wasner et al., 2000) wurde gezeigt, dass die cPIP-Synthase durch Protein - Tyrosindephosphorylierung inaktiviert wird. Es ist vorstellbar, dass die beobachtete Labilität mit dieser Dephosphorylierung in Zusammenhang steht. Es ist ohne zusätzliche, weitere Versuche schwer, die sehr unterschiedlichen Ausbeuten an cPIP-Synthase Aktivitäten (Abbildung 3.4) zu erklären, die bei den angewandten, etwas unterschiedlichen Präparationsmethoden erhalten wurden. Jedoch erscheint folgende Interpretation sehr plausibel: im Falle der Membranpräparation nach Wasner enthielten die Homogenisationspuffer eine niedrige Konzentration an ATP so, dass durch Tyrosinphosphorylierung ein Aktivierungsmechanismus im Gang gehalten worden sein kann, in Umkehrung der oben diskutierten Inaktivierung des Enzyms durch Protein-Tyrosindephosphorylierung.

Zur Charakterisierung der membranständigen Lokalisation der cPIP-Synthase wurde als Leitenzym für Mitochondrien die Succinatreduktase, als Leitenzym für Mikrosomen die Glucose-6-phosphatase und als Leitenzym für die Plasmamembran die Adenylylzyklase ausgewählt. Die Versuche mit Succinatreduktase zeigten deutlich, dass die cPIP-Synthase nicht in den Mitochondrien vorliegt. Im Falle des Leitenzyms für die Mikrosomen ist eine entsprechende Entscheidung nicht so eindeutig zu fällen. Eine Schwierigkeit liegt darin, dass durch den vereinfachten Sucrose-Gradienten nur eine Plasmamembranfraktion neben einer alle restlichen Partikel enthaltenden Pelletfraktion erhalten wurde. Diese Vereinfachung wurde gewählt, da davon ausgegangen wurde, dass die cPIP-Synthase analog der Adenylylzyklase 100 prozentig in der Plasmamembran-Fraktion vorliegt, und es nur darum geht eine Plasmamembran-Fraktion auf schnellstem Wege zu gewinnen, um wie oben angedeutet, nicht allzu viel der cPIP-Synthase Aktivität durch

Dephosphorylierung zu inaktivieren. Die in den Abbildungen 3.11 und 3.12 gezeigten Daten weisen jedoch ziemlich zweifelsfrei daraufhin, dass die cPIP-Synthase nicht ausschließlich in der Plasmamembran vorliegt. Aufgrund der, in den Abbildungen 3.9 und 3.10 gezeigten Daten könnte angenommen werden, dass cPIP-Synthase auch in den Mikrosomen vorliegt. Folgende Berichte und weiterführenden Versuche stützen diese Annahme: Vor allem die Arbeitsgruppe von Barry Posner zeigte sehr detailliert, dass der Insulin-Rezeptor nicht nur in der Plasmamembran sondern auch in den leichten Mikrosomen Fraktionen nachgewiesen werden kann (Bevan et al. 1995, Bablis et al., 2000). In den letzten Monaten wurde im Labor von Dr. Wasner wiederholt eine detaillierte Zellfraktionierung durchgeführt, die eindeutiger zeigte, dass tatsächlich in den Mikrosomen eine beachtliche cPIP-Synthase-Aktivität vorhanden ist (Wasner und Hucken, noch nicht publiziert).

