

UNTERSUCHUNGEN ZUR REGULATION DER cPIP- SYNTHASE

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat.
der Fakultät für Naturwissenschaften
der Heinrich-Heine Universität
Düsseldorf

vorgelegt von
Sabine Hucken
aus Düsseldorf

Düsseldorf 2004

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

Referent (in): Prof. Reinauer

Korreferent(in): Prof. Wunderlich

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Mai 2004

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	10
2.1	Material	10
2.1.1	Chemikalien	10
2.1.2	Geräte und Verbrauchsmaterialien	12
2.2	Methoden	14
2.2.1	Versuchstiere	14
2.2.2	Isolierung der Plasmamembran aus der Rattenleber nach <i>Wasner</i> (1975)	14
2.2.3	Mikrosomenpräparation aus Rattenleber nach <i>DeDuve</i> (1942)	16
2.2.4	Plasmamembranherstellung aus Rattenleber nach <i>SJ Pilkis</i> (1974)	17
	Neues Leberpräparationsschema	18
2.2.6	Herstellung von n-IP („neues Inositol-Phosphat“) aus Rattenleber	19
2.2.7	cPIP-Test	20
2.2.8	Solubilisierung der Membran	22
2.2.9	Einbau und Nachweis von radioaktiv-markiertem ATP- ³² P in die Mikrosomenfraktion	22
2.2.10	PGE ₁ -Photoaffinitäts-Labeling mit der Mikrosomenfraktion	23
2.2.11	Gelfiltration	24
2.2.12	Proteinbestimmung	26
2.2.13	Ansetzen einer 10%igen Triton X-114 Stocklösung	26
2.2.14	Anionenaustauscherchromatographie	27
2.2.15	Silberfärbung nach Heukeshoven und Dernick	28
2.2.16	Silbergel entfärben	28
2.2.17	Coomassie-Färbung	29
2.2.18	Fiske-Subbarow-Phosphatbestimmung	30
2.2.19	Glucose-6-Phosphatase-Bestimmung (mikrosomaler Marker)	30
2.2.20	5'-Nukleotidase-Bestimmung (Membran-Marker)	31
2.2.21	GST-pull-down Assay	32
2.2.22	Bestimmung der Insulin-Rezeptoren	33
2.2.23	Skelettmuskelaufschluß	34
2.2.24	Western Blotting	36
2.2.25	Identifizierung der Proteinbanden aus dem SDS-Page Gel durch MALDI-MS	43
2.2.26	Keratinozyten	44

3.	Ergebnisse	45
3.1	Nachweis der cPIP- Synthase in verschiedenen Spezies	45
3.1.1	Nachweis der cPIP- Synthase in Zellen humanen Ursprungs	45
3.1.1.1	cPIP- Synthase in der Leber	45
3.1.1.2	cPIP- Synthase Aktivität in Zellen	47
3.1.2	Nachweis der cPIP- Synthase in Schweineleber	49
3.1.3	cPIP- Synthase Nachweis in Rinder- und Schweineblasenepithelzellen	50
3.1.4	Nachweis der cPIP- Synthase im Homogenat der Rattenleber	52
3.1.5	Zusammenfassung der Messergebnisse	52
3.2	cPIP- Synthase Nachweis in verschiedenen Organen der Ratte	54
3.2.1	cPIP- Synthase in der Leber	54
3.2.2	cPIP- Synthase im Muskel	55
3.2.3	cPIP- Synthase in Herz-Zellen	56
3.3	Subzelluläre Lokalisation der cPIP- Synthase / cPIP- Synthase Vorkommen in unterschiedlichen Kompartimenten der Leberzellen	58
3.3.1	Verteilung der cPIP- Synthase in verschiedenen Fraktionen	58
3.3.2	cPIP- Synthase und die Leitenzymverteilung in Plasmamembran- und Mikrosomenfraktion	60
3.3.3	cPIP- Synthase Elutionsprofil in Plasmamembran- und Mikrosomenfraktion	62
3.4	Untersuchungen zur Aktivierung der cPIP- Synthase durch ATP	64
3.4.1	Einfluss von ATP auf die cPIP- Synthase Aktivität	64
3.4.2	³² P-Phosphorylierung der cPIP- Synthase-haltigen Fraktionen	67
3.4.3	³³ P- Phosphorylierung der cPIP- Synthase-haltigen Fraktionen	70
3.5	Antikörperbindung (Anti-IRS-1, Anti-IRS-2) an die cPIP- Synthase- haltigen Fraktionen	71
3.6	Interaktionen der cPIP- Synthase mit IRS-Fusionsproteinen	72
3.7	Labeln der cPIP- Synthase mit PGE (trägt Photoaffinitätslabel)	75
3.8	Labeln der cPIP- Synthase mit PGF (trägt Photoaffinitätslabel)	76
3.9	Identifizierung der Proteinbanden aus cPIP- Synthase-haltiger Fraktion mittels Maldi-MS	78
4	Diskussion	84
4.1	Nachweis der cPIP- Synthase in verschiedenen Spezies	84
4.2	cPIP- Synthase Verteilung in den verschiedenen Organen der Ratte und subzelluläre cPIP- Synthase Verteilung in den Leberzellen	85
4.3	Die Aktivierung der cPIP- Synthase durch ATP	86
4.4	Charakterisierung der cPIP- Synthase-haltigen Fraktion mittels Maldi-MS	88
5	Zusammenfassung	90

Verzeichnis der Abkürzungen

AMP	Adenosinmonophosphat
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
Bq	Bequarel
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Rinderserum-Albumin
°C	Grad Celsius
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cpm	counts per minute
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GLUT4	Glukosetransporter 4
<i>g</i>	Erdbeschleunigung, 9,81 m/s
GAP	growth factor associated protein
GMP-PNP	Guanylimidodiphosphat
HCl	Salzsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
IRS-1	Insulinrezeptorsubstrat 1
IRS-2	Insulinrezeptorsubstrat 2
kDa	Kilo-Dalton
M	Mol
MALDI-MS	Matrix-unterstützte Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie
mCi	Milli-Curie
min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimol
NaCl	Kochsalz
n-IP	aktiviertes Inositolphosphat
p.a.	pro analysi
PGE	Prostaglandin E
PGF	Prostaglandin F
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase

PLA	Phospholipase A
PLC	Phospholipase C
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
TBS	Tris-NaCl-Puffer
TBS-T	Tris-NaCl-Puffer -Tween 20
TCA	Trichlorsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tyr	Tyrosin
UZ	Ultazentrifuge
% w/v	Gewichtsprozent
μL	Mikroliter

1. Einleitung

Seit der Entdeckung Anfang 1920, dass Insulinmangel den Diabetes verursacht (Best und Banting 1922), wird an diesem Hormon-Wirkungs-Mechanismus bis heute geforscht und der genaue Wirkungsmechanismus des Insulins ist in allen Stufen bis heute nicht geklärt.

Die Isolierung des Insulins als Reinsubstanz aus Bauchspeicheldrüsenextrakt gelang erstmals 1927 (Abel, 1927). Mittlerweile ist bekannt, dass Insulin als Proinsulin in den endokrinen β -Zellen der Langerhansschen Inseln im Pankreas gebildet wird (Wolheim & Sharp 1981, Zawalich & Rasmussen 1990).

Steigt der Blutglukosewert über 7,5 mmol/L, sezernieren die β -Zellen Insulin, welches dann an die plasmamembranständigen Insulinrezeptoren der Zielzellen bindet.

Diese Interaktion führt zu einem erleichterten Transport der Glukose aus dem Plasma in die Zellen. So stimuliert Insulin in Leberzellen die Energiespeicherung durch Synthese von Glykogen und Fett, in Muskelzellen wird die aufgenommene Glukose sofort abgebaut oder als Glykogen gespeichert und in den Fettzellen ist eine erhöhte Glukoseaufnahme und Lipogenese zu beobachten. Dieser insulin-induzierte Glukosetransport in das Fettgewebe beruht auf der Translokation der Glukosetransporter, z. B. GLUT4 (Czech et al. 1999, Pessin et al. 1999), von den low-density intrazellulären Mikrosomen zur Plasmamembran (Wardzala et al. 1978, Cushman et al. 1980, Karnieli et al. 1981).

Weitere physiologische Wirkungen des Insulins umfassen die Induktion des Zellwachstums (Straus 1984) und der Zellproliferation (Saltiel et al. 1994), die Translokation von Membranproteinen (James et al. 1994), die Stimulierung der Aufnahme von Hexosen, Ionen und Aminosäuren (Wheeler & Hinkle 1985), die Phosphorylierung und Dephosphorylierung vieler metabolischer Schlüsselenzyme

(Lawrence, Jr. 1992, Hubbard & Cohen 1993), die Genexpression (Smith & Jarett 1988) und die Regulation der Proteinexpression auf translationaler und transkriptionaler Ebene (O'Brian & Granner 1991).

Der Insulin-Rezeptor gehört zur Familie der Rezeptortyrosinkinasen (Kasuga et al. 1983, Saltiel & Kahn 2002). Er ist ein tetrameres Protein, das sich aus zwei alpha- und zwei beta- Untereinheiten zusammensetzt, welche als allosterische Enzyme agieren. Die α - Untereinheiten hemmen die Tyrosinkinaseaktivität der β - Untereinheiten. Bindet Insulin an die extrazellulären α - Untereinheiten, so wird die Hemmung der Tyrosinkinaseaktivitäten der β - Untereinheiten aufgehoben, und es findet eine Transphosphorylierung und Konformationsänderung der β - Untereinheiten statt, was zu einer weiteren Steigerung der Kinaseaktivität führt. Hierbei werden mindestens 6 der 13 cytoplasmatischen Tyrosine autophosphoryliert: Tyr⁹⁶⁰ in der Juxtamembranregion, Tyr¹¹⁴⁶, Tyr¹¹⁵⁰ und Tyr¹¹⁵¹ in der katalytischen Domäne und Tyr¹³¹⁶ und Tyr¹³²² im C-terminalen Ende (Tornqvist et al. 1987, Tavaré & Denton 1988, White et al. 1988, Feener et al. 1993, Kohanski 1993).

Die gesteigerte Tyrosinkinaseaktivität des Insulinrezeptors bewirkt Tyrosinphosphorylierungen von zahlreichen anderen intrazellulären Substraten wie dem IRS-1 (Sun et al. 1991, Rothenberg et al. 1991), dem IRS-2 (White 1997, Ogawa et al. 1998), dem p62^{dok}, ein GAP-assoziiertes Protein (Wick et al. 2001), Shc (Harada et al. 1996), Nck (Myers et al. 1994) oder der Phosphatidylinositol 3-Kinase (Cheatman et al. 1994, Okada et al. 1994).

Phosphorylierungen der Serin- und Threoninreste des Insulinrezeptors (Lewis et al. 1990, Ahn et al. 1993, Liu & Roth 1994) können die Signaltransduktionskaskade des Insulins beeinflussen, indem durch eine gesteigerte Serin- und

Threoninphosphorylierungsrate am Insulinrezeptor die Tyrosinphosphorylierungsrate der Zielproteine (z. B. IRS-1, Shc, PI3K) gesenkt wird (White & Kahn 1989). Dies führt im Falle des IRS-1 zu einer verminderten Translokation des GLUT4-Transporters zur Plasmamembran gegenüber der IRS-1-stimulierten GLUT4-Translokation (Quon et al. 1994).

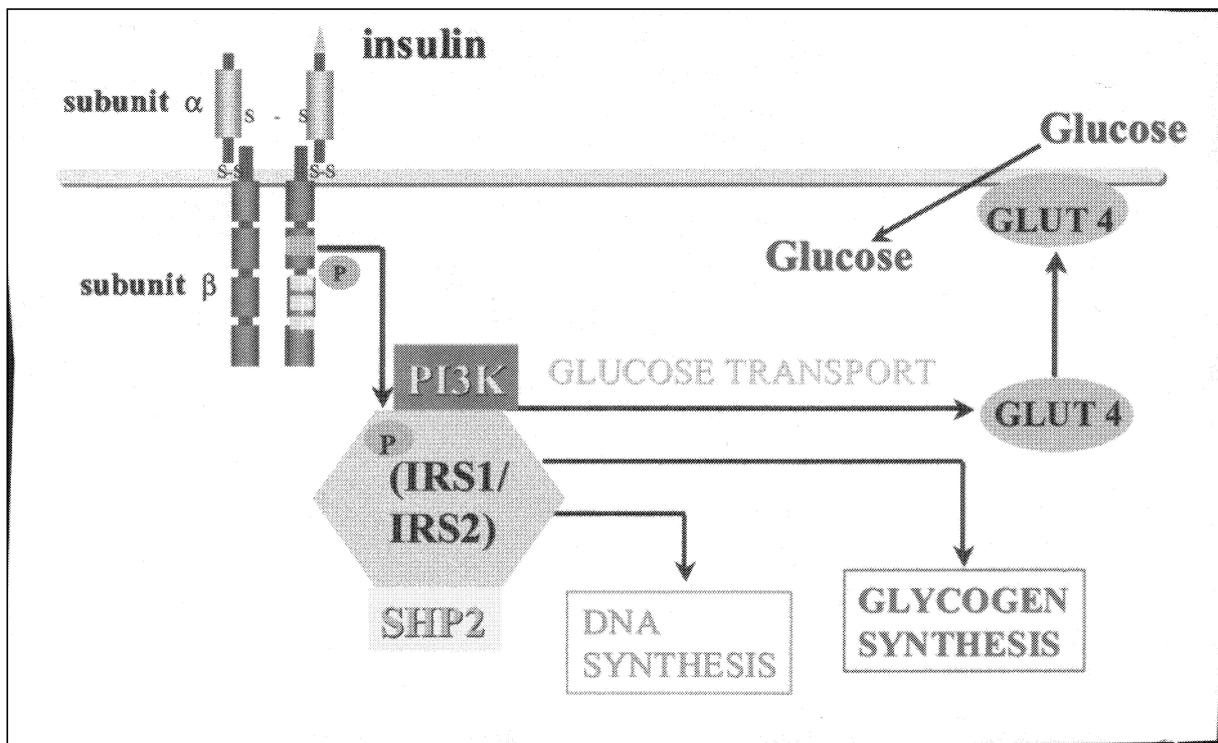


Abb. 1: Frühe Aktionen nach Insulinstimulierung (nach Campbell et al. 2002)

Nachdem Insulin an die α-Untereinheit des Insulinrezeptors gebunden hat, wird die β-Untereinheit autophosphoryliert. Es folgen weitere Phosphorylierungen von Folgeproteinen, z. B. der Insulinrezeptorsubstrate -1 und -2, die PI3K und SHP2 werden aktiviert. Das wiederum führt dazu, dass GLUT4 Transporter an die äußere Zellmembran wandern und Glukose in die Zelle gelangt, außerdem führt es zu einer gesteigerten DNA-Synthese sowie einer erhöhten Glykogensynthese.

Als ein weiterer Baustein der Signaltransduktionskaskade wurde ein Mediator- oder Second Messenger des Insulins gefunden.

Für diese Hypothese sprechen folgende Befunde; zum einen wurden von mehreren Arbeitsgruppen nach der Autophosphorylierung des Insulinrezeptors eine Erhöhung verschiedener Intermediärprodukte gefunden, z. B. konnte in Rattenadipozyten durch

Insulingabe ein erhöhter Inositol- 1,4,5- trisphosphat- Spiegel gemessen werden (Egan et al. 1990a, Egan et al. 1990b). Dieser Effekt war in Muskel- und Leberzellen nicht reproduzierbar (Farese et al. 1985a, Farese et al. 1985b). Auch wurde ein hitze- und säureresistentes Zinkpeptid aus Skelettmuskelzellen isoliert, welches die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) hemmt (Larner 1975). Außer dem Inositol- 1,4,5- trisphosphat (Egan et al. 1990a, Egan et al. 1990b) wird vor allem Inositolphosphatglykan als intracellulärer Mediator der Insulinwirkung diskutiert (Kelly et al. 1986, Mato et al. 1987, Alemany et al. 1987, Saltiel et al. 1988, Saltiel 1990, Larner et al. 1988).

Das zuerst von Saltiel vorgeschlagene Phosphatidylinositol- glykan setzt sich aus Inositol, Phosphat, Glukosamin, Galaktosamin und mehreren anderen Monosacchariden zusammen. Einige Arbeitsgruppen konnten jedoch in ihrem isolierten Inositolphosphatglykan kein Glukosamin oder Galaktosamin nachweisen (Denton et al. 1989, Thakker et al. 1999) und zweifeln daher die von Saltiel beschriebene Zusammensetzung des Glykans an. Außerdem wurde eine spezifische Phospholipase C (PI- PLC) gefunden, welche die Vorstufe des Inositolglykans in Inositolphosphatglykan und Diacylglycerin spaltet (Saltiel et al. 1988, Low & Saltiel 1988). Für dieses P-Inositolglykan konnten einige Effekte des Insulins in der Leberplasmamembran nachgewiesen werden, so zum Beispiel eine veränderte Aktivierbarkeit der Pyruvat- Dehydrogenase, der Adenylatzyklase, der cAMP- Phosphodiesterase und der cAMP- abhängigen Proteinkinase, es inhibiert die Lipolyse und stimuliert die Proteinphosphorylierung sowie die Glukose- und Pyruvatoxidation (Kelly et al. 1987, Saltiel 1987, Alemany et al. 1987, Saltiel & Sorbara-Cazan, 1987, Gottschalk & Jarrett 1988, Saltiel 1990).

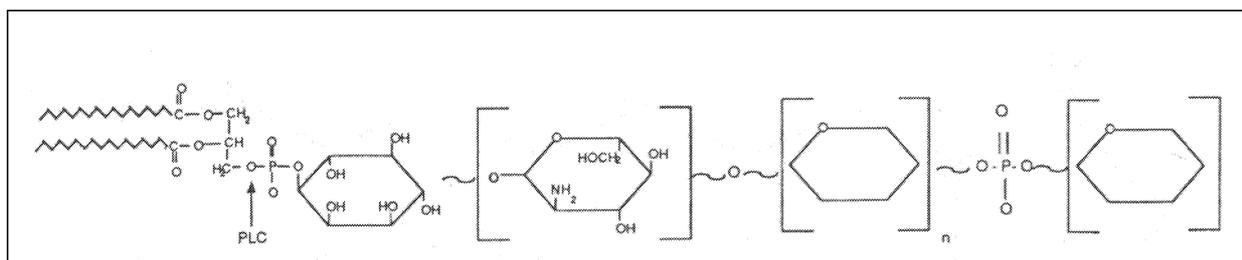


Abb.2: Von Saltiel vorgeschlagene hypothetische eines Phosphatidylinositolglykans

Inositolphosphatglykan entsteht aus der oben abgebildeten Vorstufe, dem Phosphatidylinositolglykan. Durch eine spezifische Phospholipase C wird diese Vorstufe in Inositolphosphatglykan und Diacylglycerin gespalten. Inositolphosphatglykan besteht aus Inositol, Phosphat, Glukosamin, Galaktose und anderen Monosacchariden.

1975 berichtete Wasner zum ersten Mal über einen cyclo-AMP-Antagonisten aus der Rattenleber, dessen Synthese durch Hormone wie Noradrenalin (Stimulierung über alpha- Rezeptoren) um ein Vielfaches anstieg (Wasner 1976). Diese Substanz ist in allen Geweben und Organen der Ratte nachweisbar (Wasner et al. 1993), außerdem in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (Wasner & Salge 1987), dem Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* (Kaiser et al. 1998).

Diese Substanz wurde zunächst als cAMP- Antagonist beschrieben aufgrund ihrer regulatorischen Wirkung, der 100% -igen Hemmung der Proteinkinase A und der sechsfachen Aktivierung der Phosphoproteinphosphatasen (Wasner 1975, Wasner 1981, Wasner et al. 1993). Dieser cAMP- Antagonist setzt sich aus Prostaglandin E, myo- Inositol und einem, durch einen zyklischen Diester an das Inositol gebundenem Phosphat zusammen (Wasner 1985, Wasner & Salge 1987, Wasner et al. 1991), wobei das Inositolphosphat über seine C4- Hydroxylgruppe an die C15- Hydroxylgruppe des Prostaglandin E gebunden ist (Wasner et al. 1992, 1993,1996). Die Substanz wurde von Wasner zyklisches Prostaglandylinositolphosphat, kurz cPIP, genannt (Abb.3). Zyklisches Prostaglandylinositolphosphat wurde als Second

Messenger im Insulinstoffwechsel auf intrazellulärer Ebene vorgeschlagen (Wasner et al. 1991). cPIP wird durch Phosphodiesterasen gespalten und durch Phosphatasen dephosphoryliert und damit inaktiviert (Wasner et al. 1992).

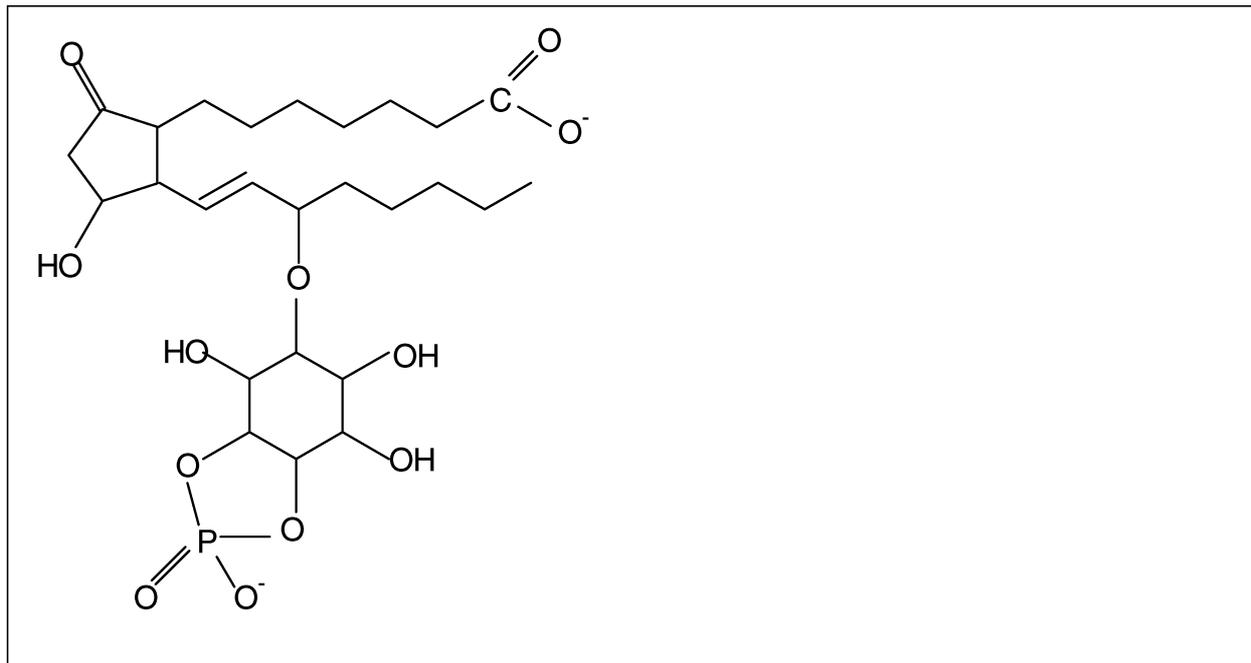


Abb.3: Von Wasner vorgeschlagene chemische Struktur von zyklischem Prostaglandylinositolphosphat

Dargestellt ist der endogene cAMP- Antagonist, das zyklische Prostaglandylinositolphosphat. Es setzt sich aus Prostaglandin E, myo- Inositol und Phosphat zusammen. Das Inositolphosphat bindet an die C15- Hydroxylgruppe des Prostaglandin E₁.

Das zyklische Prostaglandylinositolphosphat wird von einem membranständigen Enzym (cPIP-Synthase) aus Prostaglandin E₁ und aktiviertem Inositolphosphat, dem Guanosindiphosphoinositolphosphat, synthetisiert (Leßmann, 1996; Gypakis, 2000; Kincses, 2002). Aus Analogiegründen zur Synthase des cAMP durch die Adenylatzyklase in der Plasmamembran wurde die zyklische Prostaglandylinositolphosphat- Synthase ebenfalls in der Plasmamembran gesucht (Wasner et al. 1996).