Diese Zellfraktionierung wurde nicht nur wegen der hier vorliegenden Daten durchgeführt, sondern vor allem wegen des folgenden Befundes, dass Anti-IRS-1- bzw. Anti-IRS-2-Antikörper auch cPIP-Synthase binden. Auch wenn es derzeit nicht ausgeschlossen werden kann, dass dies nur ein unspezifischer Effekt sein könnte, so wurde doch dieser Beobachtung nachgegangen. Die Docking-Proteine IRS-(1-2) liegen vor allem cytosolisch oder nur an die leichten Mikrosomen gebunden vor. Es scheint sich herauszukristallisieren, dass auch die cPIP-Synthase vor allem in den leichten Mikrosomen lokalisiert werden kann. Die in dieser Arbeit aufgezeigte Beobachtung, dass die cPIP-Synthase nicht in Analogie zur Adenylylzyklase ausschließlich in der Plasmamembran verankert ist, sondern mehr in der leichten Mikrosomen Fraktion, wurde dadurch bestätigt. Die Präsenz sowohl von Insulin-Rezeptoren, sowie von den Dockingproteinen IRS-(1-2) (Kerouz et al. 1997) und auch von cPIP-Synthase in den Mikrosomen würde dafür sprechen, dass die leichte Mikrosomen Fraktion ein Ort zu sein scheint, von dem aus Insulin seine innerzellulären Wirkungen entfaltet.

Die in dieser Arbeit aufgezeigten Befunde erlauben, die in Abbildung 4.1 dargestellte Wirkungsweise von Hormonen, wie Insulin, zu diskutieren.

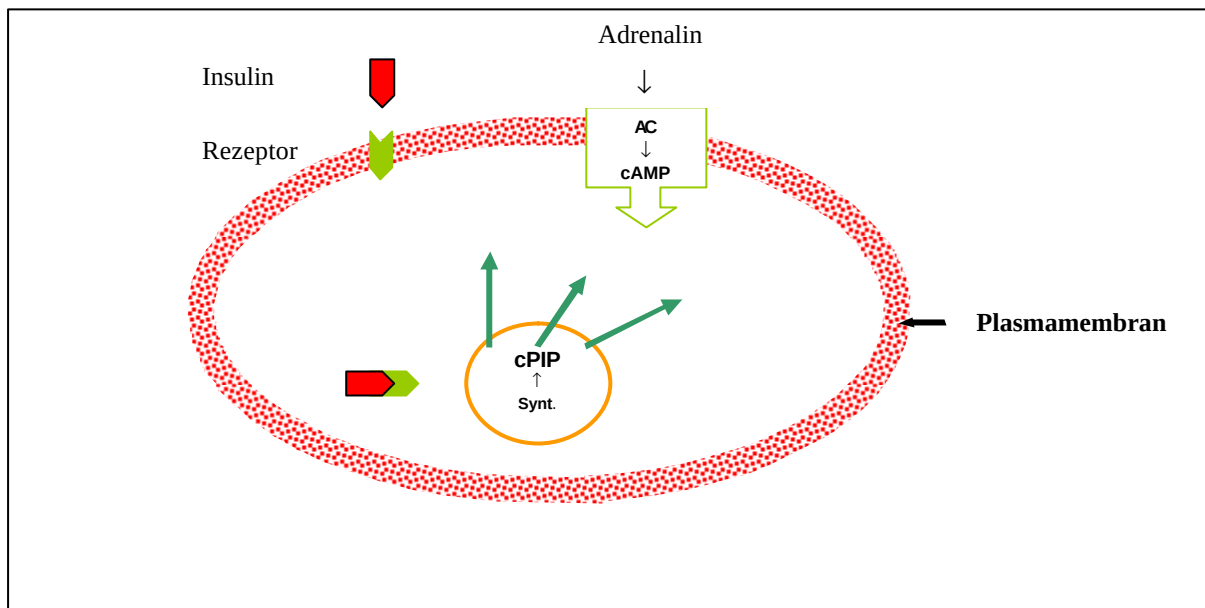


Abb. 4.1: Modellvorstellung hormoneller Wirkungsweisen
(AC = Adenylylzyklase, Synt. = cPIP-Synthase).

Wie rechts oben im Bild dargestellt, im Falle der Adrenalin-stimulierten cAMP-Synthese ist das Synthese – Enzym Adenylylzyklase in der Plasmamembran verankert und der Hormonbote cAMP bringt von der Zellwand aus das Signal in die Zelle.