Der Einfluß oraler antidiabetischer und antihypertensiver Pharmaka auf die Regulation der zyklischen Prostaglandylinositolphosphat- Synthase wurde untersucht. Dabei fand man heraus, dass Biguanide und antihypertensive Pharmaka wie Captopril, Guanethidin und Dihydralazin die cPIP- Synthase aktivieren (Wasner et al. 1997). Bisherige Untersuchungen der cPIP- Synthase zeigten, dass das pH-Optimum für dieses Enzym bei pH 7.5 bis pH 8 liegt (Wasner et al. 1996). Als Substrat für die Synthese von zyklischem Prostaglandylinositolphosphat zeigt Prostaglandin E₁ die höchste Umsatzrate im Vergleich zu Prostaglandin A oder Prostaglandin F. In Gegenwart von GMP-PNP konnte eine zweifache Steigerung der cPIP- Synthase- Aktivität gemessen werden, was für eine Aktivierung über G-Proteine spricht.

Phospholipase A₂ und Phospholipase C werden durch α - adrenerge Stimulation über G-Proteine aktiviert. Phospholipase A₂ setzt ungesättigte Fettsäuren frei, welche dann weiter zu Prostaglandinen umgesetzt werden und Phospholipase C setzt Inositolphosphate frei. Einige von diesen Prostaglandinen werden mit energiereichen Inositolphosphaten zu zyklischem Prostaglandylinositolphosphat umgesetzt. Die zyklische Prostaglandylinositolphosphat- Synthase (cPIP- Synthase) setzt die beiden Substrate, Prostaglandin E₁ und das energiereiche Inositolphosphat zu zyklischem Prostaglandylinositolphosphat um. Ein vergleichbarer Mechanismus wird durch die Stimulierung mit Insulin angenommen (Abb.4).

Es wurde folgendes Modell der hormon- stimulierten Synthese von cPIP von Wasner vorgeschlagen:

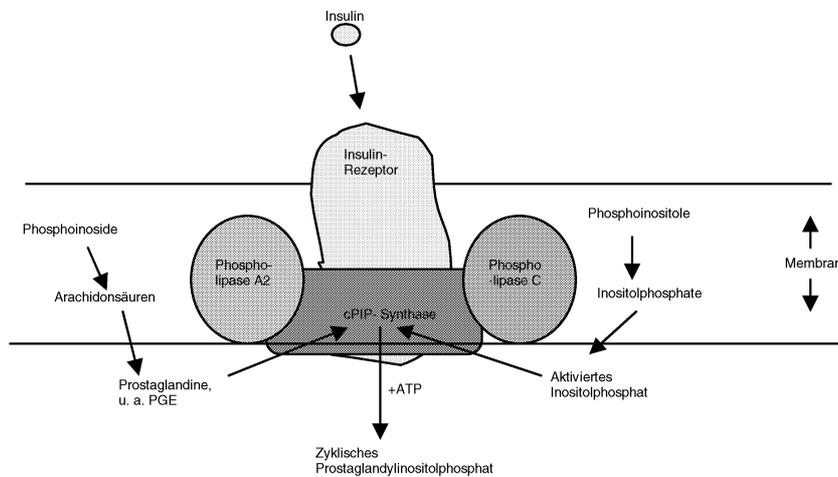


Abb.4: Modell zur hormon-stimulierten Synthese von zyklischen Prostaglandylinositolphosphat nach Wasner

Diese Darstellung zeigt einen möglichen cPIP- Biosynthese- Weg. Durch Hormonstimulierung der Phospholipase A2 werden aus Phosphoinosiden Arachidonsäuren und Eikosatriensäuren gebildet, die weiter zu Prostaglandin E₁ und E₂ umgesetzt werden. Ebenso wird durch hormonelle Stimulierung die Phospholipase C aktiv und bildet unter anderem ein energiereiches Inositolphosphat. Aus diesen beiden Produkten synthetisiert die cPIP- Synthase das zyklische Prostaglandylinositolphosphat.

Zwischen den Insulinrezeptorsubstraten, besonders dem IRS-1 und der cPIP- Synthase gibt es mehrere Gemeinsamkeiten, beide werden an Tyrosinen phosphoryliert, sind räumlich eng miteinander gekoppelt und spielen eine wichtige Rolle in der hormonellen Signaltransduktion. Wie die Beziehung zwischen dem Insulinrezeptor- Substrat 1 und der cPIP- Synthase genau zu definieren ist, lässt sich zur Zeit nicht eindeutig feststellen.

Die vorliegende Dissertation untersucht folgende Aspekte:

- Wie verhält sich die subzelluläre Verteilung der cPIP- Synthase im Vergleich zu den Insulinrezeptorsubstraten, z. B. IRS-1? Und inwieweit können IRS- Fusionsproteine mit der cPIP-Synthase konkurrieren?

- Welchen Effekt hat das Adenosintriphosphat bei dem membranständigen und beidem solubilisierten Enzym der cPIP- Synthese? Wird das Enzym phosphoryliert?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

6-Aminohexansäure (p.a.)	(Sigma, Deisenhofen)
Aceton (p.a.)	(Merck, Darmstadt)
Acetonitril (p.a.)	(Merck, Darmstadt)
Adenosinmonophosphat (p.a.)	(Merck, Darmstadt)
Adenosintriphosphat (p.a.)	(Sigma, Taufkirchen)
Ammoniumheptamolybdat (p.a.)	(Merck, Darmstadt)
Ammoniumhydrogencarbonat (p.a.)	(Merck, Darmstadt)
Ammoniumhydroxid (p.a.)	(Merck, Darmstadt)
Ammoniumsulfat (p.a.)	(Merck, Darmstadt)
anti-IRS-1 (α -IRS-1/K6B)	(Uni Leiden, NL)
Ascorbinsäure 25%	(Roth, Karlsruhe)
BCA-Protein-Assay-Reagenz	(Pierce, Rockford, USA)
Bio-Rad Protein Assay	(Bio-Rad, München)
BSA Fraktion V	(Sigma, Deisenhofen)
Chloroform (p.a.)	(Roth, Karlsruhe)
Coomassie G-250	(Serva, Heidelberg)
Complete Protease-Inhibitor-Tabletten	(Roche, Mannheim)
Diazomalonylchlorid (p.a.)	(Amersham, Braunschweig)
di-Kaliumhydrogenphosphat*3H ₂ O (p.a.)	(Merck, Darmstadt)
EDTA (p.a.)	(Sigma, Deisenhofen)
Essigsäure (96%)	(Merck, Darmstadt)
Essigsäureethylester	(Roth, Karlsruhe)
Ethanol 100%	(Roth, Karlsruhe)
Formaldehyd (p.a.)	(Roth, Karlsruhe)
Glycerin (p.a.)	(Merck, Darmstadt)
Glycin	(Merck, Darmstadt)
Glukose-6-phosphat (p.a.)	(Merck, Darmstadt)

Glutaraldehyd 25% (p.a.)	(Serva, Heidelberg)
GST	(Pharmacia, Uppsala, S)
Hepes (p.a.)	(Serva, Heidelberg)
³ H-PGE ₁ (p.a.)	(Amersham, Braunschweig)
¹²⁵ I-Insulin (p.a.)	(Amersham, Braunschweig)
Kaliumchlorid (p.a.)	(Merck, Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat (p.a.)	(Merck, Darmstadt)
Kaliumfluorid (p.a.)	(Merck, Darmstadt)
Kalziumchlorid (p.a.)	(Merck, Darmstadt)
Kieselsäure (p.a.)	(Sigma, Steinheim)
Kupfersulfat*5H ₂ O (p.a.)	(Merck, Darmstadt)
Magermilchpulver	(Applichem, Darmstadt)
Magnesiumchlorid (p.a.)	(Merck, Darmstadt)
Methanol 100% (p.a.)	(Roth, Karlsruhe)
2-Mercaptoethanol (p.a.)	(Merck, Darmstadt)
Natriumacetat (p.a.)	(Merck, Darmstadt)
Natriumchlorid (p.a.)	(Merck, Darmstadt)
Natriumfluorid (p.a.)	(Merck, Darmstadt)
Natriumhydrogencarbonat (p.a.)	(Merck, Darmstadt)
Natriumhydroxid (p.a.)	(Merck, Darmstadt)
Natriumorthovanadat (p.a.)	(Merck, Darmstadt)
Natriumpyrophosphat (p.a.)	(Merck, Darmstadt)
Na ₂ S ₂ O ₃ *5 H ₂ O (p.a.)	(Merck, Darmstadt)
Na ₂ SO ₃ (p.a.)	(Merck, Darmstadt)
Noradrenalin (p.a.)	(Sigma, Deisenhofen)
Pentorbital-Natrium (Nembutal®)	(Sanofi, Düsseldorf)
PGE ₁ (p.a.)	(Amersham, Braunschw.)
Phosphorsäure 85% (p.a.)	(Merck, Darmstadt)
Polyethylenglykol 100% (p.a.)	(Roth, Karlsruhe)
Ponceau S	(Sigma, Deisenhofen)
Protease-Inhibitor-Tablette	(Boehringer, Mannheim)
Proteinmarker Prestained	(Promega)
Proteinmarker Broad Range	(Promega)
Quabain (p.a.)	(Boehringer, Mannheim)

Rotiszint 11	(Roth, Karlsruhe)
Rotiszint 22	(Roth, Karlsruhe)
Restore™ Western Blot Stripping Buffer	(Pierce, Rockfort, USA)
Saccharose (p.a.)	(Merck, Darmstadt)
Salzsäure (37%) (p.a.)	(Merck, Darmstadt)
Schwefelsäure (25%) (p.a.)	(Merck, Darmstadt)
SDS (p.a.)	(Roth, Karlsruhe)
Sephacryl S-300 HR	(Pharmacia, Uppsala, S)
Sephadex G 15	(Pharmacia, Uppsala, S)
Silbernitrat (p.a.)	(Merck, Darmstadt)
Stickstoff, flüssig	(Linde, Düsseldorf)
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	(Pierce, Rockfort, USA)
TFA (p.a.)	(Merck, Darmstadt)
Trichlorsäure (p.a.)	(Merck, Darmstadt)
Trishydroxymethylaminomethan (p.a.)	(ICN, Aurora, USA)
Triton X-114	(Boehringer, Mannheim)
Toluol	(Roth, Karlsruhe)
Tween 20	(Biorad)
Wasser, bidest.	(Millipore)

2.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

β-Counter LS-6000-IC	(Beckman, München)
Blotting-Apparatur Pharmacia LKB Novablot	(Amersham-Pharmacia)
Chromatographie-Säulen	(Pharmacia, Freiburg)
Durchflußphotometer 2238 Uvicord	(Pharmacia, Freiburg)
Elektrophoresekammer EPS 600	(Pharmacia, Freiburg)
Fraktionssammler 2070 Ultrorac II und 2112 Redirac	(Pharmacia, Freiburg)
Gaze	
Gefriertrocknungsanlage WKF-L05	(Ges.elekt.Gerätebau, Brandau)
Glashomogenisator	(Braun, Melsungen)
Glassäulen	(Beyer, Düsseldorf)
Gradienten-Fertiggel 8-18%	(Promega)

Immobilon-P-Membran	(Amersham-Pharmacia)
Lumi-Imager™	(Boehringer, Mannheim)
Magnetrührer	(Gerhardt, Bonn)
Maldi-MS	
Munktell 1F-Filterpapiere	(Amersham-Pharmacia)
PH-Meter 82 Standard Kopenhagen)	(Radiometer,
Phospho-Imager Fujix BAS 1000	(Fuji, Japan)
Photometer	(Zeiss, Jena)
Photoplatte	(Fuji, Japan)
Pipetten	(Eppendorf, Hamburg)
Pumpen	(Miniplus 2, Gilson- Abimed)
Röntgenfilme	(Kodak)
Rotationsverdampfer Rotavapor R110	(Büchi, Flawil, Schweiz)
Sample Application pieces	(Amersham-Pharmacia)
Schüttler SM	(Bühler, Tübingen)
Sorvallzentrifuge mit Rotor GSA mit Rotor SS34	(Du Pont, Bad Nauheim)
Spectrometer DU®7400	(Beckman, München)
Teflongefäße	
Tischzentrifuge	(Eppendorf, Hamburg)
Ultrazentrifuge L70 mit Rotor Ti 70 mit Rotor SW28 Ti	(Beckman, München)
Verbandmull	(Hartmann, Heidenheim)
Waagen	(Sartorius)
Wasserbad Ter 2	(Ika Labortechn.,Staufen)
Wasserbad	(Haake, Karlsruhe)
Wasserbad Thermomix®U	(Braun, Melsungen)
96 Well-Platte	
Zählfläschchen	(Zinsser Analytic, Frankfurt)
Zentrifuge ROTIXA/K	(Hettich, Tuttingen)

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchstiere

Für die Plasmamembran-, Mikrosomenmembran- und n-IP-Herstellung wurden männliche und weibliche Sprague-Dawley-Ratten verwendet (Zucht im Deutschen Diabetes-Forschungsinstitut, Düsseldorf). Die Tiere waren ca. 3 Monate alt, wogen 200-300 g und hatten freien Zugang zu Trinkwasser und Standardfutter (Ssniff). Vor Entnahme der Leber wurde den Tieren 0,5-1,0 mL Nembutal® (entspricht 80-160 mg Pentobarbital-Natrium) intraperitoneal injiziert. Nach Eintritt der Narkose wurde der Bauchraum geöffnet und die Leber entsprechend der weiteren Versuchsvorschrift behandelt.

2.2.2 Isolierung der Plasmamembran aus der Rattenleber nach Wasner (1976)

Zwei männlichen Sprague- Dawley- Ratten wird jeweils 1 mL Nembutal (Überdosis Narkosemittel) intraperitoneal injiziert. Man wartet bis die Ratten narkotisiert sind und öffnet anschließend den Bauchraum. Sofort durchtrennt man die großen Blutgefäße, entnimmt schnell die Leber und gibt sie in ein eisgekühltes Becherglas. Von hier an wird nur noch im Eisbad gearbeitet und verwendete Geräte und Lösungen werden bei 4 °C vortemperiert.

Puffer I (1 L):

20 mL 20 mM Tris/HBr- Puffer, pH 7.3

140 µL 1 mM 2- Mercaptoethanol

10 mL 1 mM EDTA- Lösung

Im Anschluß werden die zwei Lebern mit Puffer I versetzt (Verh.: 1:2) und homogenisiert. Das Homogenisat wird zuerst durch vierlagigen, dann durch sechszehnlagigen Mull filtriert.

Das so gereinigte Filtrat wird auf sechs weite Zentrifugengläser mit 16 mL Saccharoselösung (48%) geschichtet und anschließend in einer *Beckman Optima™ L Serie, Preparative Ultrazentrifuge* mit einem *Beckman SW 28 Ti-Rotor* bei 4 °C und 27000 rpm für 90 min zentrifugiert.

Saccharoselösung (100 mL): 48 g Saccharose

1 mL 10 mM Tris/ HBr- Puffer, pH 7,5

14 µL 1 mM 2- Mercaptoethanol

1 mL 1 mM EDTA- Lösung

Anschließend werden die plasmamembranhaltigen Phasen (Anhang 1) abpipettiert und in einen GSA- Becher überführt. Die Phase wird mit der siebenfachen Menge Puffer I gemischt und erneut für 10 min bei 7000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wird in 3 mL Puffer I resuspendiert und in 1 mL Adiquots in Eppendorfgefäßen in Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert (Fraktion A). Der Überstand wird in einen neuen GSA-Becher überführt und bei 7000 rpm bei 4 °C für 30 min zentrifugiert. Das so entstandene Pellet wird in ca. 3 mL Puffer I resuspendiert und in 1 mL Adiquots in Eppendorfgefäßen in Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert (helle Fraktion B und dunkle Fraktion C).

Der verbleibende Überstand wird in einen neuen GSA-Becher überführt und bei 9000 rpm bei 4 °C für 60 min zentrifugiert. Das so entstandene Pellet wird in ca. 3 mL Puffer I resuspendiert und in 1 mL Adiquots in Eppendorfgefäßen in

Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert (Fraktion E). Die Plasmamembran ist in höchster Konzentration in Fraktion E zu finden.

2.2.3 Mikrosomenpräparation aus Rattenleber nach *DeDuve* (1964)

Zwei männlichen Sprague- Dawley- Ratten wird jeweils 1 mL Nembutal intraperitoneal injiziert. Den narkotisierten Ratten wird der Bauchraum geöffnet und in die Portalvene injiziert man isotonische Natriumchloridlösung (0,85% w/v NaCl), um das Blut aus der Leber herauszuspülen. Die Leber wird entnommen, gewogen und mit einer eiskalten 0,25 M Saccharose in Tris-HCl (pH 7.4) wird ein 10%iges Homogenat (w/v) hergestellt. Alle folgenden Arbeitsschritte erfolgen bei 4°C . Das Homogenat wird in einer Sorvallzentrifuge mit einem SS34-Rotor bei 12.000g für 10 min zentrifugiert, der Überstand gesammelt und das Pellet verworfen. Dem Überstand wird soviel 0,08 M CaCl_2 -Lösung (0,08 M CaCl_2 in 0,25 M Saccharose und 10 mM Tris-HCl; pH 7.4) zugesetzt, bis eine Endkonzentration von 8 mM CaCl_2 erreicht ist. Der verdünnte Überstand wird erneut in der Sorvallzentrifuge mit einem SS34-Rotor bei 25.000g für 15 min zentrifugiert; der Überstand wird verworfen, das Pellet mit 30 mL KCl-Lösung (150 mM KCl in 10 mM Tris-HCl; pH 7.4) resuspendiert, erneut zentrifugiert (25.000g für 15 min) und das nun gewaschene Pellet wird nochmals in KCl-Lösung aufgenommen und bei -80°C eingefroren gelagert.

2.2.4 Plasmamembranherstellung aus Rattenleber nach *SJ Pilkis* (1974)

Alle Arbeitsschritte erfolgen bei 4°C.

2 Lebern werden im zweifachen Volumen Puffer II (1mM NaHCO₃; 1mM Na-Vanadat; 1mM 2-Mercaptoethanol) homogenisiert. Das Homogenat wird auf ein Volumen von 200 mL mit Puffer II verdünnt und dreimal durch Gaze filtriert. Anschließend wird das Homogenat in der Sorvallzentrifuge mit GSA-Rotor bei 3500 rpm (ca. 3000g) für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Das Pellet-Volumen wird bestimmt, in etwas Puffer II aufgenommen, resuspendiert und mit einer 70,74%iger Saccharoselösung versetzt (Verhältnis 24,6 mL Pellet: 130 mL Saccharoselösung) und gut gemischt. Jeweils 15-16 mL dieser Suspension werden in Zentrifugenröhrchen (Beckman Ultra-Clear Centrifuge Tubes) vorgelegt.

8 mL einer 48%igen Saccharoselösung werden darüber geschichtet, sowie 4 mL einer 42%igen Saccharoselösung. Es wird für 60 Minuten bei 66.000g (ca. 28.000 rpm, UZ, Ti 28-Rotor) zentrifugiert. Die PM befindet sich zwischen den oberen beiden Schichten (48/42), die Mitochondrien zwischen der 48/70-Schicht, das Pellet besteht aus Zellkernen und Glycogen. Die Plasmamembran wird mit einer Pipette entnommen, ca. 2 mL / Zentrifugenröhrchen. Die Membranfraktionen werden gesammelt und in dem vierfachen Volumen Puffer II aufgenommen. Das Gemisch wird bei 12000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wird nochmals mit 40 mL Puffer II gewaschen und anschließend in 8 mL Puffer II aufgenommen und in 1 mL Portionen bei -80°C gelagert.

2.2.4 Neues Leberpräparationsschema (modifiziert)

Die Rattenleber wird entnommen und mit Puffer III (0,25 mM Saccharose; 20 mM Tris/HCl pH 7.2; 50 mM Na-Fluorid; 3 mM Na-Vanadat; 1 mM Magnesiumchlorid; 2 mM β -ME; 1 mM EDTA) homogenisiert und anschließend durch Gaze filtriert. Das Filtrat wird 10 min im GSA-Rotor bei 4500 rpm zentrifugieren (Überstand sammeln!). Das so gewonnene Pellet wird mit Puffer III resuspendiert und erneut zentrifugiert (Überstand sammeln!). Das Pellet wird in 0,25 M Saccharose gelöst (ca. 24,6 g Pellet/130 ml 70,7% Saccharoselösung) und gut gemischt. Ca. 20 ml resuspendiertes Pellet werden auf einen Saccharose- Gradienten (16 ml 70,7%; 8 ml 48%; 8 ml 42%) geschichtet und bei 28 000 rpm 60 min in der UZ mit Ti 28-Rotor zentrifugiert, das Pellet in Puffer resuspendiert und in Stickstoff eingefroren (bei -80°C gelagert). Diese Fraktion wird als Membranfraktion bezeichnet und enthält auch Mitochondrien.

Der gesammelte Überstand wird bei 28 000 rpm 60 min in der UZ mit Ti 28-Rotor zentrifugiert und das Pellet in 1,15 M Saccharose-Lösung resuspendieren. Das resuspendierte Pellet wird auf einen Saccharose-Gradienten (16ml 1,15M; 8 ml 1 M; 8 ml 0,6 M) geschichtet und bei 50 000rpm 195 min in der UZ mit TI70-Rotor zentrifugiert. Das Pellet in Homogenisationspuffer resuspendiert und in Stickstoff eingefroren (bei -80°C lagern). Diese Fraktion wird als Mikrosomenfraktion bezeichnet.

2.2.6 Herstellung von n-IP („neues Inositol-Phosphat“) aus Rattenleber

25 Rattenlebern werden 2 Minuten lang mit einer Carbogen-begasteten Lösung (20°C), bestehend aus 0,9% NaCl, 10 µM Noradrenalin, 1 mM Ascorbinsäure, 2,5 mM Glucose durch die Pfortader gespült. Anschließend werden sie kurz mit bidest. Wasser gespült und in eiskaltem bidest. Wasser homogenisiert. Das Homogenat wird mit dem zweifachen Volumen eines Chloroform/Methanol-Gemisches (Verh.: 2:1) denaturiert und in einer Sorvallzentrifuge mit GSA-Rotor 10 Minuten bei 4°C und 16300g zentrifugiert.

Der Überstand wird in einen Scheidetrichter überführt und nach der Phasentrennung wird die untere Chloroform-Phase (enthält unpolare Bestandteile) verworfen. Aus der oberen Methanol-Wasser-Phase (enthält polare Substanzen, unter anderem das n-IP) wird mit Hilfe eines Rotationsverdampfers (55°C, ca. 190 mbar) organisches Lösungsmittel entfernt. Der pH-Wert wird mit 1 M Essigsäure auf pH 7.0 eingestellt und die Lösung in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Trockne lyophilisiert.

Das Lyophilisat wird in bidest. Wasser aufgenommen (1 mL Wasser/ 10g Leber), mit Hilfe einer Sephadex G-15 Säule chromatographisch aufgetrennt und der n-IP- Gehalt der einzelnen Fraktionen mit Hilfe des cPIP-Tests bestimmt. Die n-IP-haltigen Fraktionen werden vereinigt, der pH-Wert erneut auf pH 7.0 mit 1 M Essigsäure eingestellt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und zur Trockne lyophilisiert. Anschließend wird das Lyophilisat in bidest. Wasser aufgenommen, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.2.7 cPIP-Test

Der cPIP-Test erfolgt mit Hilfe von radioaktiv-markiertem ^3H -cPIP, welches durch die cPIP-Synthase aus radioaktiv-markiertem ^3H -PGE₁ und aktiviertem Inositolphosphat (n-IP) gebildet wird. Nicht umgesetztes ^3H -PGE₁ wird chromatographisch vom neu synthetisierten ^3H -cPIP getrennt. Die synthetisierten Mole ^3H -cPIP können aufgrund der bekannten spezifischen Radioaktivität von $^3\text{HPGE}_1$ berechnet werden.

Der cPIP-Testansatz mit einem Gesamtvolumen von 300 μL enthält folgende Substanzen:

13,3 mM Natriumfluorid
13,3 mM Magnesiumchlorid
13,3 mM Adenosintri-phosphat
1,2 mM β -Mercaptoethanol
22,0 mM Phosphatpuffer; pH 7.5
12,0 μM aktiviertes Inositolphosphat
5,1 μM $^3\text{HPGE}_1$
bidest. H₂O

Durch Zugabe von 20 μL Enzymsuspension wird der Test gestartet; die Inkubation erfolgt bei 30°C für 10 bzw. 30 Minuten. Ein Test ohne Enzymsuspension bildet den Leerwert.

Nach der Inkubation folgt die chromatographische Trennung von ^3H -PGE₁ und ^3H -cPIP nach einem modifizierten Verfahren nach *Wasner* (1985), welches

seinen Ursprung in einer Auftrennung verschiedener Prostaglandine nach *Jaffe* (*Jaffe et al.*, 1973) hat.

Bei dieser Chromatographie bildet Kieselsäure die stationäre Phase und die mobile Phase besteht aus Lösungsmittelgemischen, bestehend aus Toluol, Essigsäureethylester und Methanol, welche ansteigende Methanolanteile aufweisen.

Dadurch werden $^3\text{H-PGE}_1$ und $^3\text{H-cPIP}$ aufgrund unterschiedlicher Polaritäten voneinander getrennt.

Durchführung der Säulenchromatographie:

0,4 g Kieselsäure und 2 mL Lösung I (Toluol/ Essigsäureethylester, Verh.: 3:2) werden gemischt und in eine Glassäule mit eingeschweißter Fritte gefüllt, welche zuvor mit 3 mL Lösung I gespült wurde. Anschließend wird die Säule mit 6 mL Lösung I äquilibriert. Ein Aliquot von 100 μL des Probenansatzes wird auf die Säule aufgetragen. Anschließend wird die Säule mit Lösungsmittelgemischen gewaschen, zweimal mit 6 mL der Lösung II (Toluol/ Essigsäureethylester/ Methanol, Verh.: 3:2:1), man erhält die Fraktionen A und B. In diesen beiden Fraktionen eluiert hauptsächlich das weniger polare $^3\text{H-PGE}_1$.

Es folgen 6 mL der Lösung III (Toluol/ Essigsäureethylester/ Methanol, Verh.: 3:2:2), man erhält die Fraktion C, im Anschluß folgen 6 mL Lösung IV (Toluol/ Essigsäureethylester/ Methanol, Verh.: 3:2:6) und man erhält die Fraktion D. Der letzte Waschschrift erfolgt mit 6 mL Methanol und man erhält die Fraktion E. In den Fraktionen D und E eluiert hauptsächlich das polarere $^3\text{H-cPIP}$.

Die Eluate werden mit 10 mL Rotiszint 11 versetzt, gemischt und im Szintillationszähler gemessen.

2.2.8 Solubilisierung der Membran

Es werden 430 μL Plasmamembran mit 70 μL einer Solubilisierungslösung versetzt, welches zu zwei Drittel aus einer 10%igen Detergenzstocklösung (z. B.: Triton X-114) und zu einem Drittel aus einem 1 M Tris/ HBr-Puffer (pH 7.4) besteht. Man legt die 430 μL Plasmamembran in einem Reagenzgefäß vor und gibt unter leichtem Schütteln die Solubilisierungslösung tropfenweise hinzu. Anschließend wird das Gemisch für 10 min auf Eis inkubiert. Danach wird es in einer Sorvall-Zentrifuge (SS34-Rotor) für 10 min bei 4°C mit 10.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand enthält die cPIP-Synthase. Mit diesem Überstand kann man einen cPIP-Test unter folgenden Bedingungen durchführen: Zusammenpipettieren der Lösungen wie im Protokoll beschrieben mit anschließender Inkubation bei 30°C im Wasserbad für 10 min. Anschließende Messungen erfolgen wie oben beschrieben.

2.2.9 Einbau und Nachweis von radioaktiv-markiertem ATP-³²P in die Mikrosomenfraktion

Folgender Ansatz wurde zusammenpipettiert:

2	mL	Enzymfraktion
1	mM	EGTA
1	mM	Quabain
1	mM	Na-Vanadat
2,5	mM	Fluorid
10	mM	Magnesium
20	mM	Phosphatpuffer; pH 7.4
0,32	mM	ATP
40	μL	ATP- ³² P (0,2 mCi)

mit bidest Wasser wurde auf ein Endvolumen von 5 mL aufgefüllt.

Der Ansatz wurde 30 Sekunden bei 30°C im Wasserbad inkubiert und anschließend 5 Minuten bei maximaler Drehzahl in der Rotixa/K-Zentrifuge zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 2 mL Gelfiltrationspuffer aufgenommen, mit 325 µL Solubilisierungslösung vorsichtig gemischt und gelfiltriert. Ein Aliquot der gewonnenen Fraktionen wird im cPIP-Test eingesetzt und zusätzlich wird der Gehalt an ^{32}P im β -Counter detektiert. Die Fraktionen mit cPIP-Synthaseaktivität werden eingeengt, und mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese weiter aufgetrennt. Anschließend inkubiert das Gel auf einer Phosphorimager-Platte für 2 Tage, dann wird die Platte auf ^{32}P -Banden detektiert.

2.2.10 PGE₁-Photoaffinitäts-Labeling mit der Mikrosomenfraktion

Herstellung des PGE-Labels:

40	µL	PGE ₁
2	mL	trockenes Aceton
10	µL	trockenes Pyridin
30	µL	Diazomalonylchlorid

Dieser Ansatz inkubiert 15-30 Minuten bei Raumtemperatur und wird anschließend über Nacht bei 4°C abgedunkelt gelagert. Am nächsten Tag werden 2 mL bidest. Wasser zugesetzt und mit Hilfe des Vakuum-Rotationsverdampfers das Aceton abgetrennt. Anschließend werden 2 mL Tris/HCl-Puffer; pH 7.4, hinzupipettiert und der Ansatz auf eine 400 mL Sephadex G-15 Säule aufgetragen und mit bidest. Wasser eluiert. Ein Aliquot der gewonnenen Fraktionen wird im cPIP-Test eingesetzt und zusätzlich wird

die Konzentration an $^3\text{H-PGE}_1$ im β -Counter bestimmt. Die Fraktionen mit cPIP-Synthaseaktivität werden eingengt, und mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese weiter aufgetrennt. Anschließend inkubiert das Gel auf einer Tritium-Imager-Platte für 5 Tage, dann wird die Platte auf ^3H -Banden detektiert.

2.2.11 Gelfiltration

Puffer IV (1 L):

- 20 mL 1M Tris/HBr
- 140 μL 2-Mercaptoethanol (99%)
- 10 mL 20% Triton X-114
- 100 mL 1M Natriumfluorid
- 2,5 mL 200 mM Na-Vanadat (erst kurz vor Gebrauch des Puffers zufügen, da es sonst mit dem 2-Mercaptoethanol reagiert)

Aktivierung von Natriumortho-Vanadat:

Na_3VO_4 –Lösung sollte aktiviert werden, um eine optimale Hemmung der Protein-Phosphotyrosyl-Phosphatasen zu erreichen.

1. Herstellung einer 200 mM Na_3VO_4 –Lösung.
2. Mit 1 N NaOH oder 1 N HCl den pH auf 10,0 einstellen. Bei diesem pH ist die Lösung gelb.
3. Die Lösung kochen bis sie farblos ist (ungefähr 10 Minuten).
4. Auf Raumtemperatur abkühlen lassen.
5. Den pH erneut auf 10.0 einstellen und die Schritte 3 und 4 solange wiederholen bis die Lösung farblos und der pH bei 10.0 stabil bleibt.
6. Das aktivierte Na_3VO_4 wird aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Kleiner Ansatz (für 180 mL- Chromatographiesäule):

Die 180 mL-Säule (stationäre Phase: Sephacryl S-300 HR) wird mit 400 mL Puffer IV äquilibriert (Durchflussrate: 260 mL/h).

1,5 mL Plasmamembran werden in Eiswasser aufgetaut und mit 244 µL Solubilisierungslösung (siehe 2.2.8) tropfenweise gemischt, 10 min auf Eis inkubiert und anschließend in einer Sorvallzentrifuge mit einem SS34- Rotor bei 10.000 rpm in für 10 min zentrifugiert (4°C). Alle folgenden Schritte erfolgen bei 4°C.

Der Überstand wird gleichmäßig am Säulenrand aufgetragen. Nachdem die Suspension ins Gel gesickert ist, wird etwas Gelfiltrationspuffer auf die Säule geschichtet und die Elution mit Gelfiltrationspuffer gestartet (Durchflussrate: 303 mL/h). Es werden 100 Fraktionen a 2 mL gesammelt.

Großer Ansatz (für 450 mL- Chromatographiesäule):

Die 450 mL-Säule (stationäre Phase: Sephacryl S-300 HR) wird mit 900 mL Puffer IV äquilibriert (Durchflussrate: 330 MI/h).

Es wird ca. 4,2 mL Plasmamembran mit 740 µl Solubilisierungslösung (siehe 2.2.8) tropfenweise gemischt, anschließend wird analog zum kleinen Ansatz verfahren. Es wird 100 Fraktionen a 4 mL gesammelt.

2.2.12 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte mit

- a) Dem BCA Protein Assay Reagent (Firma Pierce.

Das Verfahren erlaubt die Messung von Proteinkonzentrationen zwischen 20 - 2000 µg/mL. Diese Proteinbestimmung beruht auf einer Methode nach *Smith et al.* (1985), bei der Cu^{2+} -Ionen im alkalischen Milieu durch Proteine zu Cu^{1+} -Ionen reduziert werden. Diese Cu^{1+} -Ionen reagieren mit je zwei Molekülen Bicinchonin-Säure und bilden einen purpurfarbenen, wasserlöslichen Komplex, dessen Farbintensität der Proteinkonzentration proportional ist und der bei 562 nm photometrisch bestimmt wird. Als Standard wurde Rinderserumalbumin verwendet.

- b) dem BIO-RAD Protein Assay (Firma Bio-RAD).

Man kann Proteinkonzentrationen zwischen 25 – 1400 µg/mL messen.

Der Proteintest beruht auf der Beobachtung, dass sich das Absorptionsmaximum einer sauren Coomassie Brilliant Blue G-250 Lösung von 465 nm nach 595 nm verschiebt, wenn Protein daran gebunden wird (*Spector*, 1978). Als Standard wird Rinderserumalbumin verwendet.

2.2.13 Ansetzen einer 10%igen Triton X-114 Stocklösung

20 mL Triton werden mit 400 mL eiskaltem dest. Wasser versetzt und zu einer homogenen Lösung im Eisbad verrührt. Dann wird das Gemisch im Schüttelwasserbad auf 32 °C erhitzt und inkubiert dort für 8 Stunden. Es bilden sich zwei Phasen, von denen die obere mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt

wird. Die untere Phase wird erneut mit eiskaltem Wasser versetzt usw. (insgesamt 3 mal).

Anschließend wird die untere Phase lichtgeschützt im Kühlschrank aufbewahrt. Mit Hilfe einer Verdünnungsreihe (1g Triton/100 mL Wasser) wird die Endkonzentration der Detergenzlösung bei 278 nm und unter 20°C (z. B. gekühltes Photometer, im Kühlschrank) photometrisch bestimmt.

Die Verdünnung erfolgte nach folgendem Schema:

Die Eichlösung bestand aus 1 g Triton X114 auf 100 mL Wasser bidest. aufgefüllt. Die Eichkurve wurde mit Triton X114-Konzentrationen von 0,01% bis 0,0025% erstellt.

2.2.14 Anionenaustauscherchromatographie

Puffer V (100 mL):

1 mL 1M Tris/HBr (10 mM)

10 µL 2- Mercaptoethanol (1 mM)

200 µL Triton X-114 (0,2%) Stammlösung

pH 7.6

Puffer VI (100 mL):

1 mL 1M Tris/HBr (10 mM)

10 µL 2- Mercaptoethanol (1 mM)

200 µL Triton X-114 (0,2%) Stammlösung

3,51 g NaCl (0,6M)

pH 7.6

2.2.15 Silberfärbung nach Heukeshoven und Dernick (1988)

Das SDS-Gel wird mindestens 30 Minuten in 250 mL Lösung I (3 Volumen Ethanol:1 Volumen Essigsäure (96%):6 Volumen dest. H₂O) fixiert.

Anschließend wird das Gel in 250 mL Lösung II (75mL Ethanol; 17,00 g Natriumacetat (erst in H₂O lösen, dann EtOH hinzugeben); 1,25 mL Glutaraldehyd (25% g/v)(erst vor Gebrauch hinzugeben); 0,50 g Na₂S₂O₃* 5 H₂O (erst vor Gebauch hinzu geben) mit dest. H₂O auf 250 mL auffüllen) für 30 Minuten oder über Nacht inkubiert. Nach der Inkubation erfolgt ein dreimaliges Waschen mit jeweils 250 mL Aqua dest.. Die Versilberung (ca. 20 Minuten) erfolgt mit Lösung III (0,5 g AgNO₃; 50 µL Formaldehyd (37% g/v) (erst vor Gebrauch hinzu geben) auf 250 mL mit Aqua dest. auffüllen).

Die Entwicklung erfolgt mit Lösung IV (7,5 g Na₂CO₃; 30 µL Formaldehyd (37% g/v) (erst vor Gebrauch hinzugeben) und mit Aqua dest. auf 300 mL auffüllen zunächst mit 100 mL für eine Minute, Lösung verwerfen und anschließend für 60 Minuten mit 200 mL Lösung IV.

Die Entwicklung wird mit der Lösung V (2,5 g Glycin/250 mL Aqua dest.) gestoppt und das Gel dreimal mit jeweils 250 mL Aqua dest. gewaschen. Die Präservation erfolgt mit Lösung VI (25 mL Glycerin (87% g/v)/250 mL Aqua dest.) für 30 min, dann wird das Gel bei Raumtemperatur getrocknet.

2.2.16 Silbergel entfärben

Lösung VII: 37 g Natriumchlorid und 37 g Kupfersulfat * 5 H₂O werden in 800 mL Wasser gelöst, NH₄OH zugeben bis sich der Niederschlag löst und die Lösung tief blau wird, dann auf 1 L mit Wasser auffüllen.

Lösung VIII: 684 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ werden in 900 mL Wasser gelöst und auf 1 L aufgefüllt.

Entfärberlösung: 10 mL Lösung VII und 10 mL Lösung VIII mischen und mit Wasser auf 200 mL auffüllen. Falls die Lösung grün wird, NH_4OH zugeben bis die Lösung wieder tiefblau ist.

Gel 5 min mit Wasser waschen. Gel in Entfärberlösung inkubieren bis der gewünschte Entfärbungsgrad erreicht ist, dann mit 5%iger Essigsäure stoppen.

2.2.17 Coomassie-Färbung (Diezel *et al.*, 1959)

2 g Coomassie G-250 in 1 L H_2O lösen und unter Rühren mit 1 L Schwefelsäure (1 mol/L oder 55,5 mL konz. H_2SO_4 /L) versetzen. Nach dreistündigem Rühren abfiltrieren (Faltenfilter), das braune Filtrat mit 220 mL Natronlauge (10 mol/L oder 88 g/220 mL) versetzen. Zuletzt 310 mL einer 100 % TCA hinzufügen und gut mischen, Lösung wird grün.

Fixierung/ Färbung: 3 h bei 50 °C oder über Nacht bei Zimmertemperatur

Auswaschen der Säure: 1-2 h in H_2O einlegen, dabei werden grüne Banden blau und intensiver.

2.2.18 Fiske-Subbarow-Phosphatbestimmung (Doose, 1975)

Reagenz nach Fiske-Subbarow:

In einem 100 mL Erlenmeyer werden 6,85 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ in 50 mL Wasser gelöst und 0,125 g 1-Amino-2-naphthol-4-sulfonsäure hinzu geben und schütteln bis alles gelöst ist. In einem Reagenzglas 1,5 g Na_2SO_3 in 5 mL Wasser lösen und tropfenweise zur Erlenmeyerlösung hinzugeben. Falls eine Trübung auftritt, filtrieren. Lösung in eine dunkle Flasche überführen und 2 Tage im Dunkeln stehen lassen.

Phosphatbestimmung nach Fiske-Subbarow:

Im Eisbad ansetzen: 10 mL 60 % HClO_4
 3,75 mL Fiske-Subbarow-Reagenz
 86,25 mL 0,48 % Ammoniummolybdat

gut mischen. Je 4 mL auf 1 mL Probe geben und 20 min stehen lassen.

Bei 691 nm gegen den Leerwert messen.

2.2.18 Glucose-6-phosphatase-Bestimmung (mikrosomaler Marker)

Verwendete Lösungen:

Lösung A: 1 L Saccharose (0,25 M)

Lösung B: 1 L Saccharose (0,25 M)/EDTA (1 mM); pH 7

Lösung C: 10 mL Glucose-6-Phosphat (0,1 M)

Lösung D: 10 mL Kacodylat-Puffer (0,1 M); pH 6.5

Lösung E: 100 mL Phosphat-Standardlösung (1,5 mM)

Lösung F: 500 mL Ascorbinsäure (2%)/Trichloressigsäure (10%) (w/v)

Zellsuspension mit Lösung B (Saccharose/EDTA) verdünnen.

Ansatz: 0,1 mL Saccharose/EDTA-Lösung (Lsg B)
 0,1 mL Glucose-6-phosphat-Lösung (Lsg C)
 0,1 mL Pufferlösung (Lsg D)

mischen und bei 37°C temperieren

+ 0,1 mL Probe

mischen und 5-10 min bei 37°C inkubieren

+2 mL Ascorbinsäure/TCA Lösung (Lsg F)

mischen und 3 min bei 3000 g zentrifugieren.

Überstand zur Fiske Subbarow-Phosphatbestimmung.

2.2.19 5'-Nucleotidase-Bestimmung (Membran-Marker)

5'-Nucleotidase wird bei 37°C nachgewiesen.

Endvolumen: 0,5 mL

Stammlösungen: AMP-Konz.: 0,005 M (195,5 mg/10 mL AMP-
Na₂)

MgCl ₂ -Konz.:	0,01M	(203,3 mg/10 mL MgCl ₂ *6 H ₂ O)
Glycin-Puffer:	0,05M	(375,4 mg/10 mL Glycin) pH 9,1 mit NaOH

nach 10-30 min stoppt man die Reaktion durch Zugabe von 2,5 mL TCA (8%). Die Lösung wird durch Whatman No. 42-Papier filtriert; 1,8 mL zur Fiske-Subbarow-Bestimmung.

2.2.20 GST-pull down Assay (Lehr *et al.*,1999)

5 % μg *in vitro* phosphoryliertes hGab-1-C, bzw. verschiedene IRS-1 oder IRS-2 (erhalten von Prof. Müller-Wieland) Fusionsproteine sowie 5 μg GST wurden mit 50 μL Enzymfraktion aus Rattenleber in Pull-Down-Puffer (20 mM Tris/HCl, pH 7.5; 100 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1 mM Na-Vanadat; 50 mM NaF; 1 mM Glycerophosphat) versetzt. Nach Inkubation für 1,5 Stunden bei 4°C auf einem Überkopfschüttler (60 UpM) wurde die Sepharose abzentrifugiert (1000g, 5 Minuten, 4°C) und dreimal mit Pull-Down-Puffer (20-faches Sepharosevolumen) gewaschen. Die Waschschrte dienten der Entfernung aller nicht gebundener Proteine von der Sepharose. Nach dem dritten Waschschrte wurde die Sepharose komplett von dem noch verbleibenden Pull-Down-Puffer befreit, indem mit einer 10 μL Pipettenspitze bis in das Pellet eingestochen und die verbleibende Flüssigkeit abgesaugt wurde. Dies diente dazu, die Proteine in einem so kleinen Volumen wie möglich zu lösen. Die erhaltenen Pellets wurden im cPIP-Test eingesetzt.

2.2.21 Bestimmung der Insulin-Rezeptoren

Bindungspuffer:	100 mM	Dinatriumhydrogenphosphat
	1 %	Bovine Serum Albumin
	0,025 %	Triton X-100, pH 7.3

Folgender Ansatz wird über Nacht bei 15°C auf dem Schüttler in Reagenzgläsern inkubiert:

250	µL	Bindungspuffer
30	µL	^{125}I -Insulin (5×10^{-11} Mol/L)
5	µL	Fraktion

Die anschließende Probenpräzipitation erfolgt durch Zugabe von je 500 µL γ -Globulin-Lösung (0,13 % γ -Globulin in 100 mM Natriumphosphatpuffer; pH 8.0) auf dem Eisbad, dann werden 0,6 mL 30 %ige Polyethylenglycol-Lösung zum Ausfällen der Proteine zupipettiert, mit Hilfe des Vortexers gründlich gemischt, 10 Minuten auf dem Eis inkubiert und abschließend über Membranfilter (Millipore EA- Porengröße 1 µM) abfiltriert.

Es wird zweimal mit 2 mL 8 %iger Polyethylenglycol-Lösung gewaschen, anschließend werden die Filter in kleine Reaktionsgefäße überführt und die Radioaktivität im γ -Counter bestimmt.

2.2.22 Skelettmuskel-Aufschluß

Puffer VII : 20 mM Tris-HCl pH 7.4

250 mM Saccharose

+Protease Inhibitor-Tablette 25 µL/mL Puffer (Boehringer)

Puffer VIII : 20 mM Tris-HCl pH 7.4 (242 mg/100 mL)

250 mM Saccharose (8,55 g/100 mL)

50 mM Na-pyrophosphat (2,23 g/100 mL)

300 mM KCl (2,23 g/100mL)

20 mM Tris-HCl pH 7.4 zum Verdünnen der einzelnen Fraktionen nach der Gradientenzentrifugation

30 mM HEPES pH 7.4 (714 mg/100 mL)

250 mM Saccharose (8,55 g/100 mL)

zum Aufnehmen der Pellets der einzelnen Fraktionen

- in Rotor SW 40: Von unten nach oben:

3 mL 35% Saccharose (wt/wt)

2 mL 29% Saccharose (wt/wt)

2 mL 26% Saccharose (wt/wt)

2 mL 23% Saccharose (wt/wt)

2 mL Probe (crude fraction)

- mindestens 10 g Skelettmuskel (1 g/10 mL) mit Puffer VII mindestens 6 mal für 15 sec im Ultraturax zerkleinern bis das Homogenat ein lachsfarbenes Aussehen hat
- je nach Menge in Eppendorf-Zentrifuge bei 10.000 rpm/4°C/15 min oder in SORVALL bei 9000 rpm/4°C/15 min zentrifugieren
- Überstand abnehmen und (je nach Ausbeute) in Ti70/Ti50 Röhrchen überführen
- Pellet nochmals gut in Puffer A resuspendieren, erneut im Ultraturax zerkleinern und wie oben beschrieben erneut zentrifugieren
- Überstand wieder abnehmen und mit dem 1. Überstand vereinigen
- bei größerer Menge im Ti70-Rotor bei 50.000 rpm/4°C/1,5h; sonst im Ti50-Rotor bei 50.000 rpm/4°C/2h in der UZ zentrifugieren
- die crude fraction (cf) (Pellet) je nach Größe in 1-2 mL Puffer C aufnehmen und resuspendieren (4 x 25 µL aliquotieren für Proteinbestimmung und Gellauf)
- cf auf den Saccharose- Gradienten geben
- in Rotor SW40 bei 20.000 rpm/4°C/16h ohne Bremse zentrifugieren
- einzelne Fraktionen (Interphasen) – F23- F26- F29- F35 entnehmen und mit 20 mM Tris-HCl pH 7,4 verdünnen
- im Ti50 bei 40.000 rpm/4°C/2h zentrifugieren
- einzelne Pellets der Fraktionen (23, 26, 29, 35) in Hepes/Saccharose pH 7.4 aufnehmen, aliquotieren und einfrieren.