Wie links und im unteren Teil der Abbildung dargestellt, kann man für das Hormon Insulin (aufgrund der, in dieser Arbeit gezeigten Befunde) den folgenden Signaltransduktionsmechanismus zur Diskussion stellen: Insulin bindet an seinen in der Plasmamembran verankerten Rezeptor. Darauf folgend wird Rezeptor und gebundenes Insulin internalisiert, und wie vor allem die Arbeiten der Arbeitsgruppe vom Barry Posner (Bevan et al. 1995, Bablis et al. 2000) zeigten, in das endoplasmatische Retikulum transloziert. Hier soll die Insulin-Rezeptor-Tyrosin-Kinase auch nach abdissozieren des Insulins in einem aktiveren Zustand bleiben. Es ist vorstellbar und nahe liegend, dass dieser translozierte Insulin-Rezeptor, die in der leichten Mikrosomenfraktion verankerte cPIP-Synthase durch Tyrosin-Phosphorylierung aktiviert.

In diesem Fall der Hormonwirkung würde der innerzellulär synthetisierte second Messenger cPIP nicht von der Plasmamembran, sondern vom Zellinneren aus sein Signal durch die Zelle schicken, wenigstens zum Teil gegen die Signalrichtung des

Gegenregulierenden Hormonboten cAMP. Ob in dieser Gegenläufigkeit der Signalrichtung der ganze Grund für diese komplizierte Wirkungsweise liegt kann derzeit nicht beantwortet werden.

In jeweils zwei bis drei unabhängigen Versuchen, d.h. der Herstellung von Membran-Fractionen mit aktiver cPIP-Synthase und Messung deren Aktivitäten, wurde gefunden, dass sowohl in diabetischen Mäusen wie auch in hypertensiven Ratten die cPIP-Synthase Aktivität verringert ist. In den diabetischen Mäusen wurde durchwegs eine Verringerung von mehr als 40% beobachtet, während in den verwendeten hypertensiven Ratten nur eine Verringerung von 25% gefunden wurde. Es wurden nur erst 2 Monate alte Ratten für diesen Versuch eingesetzt. Es ist anzunehmen, dass größere Effekte zu messen gewesen wären, wenn ältere Tiere von wenigstens 5-7 Monaten verwendet worden wären.

Auch wenn derzeit immer noch nicht cPIP als zentraler, integraler Bestandteil der Signaltransduktion des Insulins und auch der des Noradrenalins, im Falle der α - Rezeptoren, akzeptiert wird, so ist doch sehr interessant, dass im Falle dieser beiden kranken Tierarten eine verminderte cPIP-Synthase Aktivität nachgewiesen werden konnte. Die weiterführende, zentrale Frage ist: Was ist bzw. sind die Ursache(n), die eine reduzierte Aktivität der cPIP-Synthase bewirken? Trotz dieser offenen Frage könnte es doch eine bestechende Erklärung sowohl für den Typ -2-Diabetes wie für den Bluthochdruck sein, dass die Entstehung beider Krankheiten mit einer Verringerung der cPIP-Synthase Aktivität im Zusammenhang stehen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Seit Jahren zählt der cAMP-Antagonist cPIP (Prostaglandininositol-cyclophosphat) zu den möglichen second messengern des anabolen Hormons Insulin aber auch von Noradrenalin (α -Rezeptor-Wirkung). Für seine Biosynthese werden Prostaglandin E_1 neues Inositol-phosphat sowie das cPIP-Synthase genannte Enzym benötigt. Als möglicher Syntheseort wurde bislang die Plasmamembran angenommen, analog zur Lokalisation der Adenylzyklase in der Plasmamembran. Eines der Ziele dieser Arbeit war, die Synthese dieses Enzymes zu optimieren und zu charakterisieren. In den ausgeführten Versuchen mit aus Ratten gewonnener Leber-Plasmamembran wurde gefunden, dass die cPIP-Synthase ein partikuläres Enzym ist mit ausgeprägter Labilität. Diese Labilität wurde mit Protein Tyrosindephosphorylierung erklärt. Versuche mit Leitenzymen zeigten, dass die cPIP-Synthase nicht in den Mitochondrien vorkommt, wohl aber in der Mikrosomenfraktion. Dieser Befund steht im Einklang mit der von anderen Arbeitsgruppen gemachter Beobachtung, dass der Insulin-Rezeptor ebenfalls nicht ausschließlich in der Plasmamembran zu finden ist sondern auch in der leichten Mikrosomenfraktion.

Weiterhin wurde, die cPIP-Synthase Aktivität in Membranfraktionen diabetischer Mäuse und hypertensiver Ratten gemessen. Es wurden signifikant um bis zu 40% reduzierte Werte im Vergleich zu den entsprechenden Kontrolltieren gefunden. Es ist allgemein anerkannt, dass im Rahmen des metabolischen Syndroms Diabetiker eine Prävalenz für Hypertonie haben, ebenso wie Hypertoniker zu Diabetes neigen. Die in dieser Arbeit gezeigten Daten, einer verminderten cPIP-Synthase Aktivität in den vorgenannten kranken Tieren geben eine mögliche Erklärung zur Pathophysiologischen Entstehung dieser Erkrankungen.

6 LITERATUR

Ahn, J., Donner, D.B., and Rosen, O.M., 1993, Interaction of the human insulin receptor tyrosin kinase from the baculovirus expression system with protein kinase C in a cell-free system, *J. Biol. Chem.*, 268, 7571-7576.

Amini, H., 1993, Der hormonell regulierte Glucose-Transport in Fettzellen und der Effekt von cPIP, Diplomarbeit aus der biochemischen Abteilung des Diabetes-Forschungsinstitutes an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Balbis, A., Baquiran, G., Bergeron, J.J.M., and Posner, B.I., 2000, Compartmentalization and Insulin-Induced Translocations of Insulin Receptor Substrates, Phosphatidylinositol 3-Kinase, and Protein Kinase b in Rat Liver, *Endocrinology*, 141:4041-4049.

Banting, F. G. and Best, C. H., 1922, The internal secretion of the pancreas, *J. Lab. Clin. Med.*, 7, 251-266.

Banting, F. G., Best, C. H., Collip, J. B., MacLeod, J. J. R., 1922a, Physiological effects of insulin, *Proc. Trans. Roy. Soc. Can.*, V16, 27-34.

Banting, F. G., Best, C. H., MacLeod, J. J. R., 1922b, The internal secretion of the pancreas, *Am. J. Physiol.*, 255, CI-CI 1.

Bergmeier, H.U., 1974, Glucose-6-phosphatase, Methoden der enzymatischen Analyse (Band I), 3.Auflage Verlag Chemie Weinheim, Bergstr., pp. 909-913.

Bevan, A. P., Burgess, J. W., Drake, P. G., Shaver, A., Bergeron, J. J. M., Posner, B. I., 1995, Selektive Activation of the Rat Hepatic Endosomal Insulin Receptor Kinase, *J. Biol. Chem.*, 270,10784-10791.

Chiasson, J.-L., Dietz, M. R., Shikama, H., Wooten, M., Exton, J. H., 1980, Insulin regulation of skeletal muscle glycogen metabolism. *Am. J. Physiol.* 239: E69-E74.

Debant, A., Clauser, E., Ponzio, G., Filloux, C., Auzan, C., Contreres, J-O., Rossi, B., 1988, Insulin receptor mutates on Tyr 1162-1163, displays the mitogenic effect but not the rapid effects of the hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8032-8036.

Ferranini, E., Buzzigoli, G., Bonadonna, R., Giorico, MA, Oleggini, M., Griaziadei, L., Pedrinelli, R., Brandi, L. and Bevilacqua, S., 1987 Insulin resistance in essential hypertension. New Engl. J Med 317: 350-357.

Ferranini, E., Natali, A., Bell, P., Cavallo-Perin, P., Lalic, N., Mingrone, G., 1997, Insulin resistance and hypersecretion in obesità. European Group for the study of Insulin Resistance (EGIR), J Clin Invest Sep 1; 100 (5): 1166-73.

Fiske, C.H. and Subbarow, Y., 1925, The colorimetric determination of phosphorus, J. Biol. Chem., 66, 375.