2.2.23 Western Blotting

A Gel-Elektrophorese

B Western Blotting

C Proteinfärbung mit Ponceau S

D Protein-Detektion mit Antikörper

E Strippen der Immunoblotting-Membran

-Blotting-Apparatur PHARMACIA LKB Novablot (Amersham Pharmacia)

-MUNKTELL 1F-Filterpapiere (Amersham Pharmacia)

-PVDF IMMOBILON-P 0,45 μ M (Millipore/Sigma)

-Homogenes Fertiggel 7,5% (Amersham Pharmacia)

-Gradienten-Fertiggel 8-18% (Amersham Pharmacia)

-Proteinmarker Prestained (Promega)

-Proteinmarker Broad Range (Promega)

-Rinder-Serum Albumin FraktionV (Sigma)

-Milchpulver (Reformhaus)

-Tween 20 (Biorad)

-Ponceau S (Sigma)

-SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce)

-Western Blot Receycling Kit (Alpha Diagnostic)

-Anoden-Puffer 1

0,3 M Tris 36,3 g

20% (v/v) Methanol 200 mL mit dest. H₂O ad 1000 mL

-Anoden-Puffer 2

25 mM Tris	3,03 g	
20% (v/v) Methanol	200 mL	mit dest. H ₂ Oad 1000 mL

-Kathoden-Puffer

40 mM 6-Aminohexansäure	5,2 g	
0,01 % SDS	0,1 g	
20 % (v/v) Methanol	200 mL	mit dest. H ₂ Oad 1000 mL

-Ponceau S

Ponceau S	0,1 g	
Essigsäure	5,0 mL	mit dest. H ₂ Oad 1000 mL

-TBS 10 x

Tris	24,2 g	
NaCl	8 g	mit dest. H ₂ Oad 1000 mL

mit HCl auf pH 7.6 einstellen und bei 4°C aufbewahren.

-Stammlösung TBS – 0,25% Tween 20 (Milchpulver-System)

10 x TBS	100 mL	
Tween 20	2,5 mL	mit dest. H ₂ Oad 1000 mL

-Blockierungslösung TBS-T + 5% Milchpulver

Stammlösung TBS-T	100 mL	
Milchpulver	5,0 g	

-Antikörper-Gebrauchslösung

Stammlösung TBS-T	100 mL
Milchpulver	5,0 g

Konzentration *anti-IRS-1* (α -IRS-1/K6B): 0,5-2 μ g/mL

-Antikörper-Gebrauchslösung

Stammlösung TBS-T	100 mL
Milchpulver	5,0 g

plus anti-Rabbit IgG HRP

Verdünnung 1:5000

-Stammlösung TBS – 0,05% Tween 20 (BSA-System)

10 x TBS	100 mL	
Tween 20	5,0 g	mit dest. H ₂ O ad 1000 mL

-Blockierungslösung TBS-T + 1 % BSA

Stammlösung TBS-T	100 mL
BSA Frac. V	1,0 g

Bei Aufbewahrung der Antikörper-Gebrauchslösungen bei 4 °C:

Zugabe von Natriumazid (Spatelspitze).

A Gel-Elektrophorese

Gelplatte waagegerecht orientieren, mit 2-3 mL Petroleum befeuchten und das Kühlgerät starten (10°C). Fertiggel aus der Verpackung nehmen, auflegen (ohne Luftblasen) und Oberfolie abziehen. Pufferstreifen jeweils einige Millimeter ober- bzw. unterhalb der Gelkante auf das Gel legen:

Probenbeladung:

Gradienten-Fertiggel $V_{\max} = 25 \mu\text{L}$

Oberplatte zur Orientierung der Pufferstreifen aufsetzen und Pufferstreifen ausrichten. Wenn die Elektroden mittig sind, Oberplatte einsetzen. Deckplatte einsetzen. Starten der Elektrophorese:

20 min 600 V – 20 mA – 30 W

danach 600 V – 40mA (max. 50 mA) – 30 W

Dauer ca. 2 – 3,5 h.

Beendigung der Elektrophorese, wenn die farbige Lauffront (blau: Prestained Standard / rot: BioRad Sample Buffer) die Anode erreicht hat.

B Western Blotting

18 MUNKTELL Filterpapiere und 1 IMMOBILON-P-Membran im Format 10 x 25 cm oder 10 x 12,5 cm (halbes Gel) schneiden. Vorbereitung der Blotting-Apparatur: Untere Platte mit dest. H₂O anfeuchten. IMMOBILON-P-Membran ca. 1 min mit wenig Methanol inkubieren und mehrfach mit dest. Wasser spülen und in Anoden-Puffer 2 legen. 6 Filter-Papiere in Anoden-Puffer 1 tränken und auf die untere Platte legen. 3 Filterpapiere in Anoden-Puffer 2 tränken und

darüber legen. Gel kopfüber ca. 5 min in Anoden-Puffer 2 tauchen (Handschuhe tragen). Entfernen der Folie vom Fertiggel mit filmremover (LKB):

-Gel auflegen (Folie nach unten) und mit der Klammer arettieren.

-Festklemmen des Drahtes an der rechten Seite und Gel von der Folie abtrennen.

Aufsetzen der IMMOBILON-P-Membran etwa in Höhe der Farbstoff-Lauffront.

Gelpaket kopfüber auf das Filterpapier-Paket legen (Blot-Membran nach unten).

Vorsichtig Gelfolie abziehen und mit Pinzette an den Slots nachhaken. 9

Filterpapiere in Kathodenpuffer tränken und auf das Blotpaket legen.

Entfernung der Luftblasen aus dem Gesamt-Paket mit dem Roller (leicht drücken). Untere Platte in Blotting-Apparatur einsetzen. Obere Platte der

Blotting-Apparatur mit dest. Wasser anfeuchten und Deckel schließen.

Start: 20 V / 200 mA* / 30 W

*: abhängig von Gelgröße: 200 mA bei 10x25 cm (0,8mA/cm²)

100 mA bei 10x12,5 cm

Standard-Parameter: 0,8 mA/cm²

Dauer: 1-3 h

Ende des Blottings:

-Öffnen der Kammer.

-Abziehen der oberen Filterpapiere.

-Membran auf Gelpaket mit Skalpell schneiden und markieren der Prestainedmarker bzw. Colourmarker-Banden mit Kugelschreiber.

-Blot-Membran sofort in entsprechende Blockierungslösung(en) legen.

C Proteinfärbung mit Ponceau S

Inkubation der Blot-Membran für 5-60 min in Ponceau S-Lösung nach dem Blotting. Waschen mit dest. Wasser, bis Proteinbanden sichtbar werden. Protein-Standard mit Kuli auf Blot-Membran markieren.

D Protein-Detektion mit Antikörper

Inkubation der Blot-Membran in Blockierlösung für 1 h / RT:

für anti-IRS-1: TBS – Tween20 – 5% Milchpulver

(Volumen abhängig von Blotgröße und Kammer)

Primär-Antikörper-Inkubation (PI):

anti-IRS-1 (α -IRS-1/K6B) – Verd. 1:3000: in TBS – 0,25%

Tween20 – 5% Milchpulver

Geschlossene Schale auf Schüttler oder 50 mL-Falcon auf Rollenmischer benutzen. Die Gebrauchslösungen können gesammelt und wiederverwendet werden.

Schnellwaschen des Anti-IRS-1-Blots und 3 x 15 min waschen mit TBS – 0,25% Tween 20. Sekundär-Antikörper-Inkubation (SI), z.B. des anti-IRS-1-Blots mit anti-Rabbit- IgG HRPO-konjugiert: In TBS – 0,25% Tween 20 – 5% Milchpulver (Verdünnung 1:5000).

Schnellwaschen des anti-IRS-1 / anti-Rabbit-IgG HRPO (SI) bzw. des anti-Phospho-Tyrosin HRPO (PI)-Blots und 3 x 15 min waschen mit TBS – 0,25% Tween 20. Längeres Waschen möglich.

Herstellung der ECL-Färbelösung im Verhältnis 1:1

-SuperSignal West Pico Luminol Enhancer

-SuperSignal West Pico Stable peroxid solution

Das Volumen ist abhängig von der Schalengröße. ECL-Lösung kann mehrfach verwendet werden. Inkubation des Blots in einer lichtundurchlässigen Schale für 1-15 min und danach Einlegen der Blots in eine Prospekthülle. Anpressen und Ausstreichen der Luftblasen.

Starten des Lumi-Imagers:

Lumi-Capture> Lumi analyst

Einstellen der Parameter:

Bestrahlungszeit 30 sec bis 15 min

Chemilumineszenz

Sofortiges Abspeichern der Original-Date. Aufbewahrung der Blot-Membranen in Prospekthüllen und Lagerung bei -20°C.

E Strippen der Immunoblot-Membran

Verdünnung 1:10 der Antikörper-Stripping-Lösung mit dest. Wasser.

Verdünnung 1:10 der Blockierlösung mit PBS.

Inkubation des Blots in Antikörper-Stripping-Lösung 13 min.

Waschen des Blots (5 min) in 1x-Blocking-Puffer.

Waschen des Blots (15 min) in 1x-Blocking Puffer.

Blot in Antikörper-Gebrauchslösung und weiter mit D 2.

2.2.24 Identifizierung der Proteinbanden aus dem SDS-Page Gel durch Maldi-MS

Ausschneiden der Gelbanden per Hand:

Zu identifizierende Proteinbanden werden mit einem Skalpell vorsichtig ausgeschnitten und in eine spezielle 96 Well-Platte überführt. Jede Bande muß nummeriert werden, damit man sie später wieder zuordnen kann. Die ausgeschnittenen Banden können bei -80°C gelagert werden.

In-Gel-Verdau und Standardprobenvorbereitung für Maldi-MS: (original Eppendorf Spitzen und Tubes sowie Teflongefäße benutzen; bidest. Wasser nur aus der Destille verwenden)

1. Gelstücke mit 100 μL Ammoniumhydrogencarbonat (50 mM) unter Schütteln für 10 min bei 25°C inkubieren. Überstand abnehmen und verwerfen.
2. Gelstücke mit 100 μL Ammoniumhydrogencarbonat (50 mM Endkonzentration)/ 50% Acetonitril unter Schütteln für 10 min bei 25°C inkubieren. Überstand abnehmen und verwerfen.

Schritte 1 und 2 dreimal wiederholen! Die Gelstücke können je nach Fragestellung auch ganz geschrumpft werden, indem man zum Schluss 100% Acetonitril auf die Gelstücke gibt.

3. Gelstücke nach Entfernung des Überstandes in der Speed Vacuum Zentrifuge trocknen (ca. 10 min).
4. Tryptischer Verdau mit Promega Trypsin: 5 μL Trypsinlösung (20 $\mu\text{g}/20\mu\text{L}$) werden mit 250 μL 20 mM Ammoniumhydrogencarbonat verdünnt und von dieser Lösung werden je 1-2 μL (0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) auf die Gelstücke pipettiert (10 min Einwirkzeit).

5. Je nach Gelgröße zwischen 2 und 5 μL 20 mM Ammoniumhydrogencarbonat hinzufügen, denn das Gelstück sollte vollständig benetzt sein.
6. Über Nacht bei 37 inkubieren (nicht schütteln und nach 40 min kontrollieren, ob noch ausreichend Flüssigkeit vorhanden ist). Bei -80°C lagern bis zur Massenspektrometrie.
7. Gelstücke mit 25% Acetonitril/ 1% TFA auffüllen, so dass sich 2-4 μL im Überstand befinden. Sofort für Targets verwenden.

2.2.25 Keratinozyten

Die Keratinozyten (Hautklinik HHU Düsseldorf) wurden bei 37°C , 5% CO_2 und oberhalb 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Das verwendete Medium war DMEM inklusive Natriumpyruvat (Gibco), 100 mg/L Penicillin/Streptomycin, 2 mM L-Glutamin und 10% fötales Kälberserum.

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis der cPIP- Synthase in verschiedenen Spezies

Frühere Arbeiten in der Arbeitsgruppe (Wasner, Kassner, Salge) zeigten, dass der Mediator cPIP in der Ratte, im Schleimpilz *Dictyostelium discoideum*, im Regenwurm *Lumbricus terrestris*, in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* und im Humanblut nachgewiesen werden kann.

In dieser Arbeit wurde zunächst die Aktivität der cPIP- Synthase in den verschiedenen Zelltypen nachgewiesen, da es sein könnte, dass die Rattenleber nicht das günstigste Organ ist, um den biochemischen Mechanismus der Stimulierung der cPIP- Synthase durch Hormone zu untersuchen. Es wurden Homogenate kleinerer Proben menschlicher Leber sowie Schweineleber, Homogenate von in Zellkulturen wachsenden Schweine- und Rinderblasenepithelzellen, menschlichen Thrombozyten und Keratinozyten sowie HepG2- Zellen, Stroma- Zellen und Schilddrüsenzellen eines Morbus Basedow (Morbus Basedow) und aus einem Insulinom zur Verfügung gestellt, um die cPIP- Synthase Aktivität zu untersuchen.

3.1.1 Nachweis von cPIP- Synthase in Zellen humanen Ursprungs

3.1.1.1 cPIP- Synthase in der Leber

Die höchste cPIP- Synthase Aktivität hatte Leßmann (Leßmann, 1991) in der Rattenleber nachgewiesen. Daher war es interessant, die cPIP- Synthase Aktivität der menschlichen Leber zum Vergleich zu untersuchen.

Frisch entnommenes Lebergewebe, das während einer Operation entfernt wurde, wurde im Verhältnis 1:7 (Vol/Vol) mit Plasmamembranpuffer bei 0°C homogenisiert und ein Aliquot von 100 µL in den cPIP- Biosynthesetest eingesetzt.

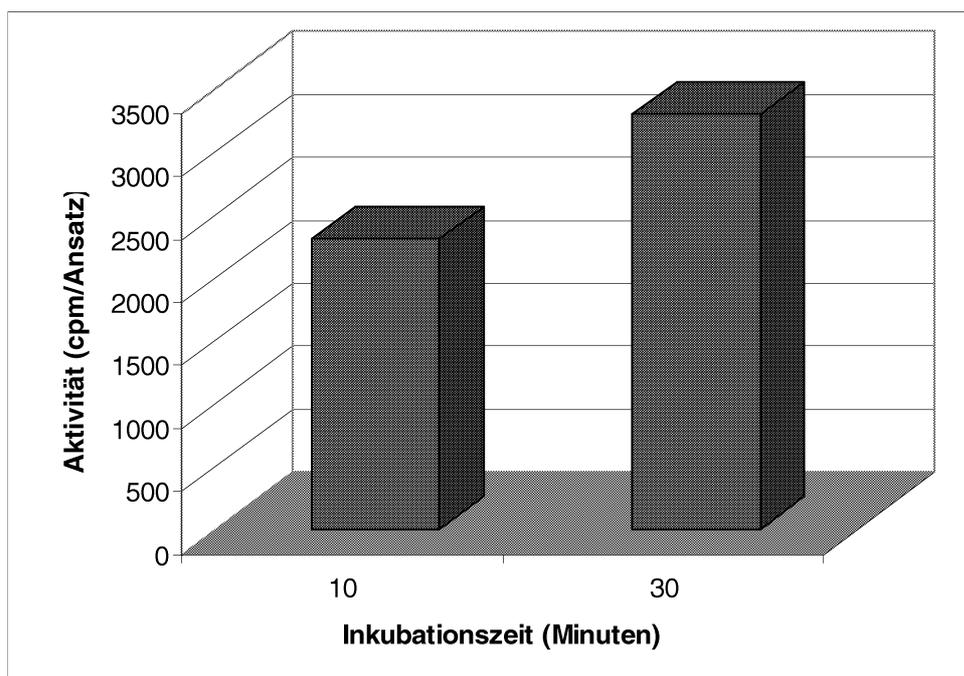


Abb.5: cPIP- Synthase Aktivität im Homogenat der humanen Leber (n=2).

Nach einer 10- minütigen Inkubation bei 30°C wurde eine cPIP- Synthase Aktivität von 2310 cpm/Ansatz gemessen (linker Kegel), das entspricht 118 pMol. Nach einer Inkubationsdauer von 30 Minuten lag die cPIP- Synthase Aktivität bei 3300 cpm/Ansatz (rechter Kegel), das entspricht 168 pMol. Die Testansätze enthielten jeweils 100 µL Leberhomogenat.

Im Homogenat der menschlichen Leber konnte nach 10- minütiger Inkubation bei 30°C eine – mit der Aktivität der Rattenleber vergleichbare cPIP- Synthase Aktivität nachgewiesen werden (Abb.5). Eine Inkubationsdauer von 30 Minuten erbrachte, dass die Synthese von cPIP über die Zeit nicht linear verlief, sondern mit der Zeit langsamer wurde trotz nicht verbrauchter Substrate.

Aufgrund der geringen Menge an Lebermaterial war es nicht möglich, detailliertere Fraktionen der Menschenleber herzustellen und zu charakterisieren.

3.1.1.1 cPIP- Synthase Aktivität in Zellen

Interessant war nach dem vorherigen Versuch mit menschlicher Leber der Nachweis der cPIP- Synthase in HepG2- Zellen, einer menschlichen Leberkarzinom- Zelllinie. Die HepG2- Zellen, die von Schultz (Uniklinik Düsseldorf) zur Verfügung gestellt wurden, wurden mehrere Tage in Voll-Medium angezogen, dann von den Platten geschabt, mit Puffer II gewaschen, homogenisiert und anschließend mit Triton X114 solubilisiert. Ein Aliquot von 100 μL wurde in den Test eingesetzt.

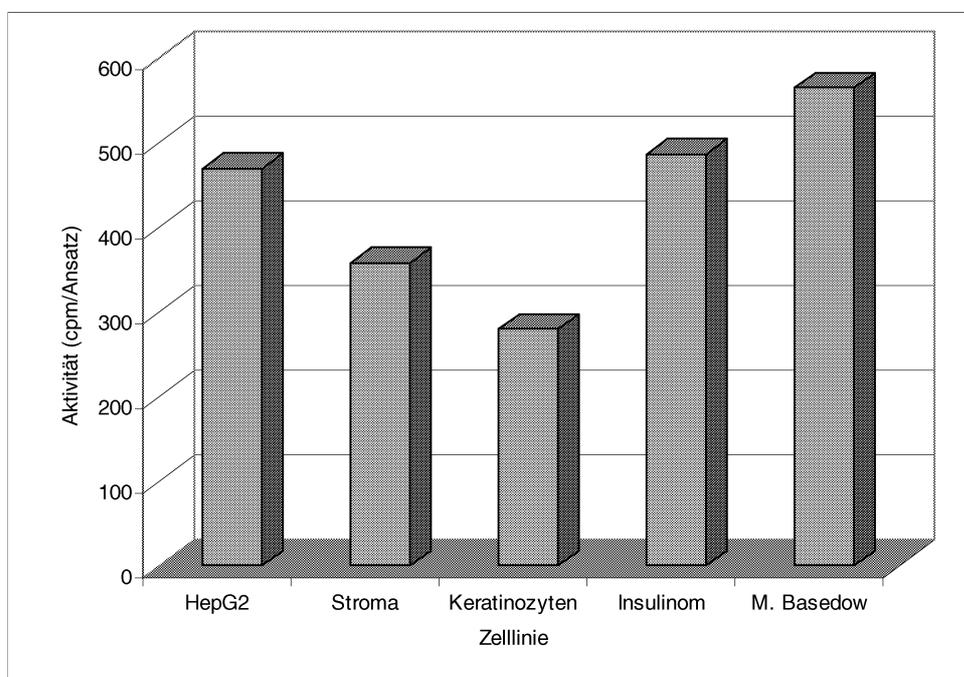


Abb.6: Nachweis der cPIP- Synthase Aktivität in verschiedenen Zelllinien (n=2).

Zur Solubilisierung der verschiedenen Zellhomogenate wurde das Detergenz Triton X114 verwendet. Die cPIP- Synthase Aktivität wurde nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei 30°C bestimmt. Die Testansätze enthielten 100 μL Solubilisat. Es wurden HepG2- Zellen, Stroma- Zellen, Keratinozyten, Insulinom- Zellen und Zellen aus Morbus Basedow getestet.

Auch in den solubilisierten HepG2- Zellen wurde cPIP- Synthase Aktivität gefunden.

Die Proteinkonzentration der eingesetzten HepG2- Zellen ist mit der Proteinkonzentration des Leberhomogenates vergleichbar. Jedoch ist die cPIP-

Synthase Aktivität in den HepG2- Zellen wesentlich geringer als in dem Leberhomogenat. Sie beträgt nur knapp ein Fünftel.

Herr PD Dr. Schultz (Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, Chirurgie) stellte Stroma-Zellen, Schilddrüsenzellen bei M. Basedow und Insulinom- Zellen zur Verfügung. Schon seit vielen Jahren wird in der Arbeitsgruppe von Pfeiffer das Thema Diabetes und Hyperthyreose (18. Wiesbadener Schilddrüsengespräch, 2000) bearbeitet, daher waren in diesem Zusammenhang die Zellen aus M. Basedow besonders interessant, da eine gestörte cPIP- Synthase Aktivität mit der Schilddrüsenüberfunktion zusammenhängen könnte.

Entartete Inselzellen aus dem Pankreasgewebe, Insulinom genannt, in denen ein endogener Insulinüberschuss vorliegt, sollten auf cPIP- Synthase Aktivität getestet werden. Diese Zellen wurden mehrere Tage in Vollmedium kultiviert.

Die Zellen wurden jeweils von den Petrischalen abgeschabt, mit Homogenisationspuffer gewaschen, darin aufgenommen und homogenisiert, mit Triton X114 solubilisiert und ein Aliquot der erhaltenen Lösung wurde in den cPIP- Biosynthesetest eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6 dargestellt. Alle getesteten Zelllinien zeigen sehr geringe cPIP- Synthase Aktivität vergleichbar mit der Aktivität der HepG2- Zellen. Die einzelnen cPIP- Synthase Aktivitäten liegen bei 20 pMol (ca. 400 cpm/Ansatz), die einzige Ausnahme bildete eine Schilddrüsen-Zelllinie aus M. Basedow (es sind drei unabhängige Zelllinien aus M. Basedow getestet worden); hier lag die Aktivität bei 41 pMol (800 cpm/Ansatz).

Es wurden Keratinozyten der adhären Zellelinie HaCaT (human adult skin keratinocytes propagated under low Ca^{2+} conditions and elevated temperature; Boukamp et al.; 1988) von Günther (Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, Hautklinik) zur Verfügung gestellt. Die Keratinozyten wurden bei 37°C, 5% CO_2 und oberhalb 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Das verwendete Medium war DMEM

inklusive Natrium- Pyruvat (Gibco), 100 mg/L Penicillin/Streptomycin, 2 mM L- Glutamin und 10% fötales Kälberserum. Die wie beschrieben herangezogenen Zellen wurden mit Homogenisationspuffer gewaschen und anschließend in ihm aufgenommen und homogenisiert.

Die cPIP- Synthase Aktivität in den Keratinozyten liegt an der unteren Nachweisgrenze bei 15 pMol/Ansatz.

3.1.2 Nachweis der cPIP- Synthase in Schweineleber

Da bisherige Versuche zeigen konnten, dass die cPIP- Synthase in der Leber sehr aktiv ist, sollte die cPIP- Synthase auch in der Schweineleber nachgewiesen werden.

Das Lebermaterial wurde dem frisch getöteten Schein entnommen und sofort auf Eis gelagert, um einen Aktivitätsverlust der cPIP- Synthase durch enzymatische Modifikation zu verhindern. Anschließend wurde das Lebergewebe in Homogenisationspuffer aufgenommen, homogenisiert und ein Adiquot der jeweiligen Fraktionen auf cPIP- Synthase Aktivität getestet.