Gypakis, A., 1999, Untersuchungen zur Biosynthese von aktiviertem Inositolphosphat Inaugural-Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Düsseldorf.

Gypakis, A., Wasner, H.K., 2000, Phosphatidylinositol 3-kinase and Prostaglandin cyclic phosphate (cPIP), a mediator of insulin action, in the signal transduction of insulin. Biol. Chem. 381. 1139-1141.

Haysteas, T. A., Campell, D. G., Hardie, D. G., 1988, Analysis of sites phosphorylated an acetyl-CoA carboxylase on response to insulin in isolated adipocytes. Comparison with sites phosphorylated by casein kinase-2 and the calmodulin-dependent multiprotein kinase. Eur. J. Biochem. 175: 347-54.

Hubbard, M.J. and Cohen, P., 1993, On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation, Trends Biochem. Sci., 18:172-177.

Hubbard, S. R., and Till, J. H., 2000, Protein tyrosin kinase Structure and function, Annu. Rev. Biochem., 69:373-98.

Hunter, T., 2000, Signaling – 2000 and beyond, Cell 100:113-127.

Jaffe, B.M., Behrmann, H.R., and Parker, C.W., 1973 Radioimmunoassay measurement of prostaglandine E, A und F in human plasma, J. Clin. Invest., 52:398-405.

Jones, D.R., and Varela-Nieto, I., 1999. Diabetes and the role of inositol-containing lipids in insulin signaling. Mol. Med. 5:505-514.

Kahn, C.R., Banting lecture 1994, Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes. *Diabetes* 43: 1066-1084.

Kerouz, N.J., Horsch, D, Pons, S., Kahn, C.R., 1997, Differential regulation of insulin receptor substrates-1 and -2 (IRS-1 and IRS-2) and phosphatidylinositol 3-kinase isoforms in liver and muscle of the obese diabetic (ob/ob) mouse. *J Clin Invest*, 100:3164-3172.

Larner, J., and Huang, L.C., 1999. Identification of a novel inositol glycan signaling pathway with significant therapeutic relevance to insulin resistance: an insulin signaling model using both tyrosine kinase and G-Proteins. *Diabetes Reviews* 7, 217-213.

Lawrence, J.C. Jr, 1992, Signal transduction and protein phosphorylation in the regulation of cellular metabolism by insulin, *Annu. Rev. Physiol.*, 54, 177-193.

Lemoine, H., and Kaumann, A.J., 1991 Regional differences of β_1 - and β_2 -adrenoceptor-mediated functions in feline heart. A β_2 -mediated positive inotropic effect possibly unrelated to cyclic AMP. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 344, 56-69.

Leßmann, M., 1991, Zur in vitro' Biosynthese des cAMP-Antagonisten Prostaglandylinositol-cyclophosphat (cPIP). Thesis, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Mahadev, K., Zilbering, A., Zhu, L., and Goldstein, J. B., 2001, Insulin-stimulated Hydrogen Peroxide Reversibly Inhibits Protein-tyrosine Phosphatase 1B in Vivo and Enhances the Early Insulin Action Cascade. *J.Biol.Chem.* 276, 21938 – 21942.

Maller, J.L., Pike, L. J., Freidenberg, G.R., Cordera, R., Stith, B.J., Olefsky, J.M., Krebs, E. G., 1986, Increased phosphorylation of ribosomal protein S6 following microinjection of insulin receptor-kinase into *Xenopus* oocytes. *Nature (London)* 320: 459-461.

Mirmohammadsadegh, A. 1993, Zur Reinigung des Kochsafts-faktors der cPIP Biosynthese, dem "neuen Inositol-Phosphat", Diplomarbeit aus der biochemischen Abteilung des Diabetes-Forschungsinstitutes an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Morre, J.D. 1971, Isolation of golgi apparatus, In: Methods of Enzymology Volume XXII (Jakoby, W.B. ed.) Academic Press: London and New York, pp. 130-148.