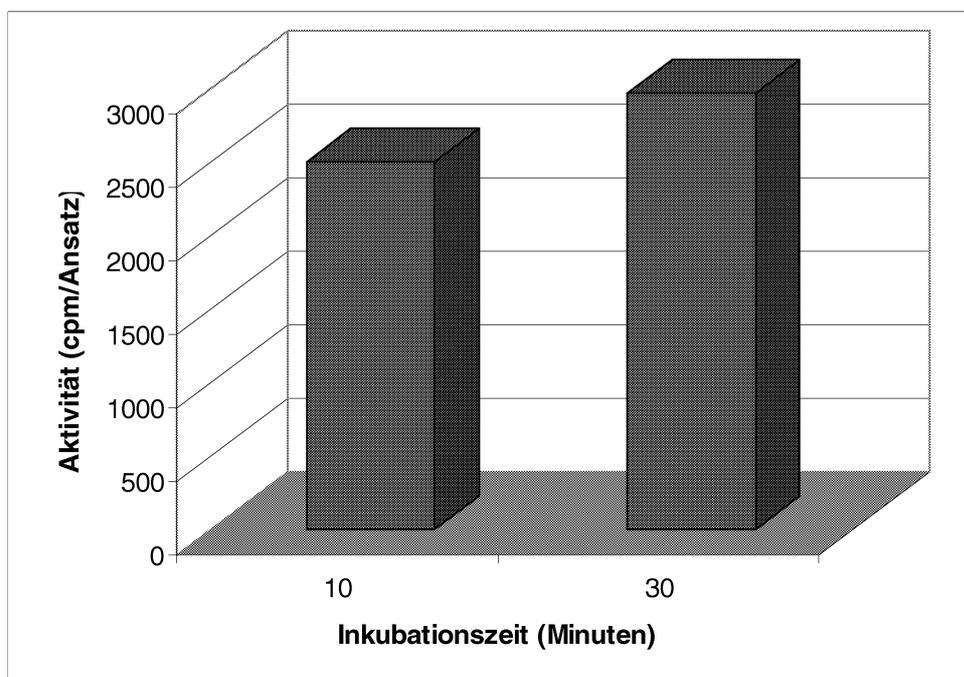


Abb.7: Die cPIP- Synthase Aktivität im Homogenat der Schweineleber (n=3).

Nach einer 10- minütigen Inkubation bei 30°C waren 129 pMol cPIP/ Ansatz (entspricht: 2511cpm/Ansatz) gebildet worden (linker Kegel) und nach einer Inkubationsdauer von 30 Minuten waren es 153 pMol cPIP/Ansatz (entspricht: 2978 cpm/Ansatz) (rechter Kegel). Die Testansätze enthielten jeweils 100 µL Leberhomogenat.

Abbildung 7 zeigt, dass die cPIP- Synthase auch im Homogenat der Schweineleber nachgewiesen werden kann. Die gemessenen Werte sind denen, die in der menschlichen Leber gemessen wurden, vergleichbar.

3.1.3 cPIP- Synthase Nachweis in Schweine- und Rinderblasenepithelzellen

Schweineblasenepithelzellen und Rinderblasenepithelzellen stellte Lebrun (Institut für Arbeitsmedizin, Dortmund) zur Verfügung.

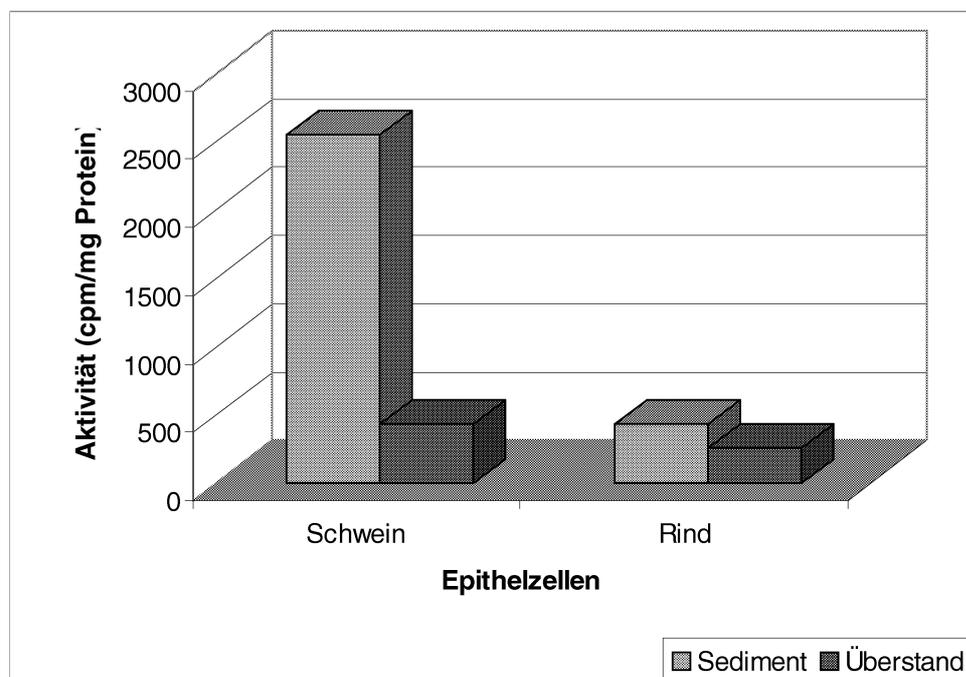


Abb.8: cPIP- Synthase Aktivität in Schweine- und Rinderblasenepithelzellen.

Die Zellhomogenate wurden 2 Minuten bei 500 *g* bei 4°C zentrifugiert und anschließend wurden cPIP- Synthase Aktivität und Proteingehalt in den erhaltenen Sediment- und Überstandfraktionen bestimmt. Die Abbildung zeigt, dass in den Schweineblasenepithelzellen die cPIP- Synthase Aktivität hauptsächlich im Sediment zu finden ist. Im Sediment der Rinderblasenepithelzellen ist nur eine sehr geringe cPIP- Synthase Aktivität nachweisbar, sie ist mit der cPIP- Synthase Aktivität im Überstand vergleichbar.

Die Epithelzellen wurden mit Homogenisationspuffer gewaschen, darin aufgenommen und homogenisiert. Das Homogenat wurde bei 500 *g* bei 4°C zentrifugiert und die so erhaltene Pellet- und Überstandfraktion wurde auf cPIP- Synthase Aktivität getestet. Die Ergebnisse werden in Abbildung 8 dargestellt. Unter diesen Versuchsbedingungen ist in den Epithelzellen vom Schwein eine ca. 5-fach aktivere cPIP- Synthase als in denen vom Rind nachgewiesen werden kann. Des weiteren ist zu sehen, dass trotz der geringen Zentrifugation (500 *g*) in beiden Fällen die cPIP- Synthase Aktivität vor allem in den partikulären Fraktionen gefunden wurde.

3.1.4 Nachweis der cPIP- Synthase im Homogenat der Rattenleber

Seit langem ist die cPIP- Synthase Aktivität in der Rattenleber bekannt. Die in Abb. 9 gezeigte Aktivität wurde aus Vergleichsgründen aufgeführt. Sie wurde unter analogen Bedingungen wie die anderen aufgezeigten Messungen an den Zellen und Organen bestimmt.

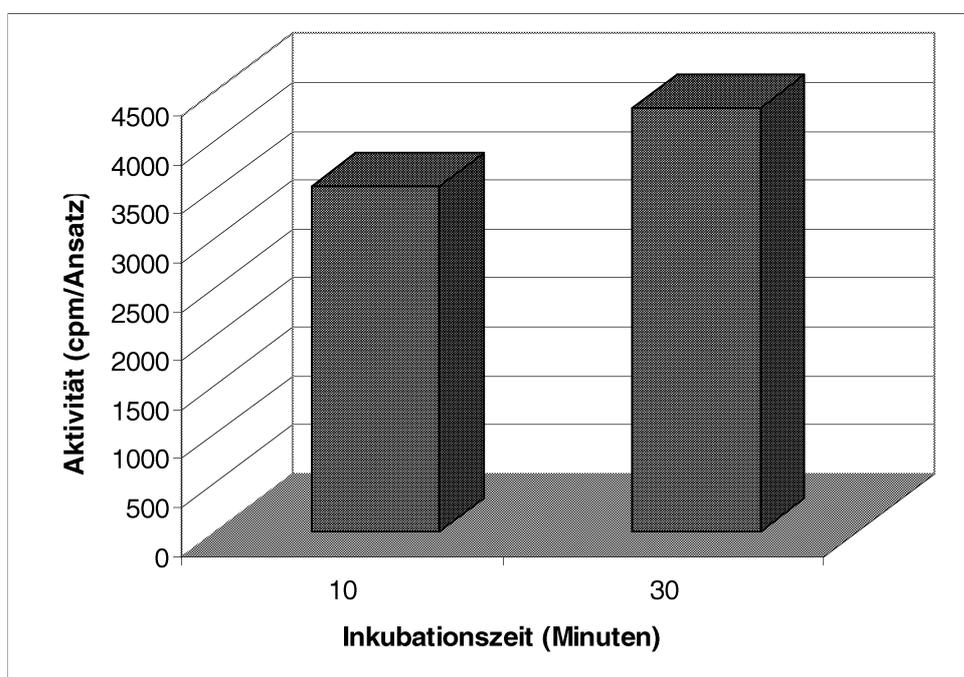


Abb.9: Die cPIP- Synthase Aktivität in Rattenleberhomogenat.

Nach einer 10- minütigen Inkubation bei 30°C wurde eine cPIP- Synthase Aktivität von 180 pMol/Ansatz (entspricht: 3537 cpm/Ansatz) gemessen (linker Kegel). Nach einer Inkubationsdauer von 30 Minuten lag die cPIP- Synthase Aktivität bei 221 pMol/Ansatz (entspricht:4332 cpm/Ansatz) (rechter Kegel). Die Testansätze enthielten jeweils 100 µL Leberhomogenat.

3.1.5 Zusammenfassung der Messergebnisse

Die cPIP- Synthase konnte in allen hier getesteten Spezies, dem Schwein, Rind, Mensch und Ratte nachgewiesen werden. Die höchste cPIP- Synthase Aktivität wurde in den Leberhomogenaten (ca. 2300-4300 cpm/Ansatz) gemessen, wobei im Homogenat der Rattenleber die höchste cPIP- Synthase Aktivität gefunden wurde. In den verschiedenen menschlichen Zelllinien war die Aktivität meist gering, sie lag bei

durchschnittlich 400 cpm/Ansatz. Die cPIP- Synthase Aktivität lag bei getesteten Thrombozyten unterhalb der Nachweisgrenze. Die Rinderblasenepithelzellen zeigen eine geringe cPIP- Synthase Aktivität, auch im Vergleich mit den Schweineblasenepithelzellen. Längere Inkubationszeiten des Testansatzes zeigen, dass die Zeitabhängigkeit in allen gemessenen Zelltypen nicht linear ist. Naheliegender Grund dafür liegt in der Verwendung von Homogenaten, da bei Einsatz von reinen Zellpartikeln - wie im Falle der Rattenleber - durchaus bis zum Verbrauch der Substrate der cPIP- Synthase eine Linearität zu sehen ist.

3.2 cPIP- Synthase Nachweis in verschiedenen Organen der Ratte

3.2.1 cPIP- Synthase in der Leber

Bisherige Ergebnisse zeigten, dass in der Leber der Ratte die höchste cPIP- Synthase Aktivität zu finden ist. Um die cPIP- Synthase Aktivität in anderen Organen und Geweben zu bestimmen, wurden verschiedene Organhomogenate hergestellt und getestet.

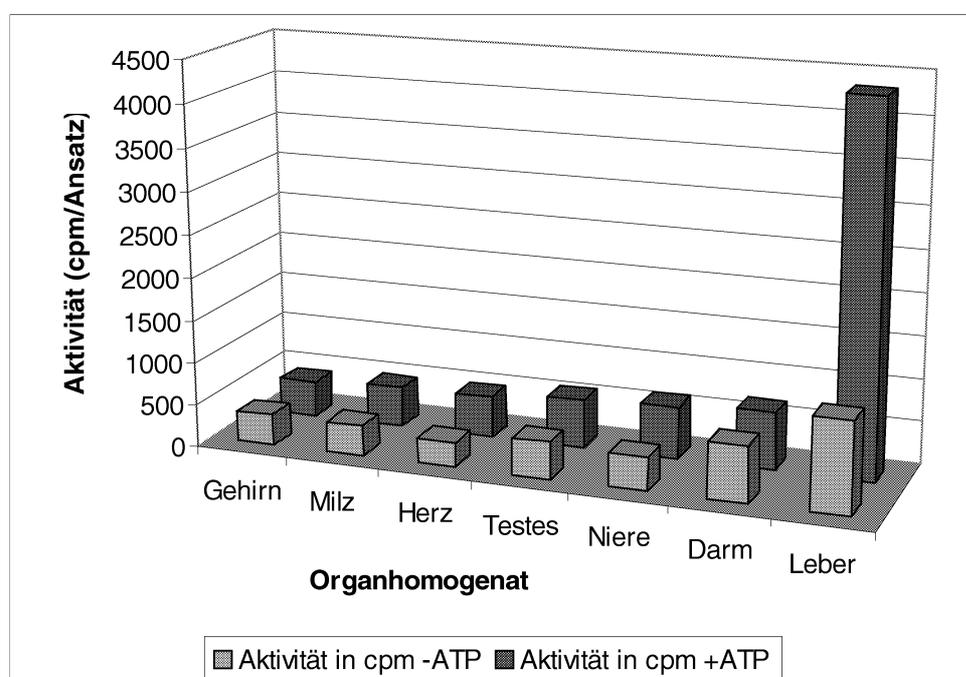


Abb.10: Die cPIP- Synthase Aktivität in verschiedenen Organhomogenaten.

Dargestellt sind Homogenate des Darms, der Milz, der Niere, des Gehirns, des Herzens, der Testes und der Leber. In den vorderen Blöcken ist die cPIP- Synthase Aktivität ohne 13,3 mM ATP im Testansatz, in den hinteren Blöcken mit 13,3 mM ATP im Testansatz aufgetragen. Bei allen gestesteten Organhomogenaten ist eine Steigerung der cPIP- Synthase Aktivität zu verzeichnen, wenn ATP dem Test zugesetzt wurde. Die Aktivitätssteigerung ist in den einzelnen Organen jedoch sehr unterschiedlich, im Falle des Herzens liegt sie bei 65%, beim Darm beträgt sie nur 3%. Die mit Abstand höchste Aktivität der cPIP- Synthase findet man in der Leber, auch die cPIP- Synthase Aktivitätssteigerung ist hier um ein Vielfaches höher als in den anderen Organen.

Wie in Abbildung 10 zu sehen ist, wurden Homogenate aus Gehirn, Milz, Herz, Testes, Niere, Darm und Leber auf cPIP- Synthase Aktivität getestet. Dabei wurde so verfahren, dass die in Stickstoff eingefrorenen Organe gemörsert und in

Homogenisationspuffer aufgenommen wurden. Als wesentliche Neuerung wurde die cPIP- Synthase Aktivität durchwegs in An- und Abwesenheit von ATP gemessen. Anhand der Grafik ist zu erkennen, dass die Leber das Organ mit der höchsten cPIP- Synthase Aktivität ist.

Die Enzym- Aktivität ist in Anwesenheit von ATP etwa vierfach höher (zur Rolle des ATPs siehe weiter unten). Auch in den anderen Organen wurde in Anwesenheit von ATP durchwegs eine höhere Synthase- Aktivität gemessen, auch wenn in diesen Organen der ATP- Effekt nicht so ausgeprägt wie in der Leber nachweisbar war.

3.2.2 cPIP- Synthase im Muskel

Die Bestimmung der cPIP- Synthase Aktivität im basalen Skelettmuskel (M. gastrocnemius) wurde mit subzellulären Partikeln ausgeführt. Die Präparation nach der Literatur ist im Methodenteil beschrieben.

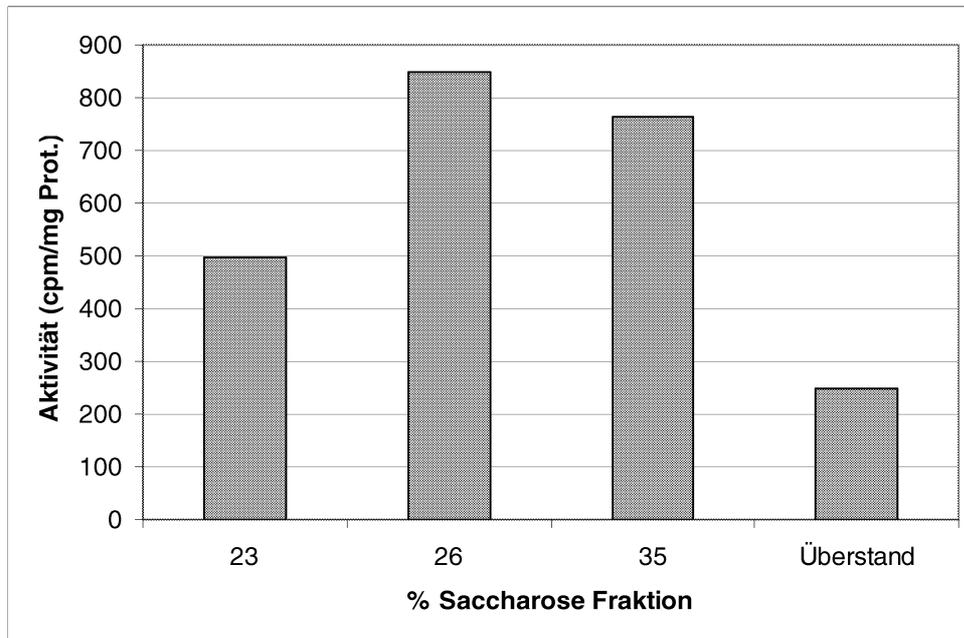


Abb.11: Die cPIP- Synthase Aktivität im basalen Skelettmuskel (M. gastrocnemius) der Ratte.

Das Skelettmuskelhomogenat wurde auf einen Saccharose- Dichtegradienten aufgetragen, zentrifugiert, verschiedene Dichte- Fraktionen gesammelt und deren cPIP- Synthase Aktivität bestimmt. Die aktive cPIP- Synthase findet sich zum größten Teil in den Fraktionen mit 26% und 35% Saccharosegehalt, ca. 800cpm/mg Protein. Die Inkubationszeit des Testansatzes bei 30°C betrug 30 Minuten.

Die bei verschiedener Dichte erhaltenen Partikel wurden auf ihre cPIP- Synthase Aktivität untersucht (Abb.11). Es wurden durchwegs sehr niedrige Aktivitäten gemessen, wobei die Partikel, die bei einer Dichte von 26 bis 35 % Saccharose isoliert wurden noch die höchsten Aktivitäten zeigten.

3.2.3 cPIP- Synthase in Herz-Zellen

Plasmamembranen und mikrosomale Partikel von Kardiomyozyten wurden nach Literatur hergestellt und deren cPIP- Synthase Aktivität gemessen. Die Präparation dieser Partikelfractionen wurde mit insulinstimulierten Rattenherzen und zur Kontrolle mit unstimulierten Rattenherzen ausgeführt.

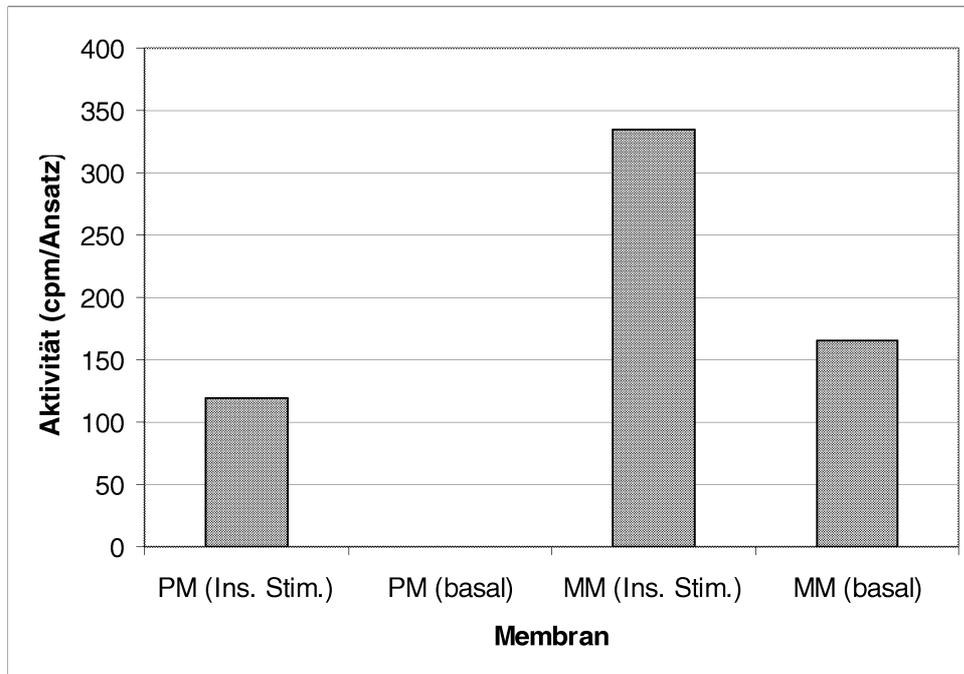


Abb.12: Die cPIP- Synthase Aktivität in der Plasmamembran (PM) und in der mikrosomalen Membran (MM) von Kardiomyozyten der Ratte.

Die Abbildung zeigt die Plasmamembran (PM) und die Mikrosomale Membran (MM) von a) unstimulierten Kardiomyozyten (basal) und von b) mit Insulin vorstimulierten Kardiomyozyten (Ins. Stim.) und die in ihnen gemessene cPIP- Synthase Aktivität. Der Proteingehalt ist in allen Fraktionen gleich groß. Es fällt auf, dass die mit Insulin vorstimulierten Kardiomyozytenfraktionen eine höhere cPIP- Synthase Aktivität aufweisen als die Basalwerte. In der basalen, das heißt nicht stimulierten Plasmamembran, liegt die cPIP- Synthase Aktivität unter der Nachweisgrenze.

Wie schon in der Leber gefunden, kann auch im Herzen die cPIP- Synthase durch Stimulierung des Herzen mit Insulin in eine verhältnismäßig stabile aktive Form gebracht werden (Abb.12). Ebenso ist zu sehen, dass in den Mikrosomenfraktionen eine etwa 3-fach höhere cPIP- Synthase Aktivität nachweisbar ist als in der Plasmamembranfraktion.

3.3 Subzelluläre Lokalisation der cPIP- Synthase / cPIP- Synthase Vorkommen in unterschiedlichen Kompartimenten der Leberzellen

3.3.1 Verteilung der cPIP- Synthase in verschiedenen Fraktionen

Das weitere Interesse galt der genauen subzellulären Lokalisation des Enzyms in der Leber. Dahinter stand der Gedanke, dass eine genauere Zuordnung der cPIP- Synthase zu einem Kompartiment der Zelle ermöglicht eine weitere Aufreinigung und genauere Charakterisierung der Enzymregulierbarkeit.

Um die subzelluläre Verteilung der cPIP- Synthase zu untersuchen, wurden zunächst verschiedene Präparationsmethoden, nach Neville (Neville, 1985), nach Wasner (Wasner, 1975), nach Pilgis (Pilgis & Johnson, 1974), nach Hubbard (Hubbard & Ma, 1970), nach Jarett (Jarett & McKeel, 2000) und nach DeDuve (DeDuve, 1964) getestet.

Dabei kristallisierte sich die Präparationsmethode von DeDuve als die schnellste und effektivste Aufarbeitung der Leber heraus. Bei dieser Methode wird unter isotonischen Bedingungen mit Hilfe von Saccharose und Tris/HCl- Puffer gearbeitet und die Aufarbeitungszeit beträgt ca. eine Stunde. Mit der Präparation nach Jarett, die im Vergleich zur Präparation nach DeDuve wesentlich langwieriger ist (Dauer ca. sechs Stunden), wurden jedoch die reinsten cPIP- Synthase Fraktionen gewonnen. Das liegt zum größten Teil daran, dass die Präparation von DeDuve mehr auf die Gewinnung von Lysosomen abzielt, wohingegen bei der Präparation von Jarett die Gewinnung eines mikrosomalen Pellets im Vordergrund steht. Es Abbildung 13 zeigt, dass die mikrosomale Fraktion der Leberzellen mindestens 90% des Gesamtvorkommens der cPIP- Synthase enthält.