Neville Jr., D.M., 1968, Isolation of an organ specific protein antigen from cell-surface membrane of rat liver, *Biochim. Biophys. Acta* 154, 540-552.

O'Brien, R.M. and Granner, D.K., 1991, Regulation of gene expression by insulin" *Biochem. J.*, 278, 609-619.

Partke, H.-J. and Wasner, H.K., 1987, Cyclic AMP-antagonist, a second messenger for insulin action, inhibits glucose-stimulated insulin secretion in isolated islets of chinese hamsters. In: *Biophysics of the Pancreatic β -Cell* (Atwater 1, Rojas E, Soria B, eds.), Plenum Press: New York, pp. 409-412.

Patel, M. S., Roach, T. E., 1990, Molecular biology and biochemistry of pyruvate dehydrogenase complexes. *FASEB J.* 4: 3224-33.

Salge U., 1987, Untersuchungen zur biologischen Synthese des cAMP-Antagonisten. Inaugural-Dissertation, Mathematisch Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität Düsseldorf.

Salomon, Y., Londos, C., and Rodbell, M. 1974 A highly sensitive adenylate cyclase assay. *Anal. Biochem.* 58, 541-548.

Saltiel, A.R., 1990a, Second messengers of insulin action, *Diabetes Care*, 13:3, 244-256.

Saltiel, A.R., 1990b, Signal transduction in insulin action, *J. Nutr. Biochem.* 1, 180-188.

Saltiel, A.R., Rose, D.W., Majumdar, M., Decker, S.J. and Olfsky, J.M., 1994, Insulin receptor substrate-1 is required for insulin-mediated mitogenic signal transduction, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 797-801.

Shashkin, P.N., Wasner, H.K., Ortmeyer, H.K., Hansen, B.C., 2001, Prostaglandin-inositol cyclic phosphate (cPIP): a novel second messenger of insulin action. Comparative analysis of two kinds of insulin mediators, *Diabetes Metab Rev*, 17: 273-284.

Smith, L. D., 1989, The induction of oocyte maturation: transmembrane signalling events and regulation of the cell cycle. *Development* 107: 685-699.

Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E., Goetze, N.M., Olsen, B.J., and Klenk, D.C., 1985, Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal. Biochem.*, 150, 76-85.

Straus, D.S., 1984, Growth-stimulatory actions of insulin in vitro and in vivo, *Endoc. Rev.*, 5, 356-369.

Varela-Nieto, J., Leon, Y., and Caro, H.N., 1996. Cell signalling by inositol phosphoglycans from different species. *Comp. Biochem. Physiol.* 115B, 223-241.

Wasner, H.K., 1975, Regulation of protein kinase and phosphoprotein phosphatase by cyclic AMP and cyclic AMP antagonist. *FEBS Lett.*, 57, 60-63.

Wasner, H.K., 1976, Preparation of a liver plasma membrane with an adrenaline-responsive cyclase after inhibition of prostaglandine synthesis by indomethacin. *FEBS Lett.*, 72, 127-130.

Wasner, H.K., 1981, Biosynthesis of cyclic AMP antagonist in hepatocytes from rats after adrenalin or insulin-stimulation. *FEBS Lett.*, 133, 260-264.

Wasner, H.K., 1985, Prostaglandylinositol cyclic phosphate, an antagonist to cyclic AMP. In: *Prostaglandines, Leucotrienes, and Lipoxins* (Bailey JM, ed.), Plenum Press: New York, pp. 251-257.

Wasner, H.K. and Salge, U., 1987a, Prostaglandylinositol cyclic phosphate, an antagonist to cyclic AMP, in: *Advances in Prostaglandin, Tromboxane, and Leucotriene Research Vol. 17* (Samuelsson B, Paoleffi R, Ramwell PW, eds.), Raven Press: New York, pp. 691-695.

Wasner, H.K. and Salge, U., 1987b, Prostaglandyl-inositol cyclic phosphate, a second messenger for insulin. In: *Recent Trends in Management of Diabetes Mellitus* (Sakamoto N, Alberti KGMM, Hotta N, eds.), Excerpta Medica: Amsterdam, International Congress Series No. 726, pp. 226-231.

Wasner, H.K., Lemoine, H., Junger, E., Leßmann, M. and Kaufmann, R., 1991, Prostaglandylinositol cyclic phosphate, a new second messenger. In: *Prostagla-*

ndines, Leukotrienes, Lipoxins and PAF (Bailey JM, ed.), Plenum Press; New York, pp 153- 169.

Wasner, H.K., Salge, U. and Gebel, M., 1993, The endogenous cyclic AMP antagonist, cyclic PIP: its ubiquity, hormone stimulated synthesis, and identification as prostaglandylinositol cyclic phosphate. *Acta Diabetol.*, 30, 220-232.

Wasner, H.K., Weber, S., Partke, H.-J. and Amini-Hadi-Kiashar, H., 1994, Indomethacin treatment causes loss of insulin action in rats: involvement of prostaglandines in the mechanism of insulin action. *Acta Diabetol*, 31: 175-182.

Wasner, H.K., Leßmann, M., Conrad, M., Amini, H., Psarakis, E., Mir-Mohammad-Sadegh, A., 1996, Biosynthesis of the endogenous cyclic adenosine monophosphate (AMP) antagonist, prostaglandylinositol cyclic phosphate (cyclic PIP), from prostaglandin E and activated inositol polyphosphate in rat liver plasma membranes. *Acta Diabetol*, 33: 126-138.

Wasner, H.K., Salge, U., Psarakis, E., Niktopoulos, A., 1997, Insulin resistance, a result of reduced synthesis of prostaglandylinositol cyclic phosphate, a mediator of insulin action? Regulation of cyclic PIP synthetase activity by oral antidiabetic and antihypertensive drugs. *Acta Diabetol* 34: 257-264.

Wasner, H.K., Gebel, M., Hucken, S., Schaefer, M., Kincses, M., 2000, Two Different Mechanisms for Activation of CyclicPIP Synthase: by a G Protein or by Protein Tyrosine Phosphorylation. *Biol. Chem.*, Vol. 381, pp. 145-153.

Weber, S., Lemoine, H., Wasner, H.K., 2000, Prostaglandin deficiency promotes sensitization of adenylyl cyclase. *Biol-Chem.* 381: 525-529.

Wheeler, T.J. and Hinkle, P.C., 1985, The glucose transporter of mammalian cells, *Ann. Rev. Physiol.*, 47, 503-517.

White MF and Kahn CR, 1994, The insulin signalling system. *J Biol Chem* 269: 1-4.

Teilpublikationen:

H.K. Wasner, M. Leßmann, M. Conrad, H. Amini, E. Psarakis, A. Mir-Mohammad-Sadegh

Biosynthesis of the endogenous cyclic adenosine monophosphate (AMP) antagonist, prostaglandylinositol cyclic phosphate (cyclic PIP), from prostaglandin E and activated inositol polyphosphate in rat liver plasma membranes

Acta Diabetol (1996) 33: 126-138.

H.K. Wasner, U. Salge, E. Psarakis, A. Niktopoulos

Insulin resistance, a result of reduced synthesis of prostaglandylinositol cyclic phosphate, a mediator of insulin action? Regulation of cyclic PIP synthetase activity by oral antidiabetic and antihypertensive drugs

Acta Diabetol (1997) 34: 257-264.

Danksagung

Mein Dank gilt....