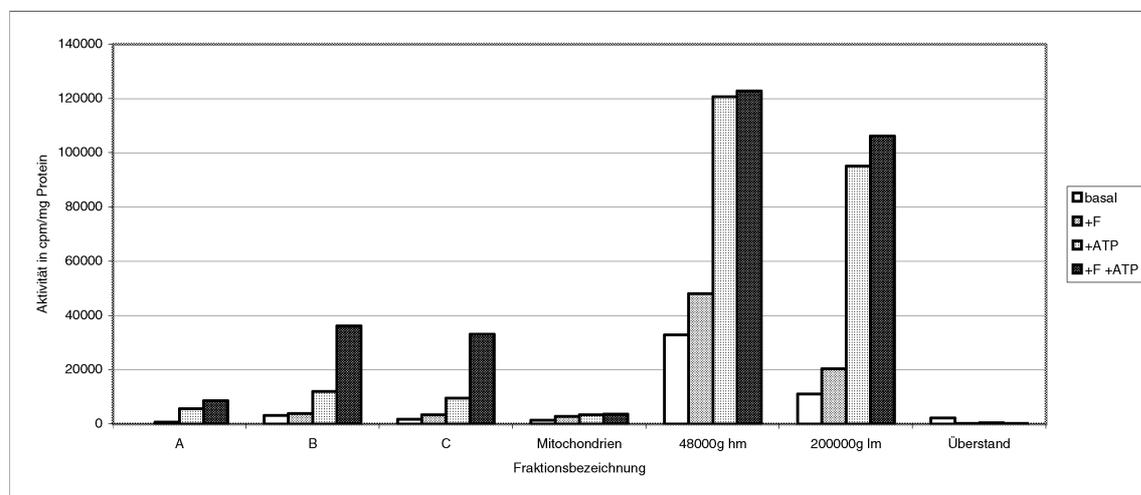


Abb.13: Die cPIP- Synthase Aktivität in einzelnen Fraktionen unter verschiedenen Versuchsbedingungen.

Die Leber wurde 5 Minuten mit 10^{-7} M Insulin stimuliert, anschließend homogenisiert und fraktioniert. Die größte cPIP- Synthase Aktivität in den ‚high density‘ Mikrosomen (48.000g, hm) und in der ‚low density‘ Mikrosomenfraktion (200.000g, lm). Fast keine cPIP- Synthase Aktivität ist in der Mitochondrienfraktion und dem Überstand zu finden. Die Plasmamembranfraktionen A, B und C zeigen, dass mit längerer Zentrifugationsdauer die cPIP- Synthase im Pellet angereichert werden kann. Die cPIP- Synthase Aktivität wurde unter verschiedenen Versuchsbedingungen getestet (siehe Legende), nähere Erläuterungen im Text.

Die Abbildung 13 zeigt die cPIP- Synthase Aktivität verschiedener Zellfraktionen; dabei wurden jeweils vier cPIP- Biosynthese-Tests unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Zum einen ein Basaltest, d. h. dem Testansatz wurde weder ATP (13,3mM) noch Fluorid (13,3mM) zugefügt. Die anderen drei Testansätze enthielten entweder ATP (+ATP) oder Fluorid (+F) oder beides (+ATP+F). Es konnte gezeigt werden, dass in der mikrosomalen Fraktion der Fluorideffekt (+F) bei ca. 30% liegt. Hier wird alleine durch Zusatz von ATP (13,3mM) eine mehr als 100%ige Aktivitätssteigerung erreicht. Anders verhält es sich in den getesteten Plasmamembranfraktionen; wird hier nur Fluorid zugegeben, führt dieses zu einer Aktivitätssteigerung von ca. 20%-30% über dem Basalwert, wird nur ATP (13,3mM) zugesetzt, liegt die Aktivitätssteigerung bei 300% über dem Basalwert, der maximale Effekt wird durch den Zusatz von ATP (13,3mM) und Fluorid (13,3mM) erreicht. Insgesamt sind die Enzymaktivitäten in diesen Fraktionen wesentlich geringer als in

den mikrosomalen Fraktionen. Dieser Sachverhalt könnte durch die größeren Verunreinigungen mit ATPasen in den Plasmamembranfraktionen erklärt werden, die den ATP- Effekt verhindern und dadurch die Phosphorylierung der cPIP- Synthase verhindern. Fluorid hemmt bekanntlich die ATPasen, jedoch reicht hier möglicherweise das zugegebene Fluorid nicht aus, um einen 100%igen ATP- Effekt zu erreichen.

3.3.2 cPIP- Synthase und die Leitenzymverteilung in Plasmamembran- und Mikrosomenfraktion

Um genauere Aussagen zur cPIP- Synthase Verteilung in den verschiedenen Fraktionen machen zu können, wurden Leitenzymbestimmungen in den Zellfraktionen durchgeführt. Dabei interessierten vor allem die Plasmamembranfraktion und die mikrosomale Fraktion, denn in diesen wurde cPIP- Synthase Aktivität gemessen. Als Leitenzym für die Plasmamembran wurde die 5'-Nukleotidase bestimmt und als Leitenzym für die Mikrosomen wurde die Glukose-6-phosphatase als Marker- Enzym gemessen. Mithilfe dieser beiden Leitenzyme konnten Aussagen zur Reinheit bzw. Zusammensetzung der erhaltenen Fraktionen gemacht werden.

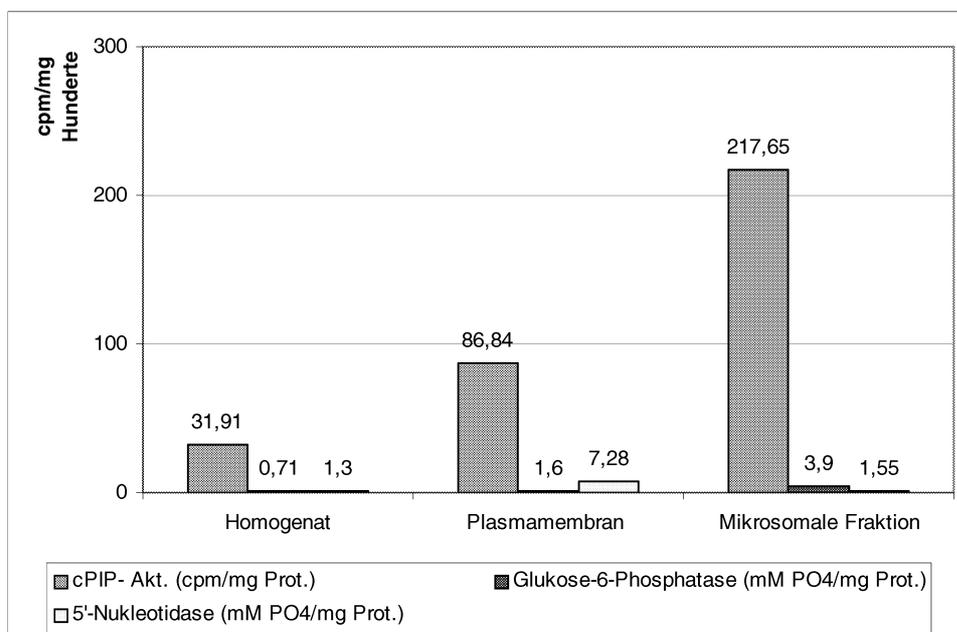


Abb.14: Verteilung von cPIP- Synthase, 5'-Nukleotidase und Glukose-6-phosphatase in Homogenat, Plasmamembranfraktion und Mikrosomenfraktion von Rattenleber

Aufgetragen sind die Aktivitäten der cPIP- Synthase, der 5'-Nukleotidase und der Glukose-6-phosphatase in den jeweiligen Fraktionen, dem Gesamthomogenat, der Plasmamembranfraktion und der mikrosomalen Fraktion. Dieser Versuch steht exemplarisch für n=6.

Abbildung 14 zeigt, dass die cPIP- Synthase Aktivität in der mikrosomalen Fraktion am größten ist, ebenso wurde in dieser Fraktion die höchste Aktivität der Glukose-6-phosphatase verglichen mit der Plasmamembranfraktion und dem Gesamthomogenat gemessen. Zum anderen konnte in der mikrosomalen Fraktion neben Glukose-6-phosphat auch 5'-Nukleotidase nachgewiesen werden. Die höchste Aktivität der 5'-Nukleotidase wurde in der Plasmamembranfraktion gemessen, sie war um den Faktor 5 größer als in der mikrosomalen Fraktion. Die Plasmamembranfraktion enthält neben der 5'-Nukleotidase auch aktive Glukose-6-phosphatase, ist also mit Mikrosomen verunreinigt. Eine vollständige Auftrennung der Zellfraktionen und damit der Markerenzyme war mit keiner Präparationsmethode möglich.

3.3.3 Das cPIP- Synthase Elutionsprofil in der Plasmamembran- und der Mikrosomenfraktion

Um weitere Unterschiede zwischen der Plasmamembranfraktion und der mikrosomalen Fraktion und deren cPIP- Synthase Gehalt zu finden, wurden beide Fraktionen unter identischen Bedingungen über HR300 chromatographisch aufgetrennt.

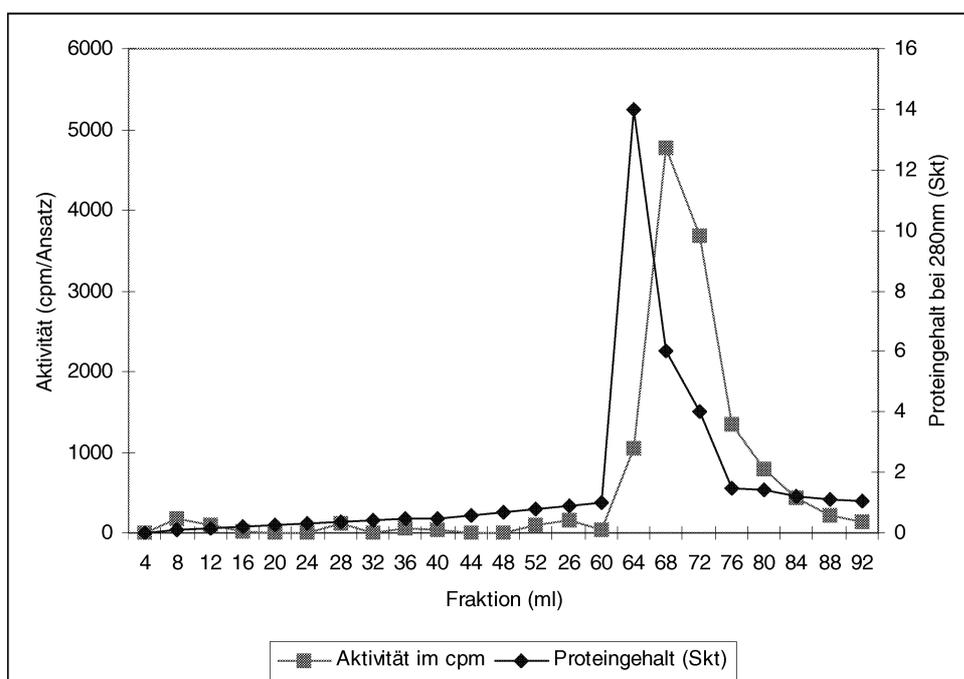


Abb.15: Die cPIP- Synthase Aktivität der solubilierten Mikrosomenfraktion.

Die Gelfiltration erfolgte über HR300. Die cPIP- Synthase Aktivität sowie der Proteinkonzentration der einzelnen Fraktionen wurden bestimmt. Es ist zu erkennen, dass die cPIP- Synthase in der Mikrosomenfraktion im Bereich 64ml bis 80ml eluiert.

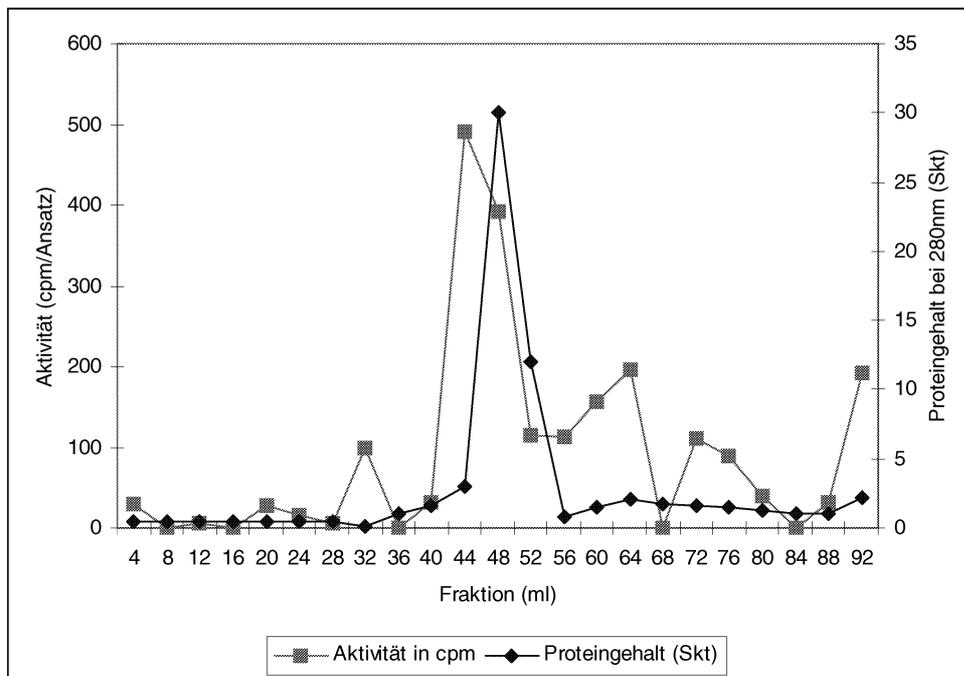


Abb.16: Die cPIP- Synthase Aktivität der solubilisierten Plasmamembran.

Die Gelfiltration erfolgte über HR300. Es wurden die cPIP- Synthase sowie der Proteingehalt der einzelnen Fraktionen bestimmt. Es ist zu erkennen, dass die cPIP- Synthase in der Plasmamembranfraktion im 40 ml bis 52 ml und um 64 ml eluiert.

Vergleicht man Abbildung 15 und Abbildung 16 kann man feststellen, dass die cPIP- Synthase in der Mikrosomenfraktion (Abb.14) in einen Peak eluiert, während in der Plasmamembranfraktion (Abb.15) ein Hauptpeak um 44 ml und ein kleinerer Peak um 64ml zu erkennen sind. Die Unterschiede lassen sich zum einen durch den verschiedenen Reinheitsgrad der jeweiligen Fraktion erklären, da die Mikrosomenfraktion aufgrund der längeren und differenzierteren Auftrennung während der Präparation aus den Leberzellen wesentlich reiner ist als die Plasmamembranfraktion, diese enthält gröbere Partikel. Zum anderen können die verschiedenen Eluationsprofile auch auf einer unterschiedlichen Solubilisierung beruhen. Das würde jedoch voraussetzen, dass die Plasmamembran anders solubilisiert als die mikrosomale Membran. In der Plasmamembranfraktion eluiert nämlich der größte Teil der cPIP- Synthase im Bereich von 48 ml, das würde bedeuten, dass hier größere Fragmente als in der mikrosomalen Fraktion vorhanden

sind. Durch eine intensivere Solubilisierung könnten kleinere Micellen entstehen, die dann im Bereich von 64 ml eluieren, wie dass bei der mikrosomalen Fraktion der Fall ist und zum Teil bei der Plasmamembranfraktion.

3.4 Untersuchungen zur Aktivierung der cPIP- Synthase durch ATP

Wie schon unter 3.3 erwähnt, sollte nach genauerer subzellulärer Lokalisation die Regulierbarkeit der cPIP- Synthase genauer untersucht werden. Das vorherige Kapitel konnte zeigen, dass die cPIP- Synthase fast ausschließlich in den Mikrosomen zu finden ist, und dass das Enzym um ein Vielfaches aktiver ist, wenn ATP zugesetzt wurde. Nun galt es, diese Interaktion näher zu untersuchen.

3.4.1 Einfluss von ATP auf die cPIP- Synthase Aktivität

In Vorversuche war die cPIP- Synthase mit ATP- Zusatz um ein Vielfaches aktiver als ohne ATP- Zusatz (siehe auch Abb.13). Dieser Effekt wurde nochmals mit Plasmamembran- und Mikrosomenfraktion wiederholt. Die Stimulierbarkeit der cPIP- Synthase durch ATP war schon bekannt, jetzt galt es die cPIP- Synthase Aktivität der Plasmamembranfraktion im direkten Vergleich zur mikrosomalen Fraktion durch ATP Zusatz zu ermitteln.

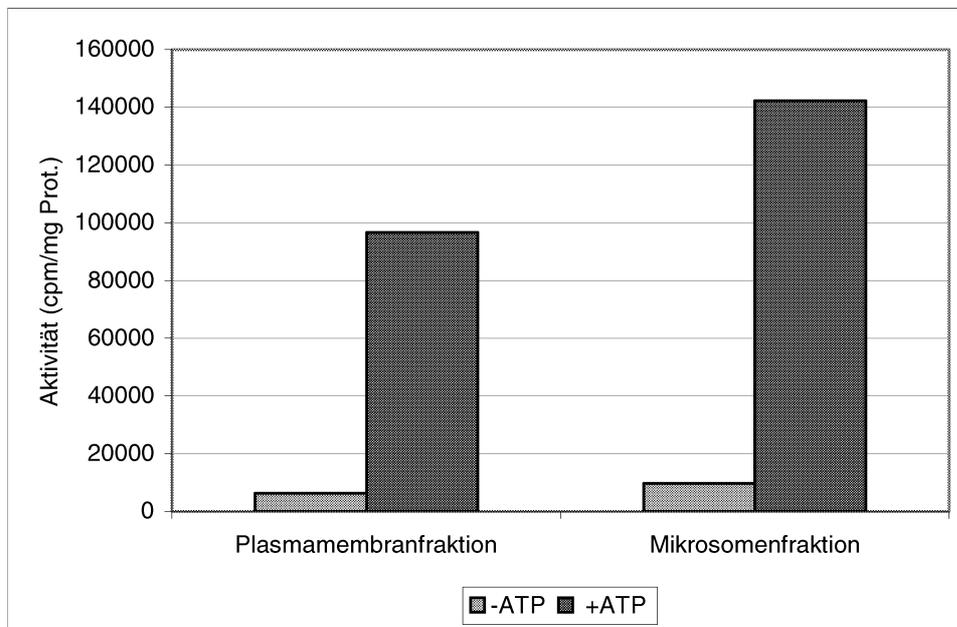


Abb.17: cPIP- Synthase Aktivität in Plasmamembran- und Mikrosomenfraktion mit und ohne ATP

Dargestellt sind die cPIP- Synthase Aktivitäten in Plasmamembran- und in mikrosomaler Fraktion in An- bzw. Abwesenheit von ATP. Der linke blaue Balken zeigt die Basalaktivität der cPIP- Synthase und der rechte rote Balken die cPIP- Synthase Aktivität, die erreicht wird, wenn 13,3 mM ATP zugesetzt wird.

Wie Abbildung 17 zeigt, ist die cPIP- Synthase Aktivität in der Mikrosomenfraktion ein Drittel größer als in der Plasmamembranfraktion und das gilt sowohl für die Basalaktivität als auch für die cPIP- Synthase Aktivität mit ATP- Zusatz. In der Plasmamembran konnte durch ATP- Zusatz eine 6-fache Steigerung und in der Mikrosomenfraktion sogar eine 7-fache Aktivitätssteigerung erreicht werden.

Auffällig war, dass sich die cPIP- Synthase Aktivität nach erfolgter Gelfiltration der Fraktionen nicht mehr um ein 6- bis 7-faches durch ATP- Zusatz steigern ließ, sondern maximal zweifach. In den gelfiltrierten Fraktionen war die cPIP- Synthase wesentlich geringer aktiv als in den nicht solubilisierten Fraktionen, den Mikrosomen- und Plasmamembranfraktionen (Aeydi, 2002).

Weiter interessierte die Frage, ob das ATP assoziiert oder fest gebunden an die cPIP- Synthase vorliegt. Es sollte festgestellt werden, wie lange der Schritt der ATP-Bindung dauert; hierzu wurde eine Zeitkinetik mit radioaktiv-markiertem ATP erstellt.

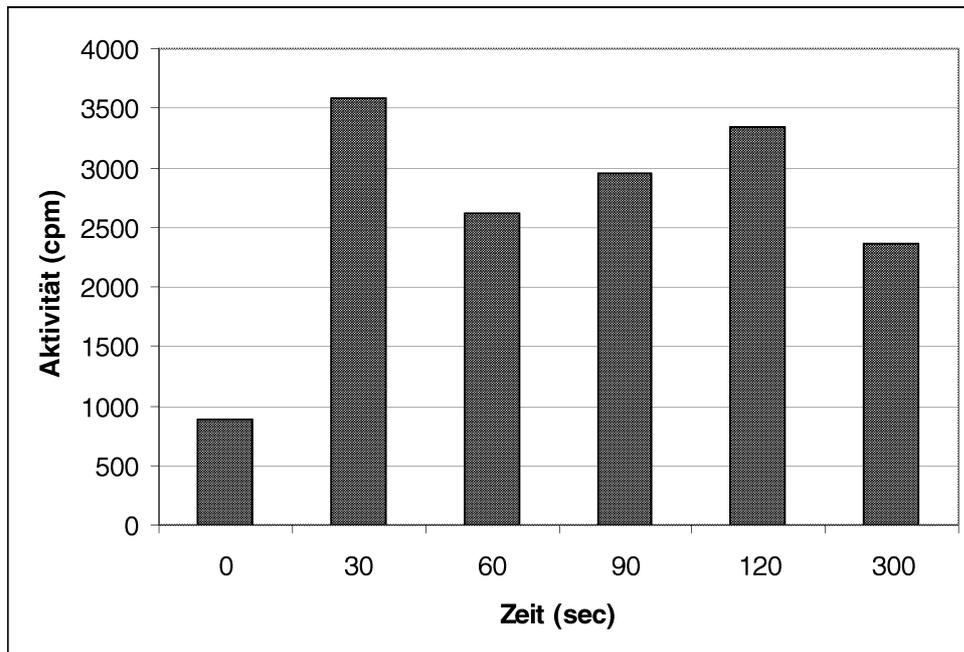


Abb.18: Die Phosphorylierung der Plasmamembranfraktion mit radioaktiv-markiertem ATP (10.000fach verdünnt).

Die Inkubationstemperatur betrug 30°C, die Proteine wurden nach der Inkubationszeit mit dem radioaktiv markierten ATP mit TCA (10%) gefällt, zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet mit Kalilauge resuspendiert und dieser Waschschrift zweimal wiederholt. Anschließend wurde der Radioaktivitätsgehalt im β -Counter gemessen. Man kann erkennen, dass nach 30 Sekunden die Phosphorylierung der cPIP- Synthase unter diesen Bedingungen abgeschlossen ist.

Die Abbildung 18 zeigt, dass die Phosphorylierung der cPIP- Synthase- haltigen Membranfraktion innerhalb der ersten Millisekunden beginnt und nach 120 Sekunden abgeschlossen ist. Zum Zeitpunkt Null ist das ATP wahrscheinlich nur assoziiert und später dann kovalent gebunden. Vorversuche haben gezeigt, dass die cPIP- Synthase Aktivität zwei Minuten nach Zugabe von ATP linear ansteigt (Abb.19).

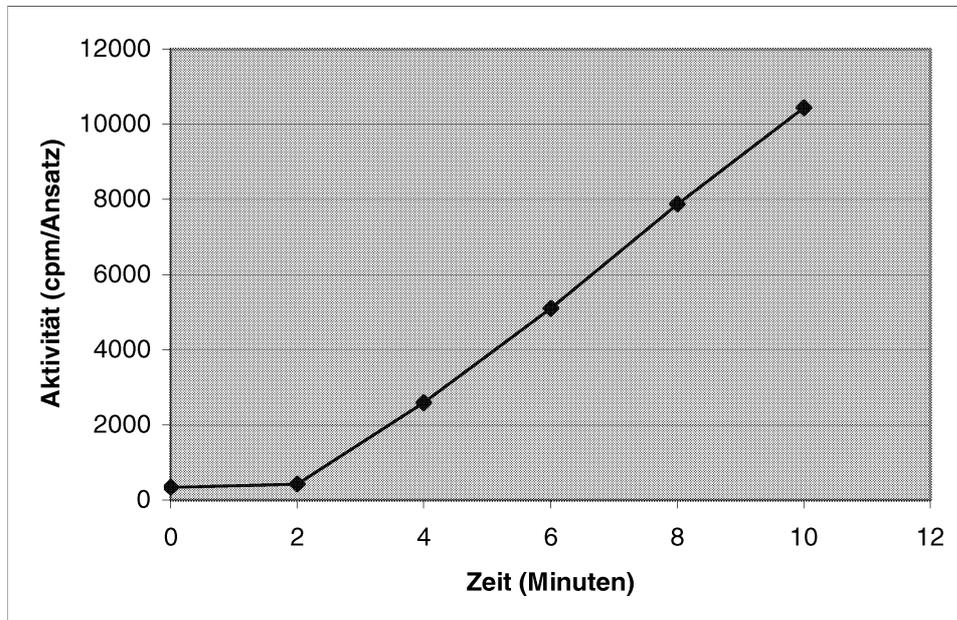


Abb.19: Zeitkinetik der cPIP- Synthase Aktivität nach ATP-Zusatz.

Der cPIP- Synthase-haltigen Plasmamembranfraktion wurde ATP (13,3mM) zum Zeitpunkt 0 Minuten zugesetzt und der Testansatz bei 30°C unterschiedlich lang inkubiert. Anschließend wurde die Aktivität der cPIP- Synthase bestimmt. (n=6)

3.4.2 ³²P-Phosphorylierung der cPIP- Synthase-haltigen Fraktionen

Nachdem die Ergebnisse der subzellulären Verteilung der cPIP- Synthase vorlagen, die zeigten, dass die cPIP- Synthase hauptsächlich in der mikrosomalen Fraktion vorkommt, wurden alle weiteren Versuche mit der mikrosomalen Fraktion durchgeführt.

Um genauere Aussagen zur Phosphorylierung der cPIP- Synthase machen zu können, wurde die cPIP-Synthase haltige Fraktion mit radioaktiv- markiertem ³²P-ATP vorinkubiert, gefiltert und die gewonnenen Fraktionen näher untersucht.

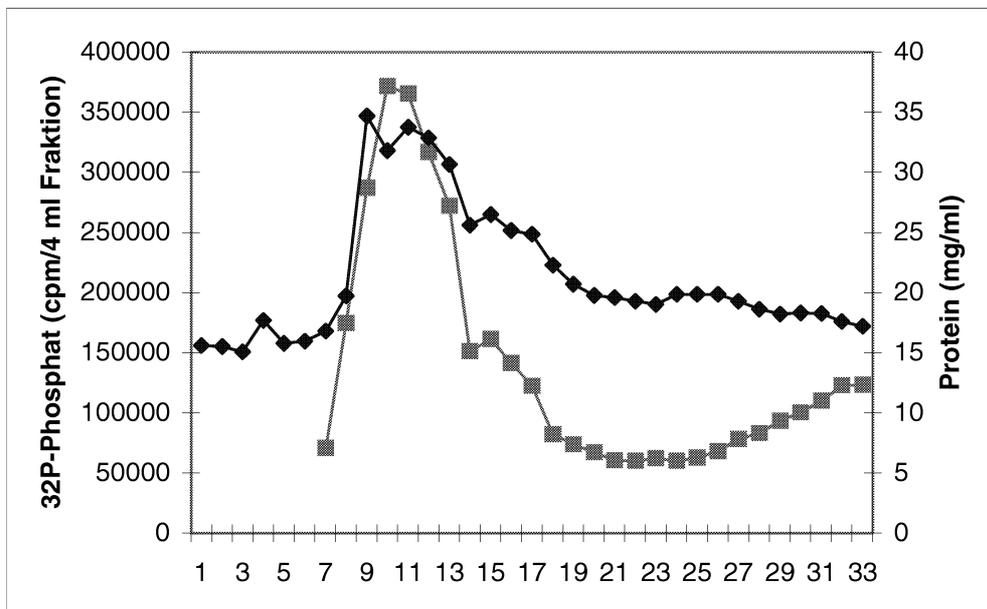


Abb.20: ³²P- Phosphorylierung der cPIP- Synthase-haltigen Fraktionen.

Die Kurve mit den Rauten zeigt den Proteingehalt der einzelnen Fraktionen (4ml Fraktionen) nach der Gelfiltration der solubilisierten mikrosomalen Fraktion. Die Kurve mit den Quadraten zeigt das Elutionsprofil des radioaktiv- markierten Proteins, welches, wie im unteren Bild (abb.21) zu sehen, mit dem Elutionsprofil der cPIP- Synthase übereinstimmt.

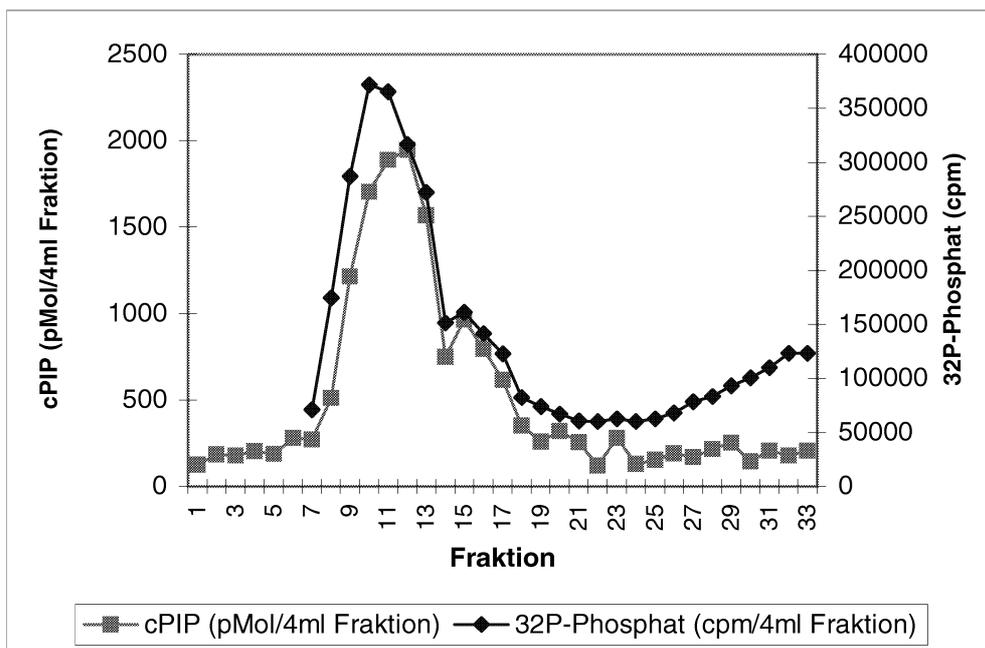


Abb.21: cPIP- Synthase Aktivität und ³²P- Phosphorylierung in den einzelnen Fraktionen.

Dargestellt ist die cPIP- Synthase Aktivität der einzelnen Fraktionen (4ml Fraktionen) und die gemessene Phosphorylierung der Fraktionen.

Abbildung 20 und Abbildung 21 zeigen, dass in den Fraktionen mit hoher cPIP- Synthase Aktivität auch der Grad der Phosphorylierung sehr groß ist.

Die Fraktionen mit höchster cPIP- Synthase Aktivität und höchster Phosphorylierungsrate wurden anschließend weiter über ein SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und das erhaltene SDS- Gel auf einer Röntgenfilm für 3 Tage exponiert.

Es wurde eine Bande im Bereich von ca. 200 bis 300 kDa sichtbar, jedoch kann keine genauere Aussage über diese Bande gemacht werden, da kein radioaktiver Marker mit Referenzproteinen verfügbar war.

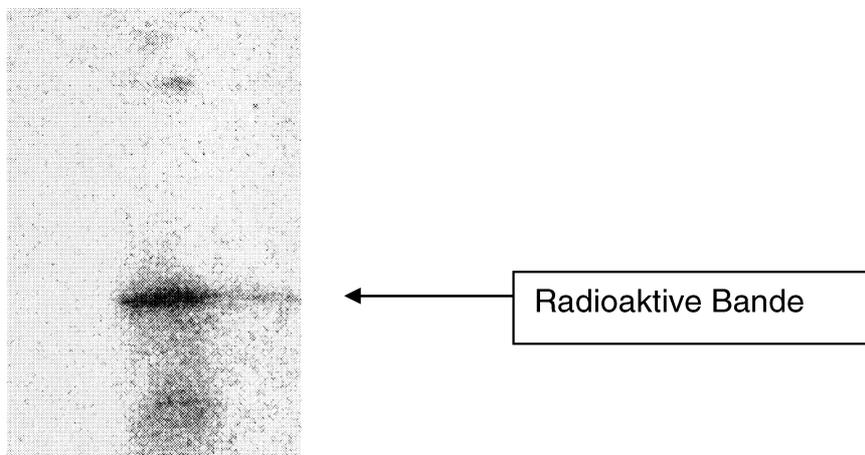


Abb.22: ^{32}P -Phosphat haltige radioaktive SDS-Gel Bande aus der cPIP- Synthase-haltigen Fraktion (9-11).

Dargestellt ist ein Ausschnitt des Röntgenfilms, auf dem die radioaktiv markierte Bande zu sehen ist. Der Größenbereich dieser Bande liegt etwa zwischen 200 und 300 kDa; die Größenabschätzung erfolgte mittels Augenmass und dem direkten Vergleich mit dem Gel, da kein radioaktiv markierter Größenstandard verfügbar war.

3.4.3 ^{33}P -Phosphorylierung der cPIP- Synthase-haltigen Fraktionen

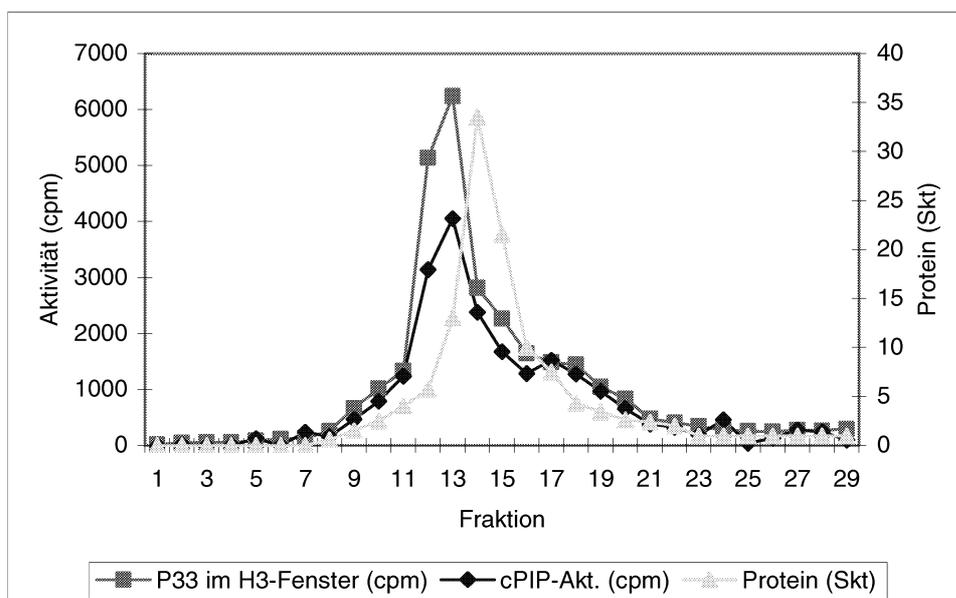


Abb.23: ^{33}P - Phosphorylierung der cPIP- Synthase (analog zu dem ATP32- Versuch) aus der mikrosomaler Fraktion.

Die mikrosomale Fraktion wurde solubilisiert, mit radioaktiv markiertem ATP33 inkubiert und anschließend säulenchromatografisch gereinigt. In den gewonnenen Fraktionen (4ml Fraktionen) wurde der Proteingehalt (Dreiecke), das ^{33}P -ATP (Quadrate) und die cPIP- Synthase Aktivität (Rauten) bestimmt. Es ist zu erkennen, dass die cPIP- Synthase Aktivität genau in dem Bereich zu finden ist wo auch radioaktiv markiertes P33 nachgewiesen werden kann. Der Hauptteil des Gesamtproteins eluiert erst nach der cPIP- Synthase.

Die mikrosomale Fraktion wurde analog zu dem ^{32}P - Phosphorylierungsversuch mit ^{33}P -ATP inkubiert (Abb.23), die Ergebnisse waren reproduzierbar, jedoch war die Strahlung zu gering, um eine Schwärzung des Röntgenfilms zu verursachen.

Eine detailliertere Aussage zur Phosphorylierung der cPIP- Synthase konnte mit der ^{32}P - oder ^{33}P - Phosphat- Phosphorylierung unter diesen Bedingungen nicht gemacht werden. ^{33}P -Phosphat wurde eingesetzt, da ^{32}P -Phosphat zum einen nicht mehr zur Verfügung stand und zum anderen die Freigrenze für ^{33}P um 10^3 Bq höher liegt. Die Ergebnisse sind jedoch vergleichbar, da beides β -Strahler sind.

3.5 Antikörperbindung an die cPIP- Synthase-haltigen Fraktionen

Vorversuche hatten gezeigt (Wasner, 1997; Amini, 1997) zeigten, dass sich cPIP-Synthase mit an Protein-A-Sepharose gekoppelte Anti-P-Tyr Antikörpern und Anti-IRS-1 Antikörpern fällen ließ. Das führte zu der Überlegung, dass cPIP- Synthase eng gekoppelt oder identisch mit dem Insulin-Rezeptor-Substrat-1 (oder IRS-2) sein könnte, da diese Insulin-Rezeptor-Substrate tyrosinphosphoryliert werden und ebenfalls in der mikrosomalen Fraktion vorkommen.

3.5.1 Anti-IRS-1 und Anti-IRS-2 Antikörperbindung

Die bei der Gelfiltration gewonnenen cPIP- Synthase-haltigen Fraktionen wurden mittels Vakuumdestillation eingeeengt und SDS- gelchromatographisch aufgetrennt. Anschließend wurde mittels Western-Blot auf Anti-IRS-1 Antikörpern und Anti-IRS-2 Antikörpern (Kaninchen) detektiert. Das Signal von Anti-IRS-2 Antikörper war sehr schwach. Bei der Detektion von Anti-IRS-1 Antikörpern (α -IRS-1/K6B aus Leiden, Niederlande) war ein deutliches Signal zu erkennen wie Abbildung 24 zeigt.

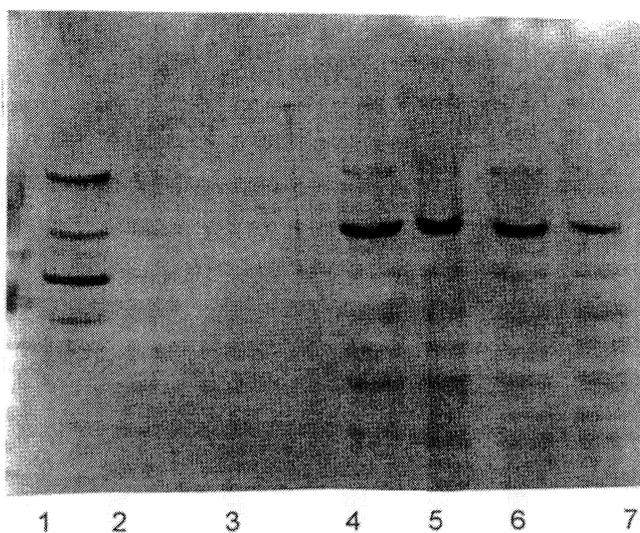


Abb.24: Detektion von Anti-IRS-1 Antikörpern in den cPIP- haltigen Fraktionen.
Aufgetragen sind auf Spur1: 10 kDa-Größenmarker, Spur 2 und 3: Nichts und Spur 4 bis 7: cPIP-haltige Fraktion.

Das Anti-IRS-1 Signal ist im Größenbereich der cPIP- Synthase (ca. 200 kDa) zu finden. Jedoch können in einem eindimensionalen SDS- Gel meist mehrere Proteine übereinanderliegen, sodass eine eindeutige Zuordnung der Antikörperbindung an die cPIP- Synthase nicht gemacht werden kann. Es kann jedoch festgestellt werden, dass in den cPIP- Synthase-haltigen Fraktionen auch Insulin-Rezeptor-Substrat-1 nachgewiesen wurde.

3.6 Interaktionen der cPIP- Synthase mit IRS- Fusionsproteinen

Ein anderer Versuchsansatz mit IRS- Fusionsproteinen wurde zu Klärung der Beziehung der cPIP- Synthase mit den Insulin-Rezeptor-Substraten durchgeführt. Die verschiedenen Fusionsproteine wurden von Prof. Dr. Müller-Wieland zur Verfügung gestellt. Es wurden vier verschiedene IRS-1 Fusionsproteine (verschiedene Polypeptid-Ketten: 177AS, 261AS, 197AS, 195AS) entsprechend dem Labor-Protokoll (Müller-Wieland) mit der cPIP- Synthase-haltigen Fraktion inkubiert. Die Tabellen 2 und 3 zeigen die Ergebnisse.

Tab.2: Pull-Down-Test mit cPIP- Synthase-haltiger Fraktion.

Probe	Aktivität (cpm/Ansatz)	µg Prot./Ansatz	cpm/mg Prot.	Gesamtaktivität	%
S1	735	45,4	16189		16,7
W1	813	43,6	18647	96741	19,3
Ü1	3640	58,8	61905		64
S2	634	45,4	13965		13,6
W2	848	45,4	18678	102384	18,2
Ü2	4045	58	69741		68,2
S3	705	44,9	15702		15,1
W3	866	42,2	20521	104293	19,6
Ü3	3914	57,5	68070		65,3
S4	633	40,7	15553		15,8
W4	790	43,8	18037	98477	18,3
Ü4	3718	57,3	64887		65,9
K5	531	45,4	11696		11,7
K5	798	41,7	19137	99726	19,2
K5	3796	55,1	68893		69,1

Aufgetragen sind in der ersten Spalte die jeweiligen Probenbezeichnungen (S= Sediment, W= Waschlösung, Ü= Überstand, K= Kontrolle), in der zweiten Spalte die Aktivität der cPIP- Synthase in cpm/Testansatz, in der dritten Spalte stehen der Proteingehalt des Testansatzes, in der vierten Spalte steht die cPIP- Synthase Aktivität gemessen in cpm/mg Protein, in der fünften Spalte ist die Gesamtaktivität aufgetragen, mit der man anschließend die unterschiedlichen Testansätze eichen kann und die daraus berechneten Werte sind in der sechsten Spalte prozentual aufgetragen.

Tab.3: Spezifische Aktivitätssteigerung durch unterschiedlich große Fusionsproteine.

Probe	spezifische Aktivitätssteigerung (%)	Länge des IRS-1 Fragmentes (AS)
S1	5	177
S2	1,9	261
S3	3,4	197
S4	4,1	195

In der ersten Spalte sind die Probenbezeichnungen für die jeweiligen Fusionsproteine (S1 bis S4) aufgetragen, in der zweiten Spalte steht die spezifische Aktivitätssteigerung (ausgedrückt in Prozent) und in der dritten Spalte wird die Größe des Fusionsproteins (in Aminosäuren) angegeben.

Tabelle 3 zeigt einen Trend bei den hier getesteten Fusionsproteinen, je kürzer die Aminosäure-Sequenz des Fusionsproteins, umso größer ist dessen spezifische Aktivität. Dieser Schluss ist jedoch nicht zwingend, es könnte auch unabhängig von

der Größe der Fusionsproteine sein, vielleicht enthält das kürzeste Fusionsprotein nur zufällig mehr Bindungsanteile.

Versuche mit IRS-2 Fusionsproteinen wurden ebenfalls durchgeführt. Die IRS-2 Fusionsproteine wurden von Prof. Müller-Wieland zur Verfügung gestellt. Das Versuchsprotokoll wurde von der Arbeitsgruppe Prof. Eckel übernommen (2.2.20). Es wurden verschiedene Fusionsproteine des IRS-2 Proteins getestet, zwei C-terminale, eines aus der mittleren Domäne und ein N-terminales. Zusätzlich waren die Fusionsproteine einmal phosphoryliert und einmal unphosphoryliert.

Tab.4: Inkubation von IRS-2 Fusionsproteinen und cPIP- Synthase-haltiger Fraktion

Fusionsprotein	Aktivität (cpm) im Sediment	Aktivität (cpm) im Überstand
IRS-2 C1 phosph.	1051	1704
IRS-2 C2 phosph.	1161	1507
IRS-2 MD phosph.	754	1361
IRS-2 N2 phosph.	1510	1436
IRS-2 C1	104	1819
IRS-2 C2	0	1596
IRS-2 MD	0	1916
IRS-2 N2	6	1721
MD	615	1394
421	820	1178
510	665	1175
540	722	1723

In der ersten Spalte der Tabelle stehen die Bezeichnungen der Fusionsproteine, in der zweiten Spalte sind die cPIP- Synthase Aktivitäten des gewonnenen Sediments und in der dritten Spalte die Aktivitäten der cPIP- Synthase-haltigen Waschlösung (Kontrolle) aufgeführt. Die IRS-2 Fusionsproteine sind einmal phosphoryliert und einmal unphosphoryliert zusammen mit cPIP- Synthase-haltiger Fraktion inkubiert worden, dabei enthielt der Testansatz jeweils 30µL Sepharose, 10µL Fusionsprotein, 50µL cPIP- Synthase-haltige Fraktion und 200µL TBS-Puffer. Nach einer Inkubation von 2 Stunden wurde das Pellet abzentrifugiert, gewaschen und die cPIP- Synthase Aktivität in den jeweiligen Fraktionen bestimmt. In den Sedimenten mit unphosphorylierten IRS-2 Fusionsproteinen war keine cPIP-Synthase Aktivität zu finden.

Tabelle 4 zeigt die cPIP- Synthase Aktivitäten in den jeweiligen Protein-A-Sepharose Pellets und den Überständen nach Inkubation verschiedener IRS-2 Fusionsproteinen mit cPIP- Synthase-haltiger Fraktion. Die Überstandfraktionen dienen hierbei als

Kontrollen. In den erhaltenen Sedimentfraktionen fällt auf, dass nur die phosphorylierten IRS-2 Fusionsproteine eine cPIP- Synthase Aktivität aufweisen.

3.7 Labeln der cPIP- Synthase mit PGE (trägt Photoaffinitätslabel)

Ziel des Labelns mit radioaktiv-markiertem PGE war es, PGE, ein Substrat der cPIP- Synthase, unlöslich an die cPIP- Synthase zu binden, um es später direkt nachweisen zu können.

Nach der Herstellung eines PGE- Labels aus Prostaglandin E und Diazomalonylchlorid (mit UV-Licht für 2 Minuten belichtet) wurde der gewonnene PGE- Label mit solubilisierter cPIP- Synthase-haltiger Fraktion kurz gemischt und anschließend gelchromatographisch an einer Sephadex G-15 Säule aufgetrennt. Die Gesamt-Radioaktivität des Auftragsvolumen von 2mL betrug 805.120 cpm.