Prof. Dr. med. Dirk Müller-Wieland,

als Referenten für meine Arbeit

Prof. Dr. med. Horst Lemoine,

für die Übernahme des Korreferates sowie für die Durchführung der Versuche mit Adenylylzyklase in seinem Labor

Dr. rer. nat. Heinrich Wasner,

für die Überlassung des Themas, die geduldige, freundschaftliche und intensive Betreuung der Arbeit, für seine Hilfe bei der Auswertung und Durchsicht der Ergebnisse sowie für viele wissenschaftliche Diskussionen und Anregungen

Meinen Eltern,

die mir, durch Ihre weitreichende Unterstützung, ein Studium der Medizin in der BRD ermöglicht haben

Ifigenia Georgali,

für liebevolle Unterstützung und Motivation

Lebenslauf

Name: Psarakis Eftihios

Anschrift: Am Schönenkamp 1
40599 Düsseldorf

Geburtsdatum: 26. April 1965

Geburtsort: Polirinia (Griechenland)

Konfession: Griechisch-Orthodox

Familienstand: Ledig

Schulabschluß: Hochschulreife (Griechisches Lyzeum)

Studium: Erstimmatrikulation SS1985
Vorklin. Semester Uni Köln
Klin. Semester Uni Düsseldorf

Studiumabschluß: Prüfung zum dritten Staatsexamen
22. Dezember 1993

AIP: Vom 15.03.1995 bis zum 31.03.1996 in einer
Allgemeinmedizinischen - Praxis
Vom 01.04.1996 bis zum 14.09.1996 in der Abteilung
für Coloproktologie des St. Joseph Hospital Duisburg-
Laar

Assistenzarzt: Vom 15.09.1996 bis 28.02.1999 in der oben genannten
coloproktologischen Abteilung als Assistenzarzt.
Vom 01.03.1999 bis 31.12.2000 in der Abteilung
für Allgemein-Chirurgie des St. Josef Krankenhaus
Moers.
Vom 01.01.2001 bis 31.12.2001 in der Abteilung
Chirurgie des St. Marien-Hospital Düren.
Seit 01.01.2002 in der Abteilung Chirurgie
St. Martinus-Krankenhaus Düsseldorf.

Abstract

Charakterisierung der cPIP-Synthase in Leber Plasmamembranen sowie Messung der Aktivität in Tieren mit Diabetes und Hypertonie

Eftihios Psarakis

Seit Jahren zählt der cAMP-Antagonist cPIP (Prostaglandininositol-cyclophosphat) zu den möglichen second messengern des anabolen Hormons Insulin aber auch von Noradrenalin (α -Rezeptor-Wirkung). Für seine Biosynthese werden Prostaglandin E_1 neues Inositol-phosphat sowie das cPIP-Synthase genannte Enzym benötigt. Als möglicher Syntheseort wurde bislang die Plasmamembran angenommen, analog zur Lokalisation der Adenylzyklase in der Plasmamembran. Eines der Ziele dieser Arbeit war, die Synthese dieses Enzymes zu optimieren und zu charakterisieren. In den ausgeführten Versuchen mit aus Ratten gewonnener Leber-Plasmamembran wurde gefunden, daß die cPIP-Synthase ein partikuläres Enzym ist mit ausgeprägter Labilität. Diese Labilität wurde mit Protein Tyrosindephosphorylierung erklärt. Versuche mit Leitenzymen zeigten, daß die cPIP-Synthase nicht in den Mitochondrien vorkommt, wohl aber in der Mikrosomenfraktion. Dieser Befund steht im Einklang mit der von anderen Arbeitsgruppen gemachter Beobachtung, daß der Insulin-Rezeptor ebenfalls nicht ausschließlich in der Plasmamembran zu finden ist sondern auch in der leichten Mikrosomenfraktion.

Weiterhin wurde, die cPIP-Synthase Aktivität in Membranfraktionen diabetischer Mäuse und hypertensiver Ratten gemessen. Es wurden signifikant um bis zu 40% reduzierte Werte im Vergleich zu den entsprechenden Kontrolltieren gefunden. Es ist allgemein anerkannt, dass im Rahmen des metabolischen Syndroms Diabetiker eine Prävalenz für Hypertonie haben, ebenso wie Hypertoniker zu Diabetes neigen. Die in dieser Arbeit gezeigten Daten, einer verminderten cPIP-Synthase Aktivität in den vorgenannten kranken Tieren geben eine mögliche Erklärung zur Pathophysiologischen Entstehung dieser Erkrankungen.

19.02.2002

gegengezeichnet Prof. Dr. med. Müller-Wieland