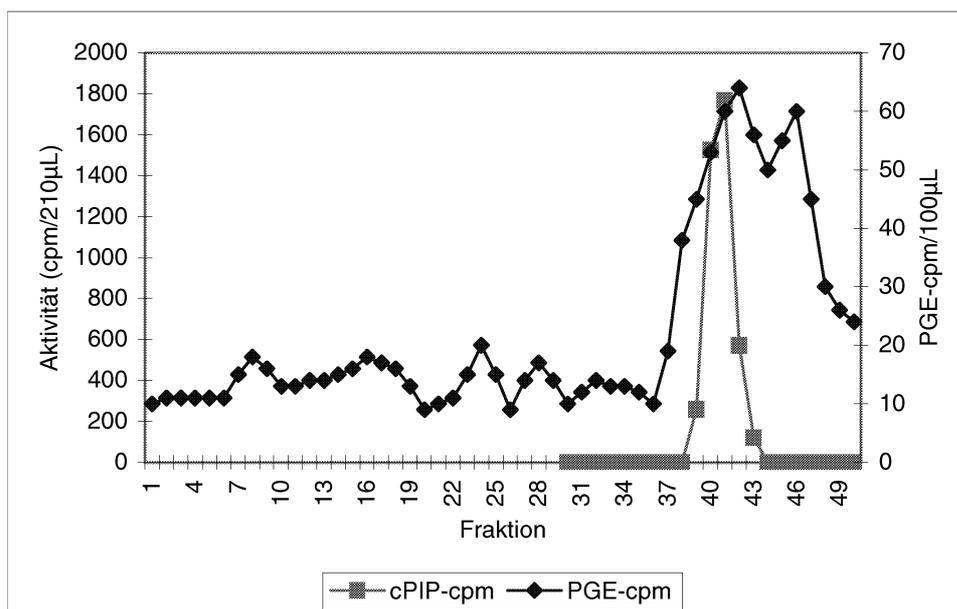


Abb.25: PGE- Labelling der cPIP- Synthase

Die Abbildung zeigt die gelchromatographische Auftrennung (400mL-Säule) der cPIP- Synthase-haltigen Fraktion nach der Inkubation mit dem PGE-Label. Auf der linken Größenachse ist die cPIP- Synthase Aktivität der einzelnen Fraktionen (je 3mL) in cpm/210µL aufgetragen und auf der rechten Größenachse stehen die gemessenen cpm- Werte des radioaktiv-markierten PGEs je 100µL Fraktion.

Die Abbildung 25 zeigt, dass das radioaktiv- markierte PGE auch im Bereich der cPIP- Synthase eluiert, jedoch ist der Peak des PGE wesentlich breiter als der cPIP- Synthase. Möglicherweise ist ein Teil des PGE fest an die cPIP- Synthase gebunden. Daher wurden die Fraktionen 39 bis 43 näher untersucht. Die Fraktionen wurden eingeeengt, SDS- gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend wurde das trockene Gel auf einem Röntgenfilm exponiert. Nach 3, 5 und 10 Tagen war keine Schwärzung des Röntgenfilms zu beobachten. Zusätzlich ist das SDS- Gel mit Coomassie gefärbt worden, die einzelnen Banden (1-2 mm) wurden isoliert, mit Szintillisationsflüssigkeit versetzt und im β -Counter gemessen. Hierbei konnte keine Tritium- Strahlung nachgewiesen werden. Um auszuschließen, dass es an der geringen Probenmenge lag, wurde der komplette Versuch erneut durchgeführt, diesmal mit doppelten Volumina und Radioaktivitäten.

Auch unter diesen Bedingungen war keine Radioaktivität in den SDS- Gelbanden, auf dem Röntgenfilm oder einer BAS Tritium- Platte nachweisbar.

3.8 Labeln der cPIP- Synthase mit PGF (trägt Photoaffinitätslabel)

Ziel dieser Labelversuche war es, die cPIP- Synthase so stark zu markieren, dass man anschließend eine radioaktive Bande im SDS-Gel identifizieren kann, die beweist, dass das radioaktiv-markierte PGE/PGF-Label irreparabel an die cPIP- Synthase gebunden hat. Die radioaktiven Markierungen des PGE bzw. des PGF waren jedoch zu gering, um auf einem Röntgenfilm oder einer Tritium-BAS Platte nachgewiesen werden zu können.

Analog zum Photoaffinitätslabel-Versuch mit PGE wurde die cPIP- Synthase mit PGF markiert. PGF wurde genommen, da frühere Versuche (Leßmann, 1991) einen, wenn

auch geringeren, Umsatz mit der cPIP- Synthese ergaben. Wie Abbildung 26 zeigt, ist kein wesentlicher Unterschied erkennbar.

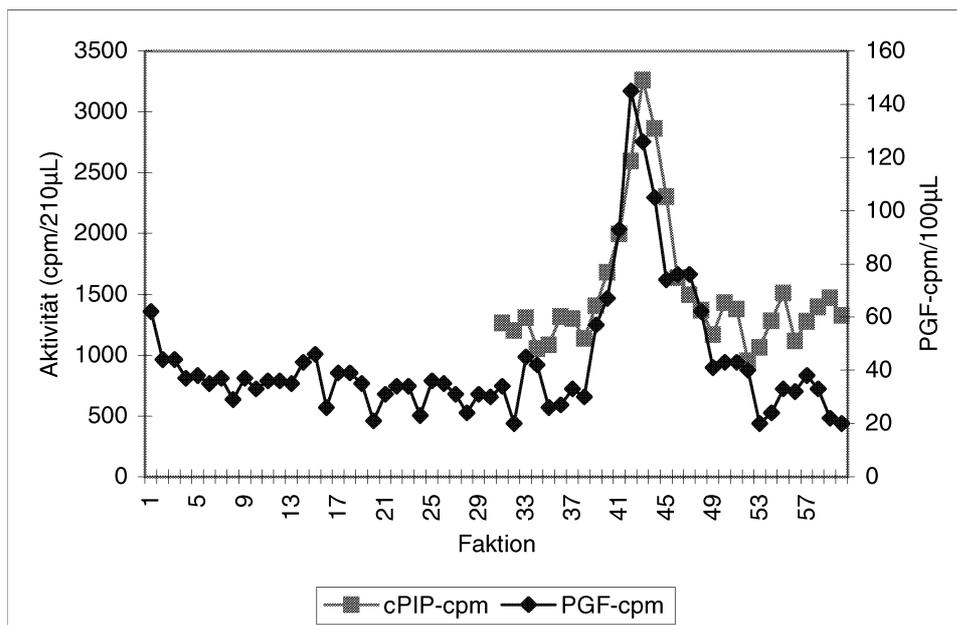


Abb.26: Labelling-Versuch mit cPIP- Synthese-haltiger Fraktion und PGF

Dargestellt ist die cPIP- Synthese Aktivität (Kästchen) in den unterschiedlichen Fraktionen und die radioaktive Strahlung des PGF (Rauten) in den verschiedenen Fraktionen nach gelchromatographischer Auftrennung an einer GF-15 Säule. Man kann erkennen, dass die Peaks fast übereinstimmen.

Bei beiden Labeling- Versuchen, dem PGE- und dem PGF- Versuch, ist eine Übereinstimmung des cPIP- Synthese Peaks mit dem PGE/ PGF Peaks zu beobachten, wobei der Versuch mit dem PGF- Label eine deutlichere Übereinstimmung aufweist.

3.9 Identifizierung der Proteinbanden aus cPIP- Synthase-haltiger Fraktion mittels MALDI-MS

cPIP- Synthase-haltige mikrosomale Fraktion wurde solubilisiert, gefiltert und die aufgereinigten cPIP- Synthase-haltigen Fraktionen wurden aufkonzentriert, wobei drei verschiedene Methoden der Aufkonzentrierung getestet wurden:

- a. die TCA/ Aceton Fällung
- b. die Acetonfällung
- c. das Einengen durch Gefriertrocknen

Wie Abbildung 27 zeigt, bewährte sich hierbei das Einengen durch Lyophilisieren. Hier waren deutliche Banden sichtbar und die Probe hatte einen homogenen Verlauf bei der Gelelektrophorese. Bei der Aufkonzentrierung durch Acetonfällung kommt es zu einer Verzerrung der Banden und bei der Aufkonzentrierung durch TCA/Aceton Fällung ist die Ausbeute an Protein zu gering, die Banden sind im Gel nur schwach zu erkennen.

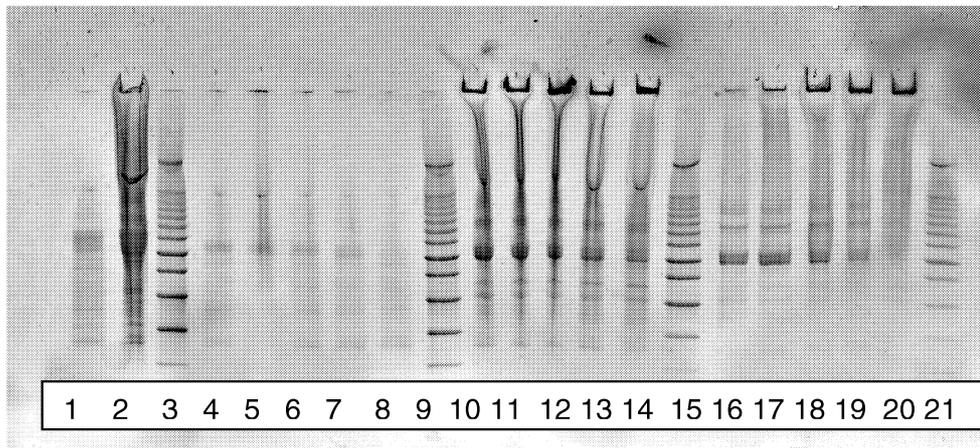


Abb.27: SDS-Gel mit drei verschiedenen Methoden erzielten Konzentraten der gelfiltrierten cPIP-Synthase

Aufgetragen sind: Spur 1: TCA, Spur 2: Aceton, Spur 3: 10kDa-Größenmarker, Spur 4 bis 8 zeigt die Aufkonzentrierung der Fraktionen 39-43 durch TCA/Aceton Fällung, Spur 9: 10kDa-Größenmarker, Spur 10 bis15 zeigt die Aufkonzentrierung der Fraktionen 39-43 durch Acetonfällung, Spur 16: 10kDa-Größenmarker, Spur 17 bis 20 zeigt die Aufkonzentrierung der Fraktionen 39-43 durch Gefriertrocknung und Spur 21: 10kDa-Größenmarker.

Nach diesem Vorversuch zur besten Aufkonzentrierung des Proteingehaltes in einer Fraktion, wurden die cPIP- Synthase-haltige Fraktionen zukünftig nur noch mittels Vakuumdestillation eingeeengt, da hier das beste Ergebnis erzielt wurde.

Abbildung 28 zeigt ein SDS-Gel, auf dem wie oben beschrieben cPIP-Synthase-haltige Fraktionen aufgetrennt wurden. Anschließend wurden die sichtbaren Banden herausgeschnitten und zur weiteren Analyse aufgearbeitet.

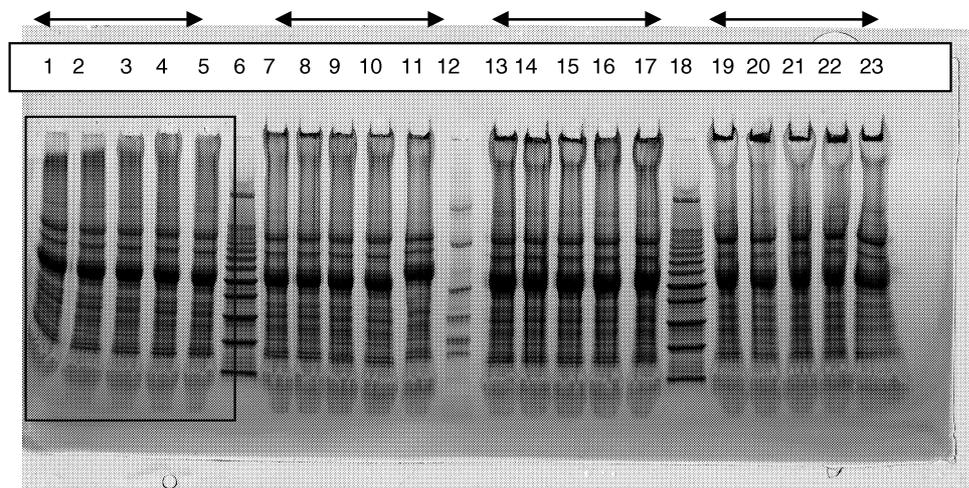


Abb.28: SDS- Gel mit cPIP- Synthase-haltigen Fraktionen.

Das SDS-Gel zeigt die eingeeengten cPIP- Synthase-haltigen Fraktionen 39-43 (jeweils Lane 1-5; 7-11; 13-17; 19-23) nach der gelchromatografischen Auftrennung. Die Abbildung zeigt vier unabhängige Mikrosomenpräparationen. Es wurden jeweils 30 μ L Fraktionslösung aufgetragen. Der umrandete Ausschnitt ist in Abbildung 29 vergrößert dargestellt und zeigt die ausgeschnittenen Gelbanden, die anschließend mittels Maldi-MS bestimmt wurden.

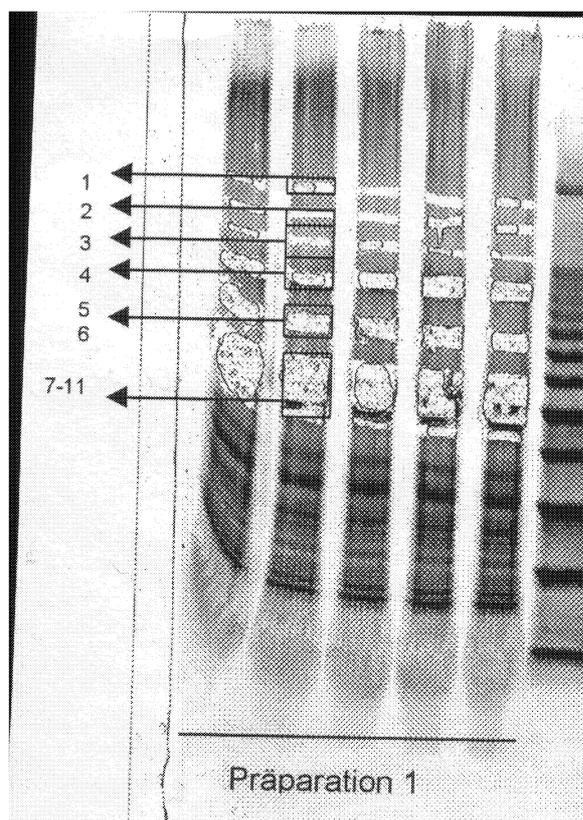


Abb.29: Der vergrößerte Ausschnitt aus Abb.28 zeigt die herausgeschnittenen Proteinbanden.

Die kleinen Kästchen zeigen die Bereich des SDS-Gels, in denen die Proteinbanden herausgeschnitten worden sind. Sie sind mit Zahlen von 1 bis 11 gekennzeichnet; das größere Kästchen 7-11 wurde in mehrere Stücke unterteilt, da hier einige Banden dicht beisammen lagen. Die Banden 1 bis 5 zeigen die eingeeengten Fraktionen 39 bis 43 und die sechste Bande zeigt den 10kDa Standardmarker.

Die Banden der Präparation 1 wurden exemplarisch aus dem Gel ausgeschnitten, wie im Protokoll beschrieben weiterbehandelt und massenspektrometrisch mit MALDI-MS analysiert. Zur anschließenden Proteinidentifizierung wurde das Programm Mascot verwendet. Dieses Programm wurde von Mann (Mann, 1998) und seinen Mitarbeitern von EMBL entwickelt und basiert auf einem Sequenzvergleich der verschiedenen, gewonnenen Peptide und deren Molekulargewicht. Ein Datenbankvergleich der ermittelten Sequenzen zeigt anschließend das Protein, bei dem die meisten Übereinstimmungen zu finden waren. Tabelle 5 zeigt die gefundenen Ergebnisse der Proteinbestimmung der in Abbildung 29 herausgeschnittenen Proteinbanden.

Tab.5: Bandenanalyse mittels Mascot- Programm

Bandebezeichnung	Größe (kDa) der Bande	Bestimmte(s) Protein(e)	Accession Number	Größe des Proteins (M _r)
1	185	Nicht eindeutig identifiziert		
2	165	Carbamoyl-phosphat-synthase (rat)	SYRTCA	165673
3	130	Nicht eindeutig identifiziert		
4	100	Glykogen Phosphorylase (rat)	S22338	97877
5	95	Glykogen Phosphorylase (rat)	S22338	97877
6	75	DnaK- type molecular chaperone precursor (rat)	HHRTGB	72474
7	65	DnaK- type molecular chaperone precursor (rat)	HHRTGB	72474
		Ribophorin I precursor (rat)	A27274	68376
8	59	Protein Disulfid Isomerase ER-60 (rat)	ER60RAT	57044
		RATER60P NID (rat)	BAA09695	57010
9	58	RATUDPGTR NID (rat)	AAA42314	61459
		Glucuronyltransferase precursor (rat)	A40467	61429
10	54	RATCYPC NID	AAA41049	56877
		AB008423 NID	BAA23123	56876
11	45	3 Beta- hydroxy- 5delta-steroid- dehydrogenase (rat)	A37404	42465

Die erste Spalte zeigt die Bezeichnung der in Abb. 29 herausgeschnittenen Proteinbande, in der zweiten ist die Größe in kDa aufgetragen, in der dritten Spalte steht das Protein, welches nach dem Datenbankvergleich die größte Übereinstimmung aufwies. Spalte Vier zeigt die Accession Number und die letzte Spalte das rel. Molekulgewicht des Proteins.

Die Tabelle zeigt, dass die Proteine der Banden 1 und 3 nicht identifiziert werden konnten, sie hatten waren 185 kDa und 130 kDa groß. Identifizierte Proteine in den restlichen Banden waren die Carbamoyl-phosphat- Synthase, Glykogen Phosphorylase, DnaK- type molecular chaperone precursor, Ribophorin I precursor, Protein Disulfid Isomerase ER-60, Glucuronyltransferase precursor und die 3 Beta- Hydroxy- 5delta-steroid- Dehydrogenase. Diese Enzyme bzw. Enzymvorstufen

wurden durch Datenbankvergleiche mit der Aminosäure- und Proteinsequenz der Ratte ermittelt.

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die cPIP- Synthase in verschiedenen Säugetieren nachgewiesen, die subzelluläre Verteilung der cPIP- Synthase in Leberzellen bestimmt und die Aktivierung der cPIP- Synthase durch ATP in verschiedenen Versuchsansätzen näher charakterisiert.

Die von Schaefer (1998) durchgeführten Versuche hatten auf eine mögliche Verwandtschaft der cPIP- Synthase und den Insulin-Rezeptor-Substraten –1 oder –2 hingewiesen, so dass auch diesen Hinweisen nachgegangen wurde. Hierzu wurden Versuche mit IRS-1 und IRS-2 Antikörpern, verschiedenen Fusionsproteinen und Bandenanalysen von cPIP- Synthase- haltiger Fraktion mittels Maldi-MS durchgeführt.

4.1 Nachweis der cPIP- Synthase in verschiedenen Spezies

Nachdem Salge (1987) den Hormonboten cPIP in allen von ihr untersuchten Organen der Ratte nachweisen konnte, zeigte Leßmann (1991) die spezifischen cPIP- Syntheseraten in Homogenaten verschiedener Organe der Ratte, z. B. Leber, Darm, Hoden, Lunge, Niere, Gehirn, Muskel, Milz und Herz.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die cPIP- Synthase ebenfalls in der Leber des Menschen (Abb.5) und des Schweins (Abb.7), sowie in Homogenaten aus Primärkulturen von Rinder- und Schweineblasenepithelzellen (Abb.8) und in Zellkulturen wachsenden HepG2- Zellen, menschlichen Thrombozyten und Zellen aus Stroma, M. Basedow und in einem Insulinom vorkommt. Einzig in Keratinozyten konnte keine cPIP- Synthase Aktivität nachgewiesen werden (Abb.6). Nachdem in früheren Arbeiten der Mediator cPIP auch schon im Regenwurm *Lumbricus terrestris*,

im Darmbakterium *Escherichia coli* (Salge, 1987), in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (Wasner & Salge, 1987), im Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* (Kaiser *et al.*, 1998), im Menschenblut (Salge, 1987) und im Affen (Shashkin *et al.*, 2001) gefunden wurde, weisen weitere Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass der Mediator cPIP ubiquitäre Verbindung ist.

4.2 cPIP- Synthase Verteilung in den verschiedenen Organen der Ratte und subzelluläre cPIP- Synthase Verteilung in den Leberzellen

cPIP- Synthase Aktivität konnte in Homogenaten von Gehirn, Herz, Milz, Testes, Niere, Darm, Muskel und Leber (Abb. 10) nachgewiesen werden, wobei die von Leßmann gemachte Beobachtung bestätigt werden konnte, dass die höchste cPIP- Synthase Aktivität im Leberhomogenat zu finden war. In dieser Arbeit wurde die cPIP- Synthase der Leberzellen genauer lokalisiert, d. h. die subzelluläre Verteilung der cPIP- Synthase in den Leberzellen. Hierzu wurden verschiedene Präparationsmethoden zur Isolierung einzelner Kompartimente (Mikrosomen, Lysosomen, Plasmamembran, Mitochondrien, Zellkerne) herangezogen und auf ihre Effektivität getestet. In den Fraktionen von Mitochondrien und Zellkernen waren die cPIP- Synthase Aktivitäten gering.

Fraktionen, in denen eine hohe cPIP- Synthase Aktivität gefunden wurde, waren die mikrosomalen Fraktionen und wie bereits bekannt die Plasmamembranfraktion. Die Reinheit dieser Fraktionen wurde mit Hilfe der Leitenzyme Glukose-6-phosphatase, einem Mikrosomenmarker, und der 5'- Nukleotidase, einem Plasmamembranmarker, charakterisiert (Abb. 14). Eine 100%ige Trennung von Plasmamembranfraktion und mikrosomaler Fraktion war durch die getesteten Präparationsmethoden nicht möglich, es waren immer Verunreinigungen zu finden.

Zur weiteren Reinigung der cPIP- Synthase aus mikrosomaler und Plasmamembranfraktion wurde eine Gelchromatographie an einer HR300 Säule übernommen (Abb.15, Abb.16). Hier konnte festgestellt werden, dass die cPIP- Synthase in der mikrosomalen Fraktion in einem Peak, in der Plasmamembranfraktion in mehreren Peaks eluiert. Eine Interpretation dieser beiden verschiedenen Elutionsprofile könnte in einer größeren Verunreinigung der Plasmamembranfraktion mit Mikrosomen liegen. Eine weitere Möglichkeit bestände darin, dass durch die Solubilisierung mit einem Detergenz (z. B. Triton X114) einige Komponenten des vorliegenden Komplexes abgetrennt werden. Allerdings beträgt die Detergenzkonzentration in beiden Fraktionen 0,1

Die erzielten Ergebnisse über die subzelluläre Verteilung der cPIP- Synthase weisen darauf hin, dass die cPIP- Synthase zu mindestens 80 Prozent in der mikrosomalen Fraktion vorliegt. Die Plasmamembranfraktion ist höchstwahrscheinlich mit Mikrosomen verunreinigt, so dass hier bisher größere Mengen an cPIP- Synthase gefunden wurde. Möglicherweise gibt es vielleicht auch verschiedene Zustände des Moleküls in der Plasmamembranfraktion und der mikrosomalen Fraktion.

4.3 Die Aktivierung der cPIP- Synthase durch ATP

Die Anwesenheit von ATP, optimale Konzentration um 13,3 mM, führt zu einer erheblichen Stimulierung der cPIP- Synthase (Abb.17). Es wurden 6-7-fache Aktivitätssteigerungen der cPIP- Synthase in der mikrosomalen Fraktion gemessen. Eine solche Stimulierung könnte durch die Phosphorylierung verschiedener Tyrosinreste der cPIP- Synthase zustande gekommen sein. Andere Befunde konnten zeigen, dass die Autophosphorylierung der β - Untereinheit des Insulinrezeptors zu weiteren Phosphorylierungen von Folgeproteinen führt, z. B. IRS-1 oder -2, PI3K

oder SHP2. Durch diese Phosphorylierungen kommt es zu einer gesteigerten Glukoseaufnahme in der Zelle (Campbell *et al.*, 2002). Es wäre möglich, dass bei der cPIP- Synthase derselbe Mechanismus wie bei den anderen Folgeproteinen (IRS-1, IRS-2, PI3K, SHP2), und zwar die Phosphorylierung, zur Steuerung der Aktivität zu Grunde liegt. Phosphorylierungen der cPIP- Synthase-haltigen Fraktionen mit radioaktiv markiertem P_{33} oder P_{32} liefern erste Hinweise auf eine mögliche Bindung des Phosphats an die cPIP- Synthase (Abb.18, 20, 21, 22 und 23). Die Phosphorylierungsreaktion ist nach 120 Sekunden abgeschlossen und nach einer elektrophoretischen Auftrennung erhält man eine radioaktive Bande (Abb. 22) von etwa 200 bis 300 kDa. Das Insulinrezeptor-Substrat-1, ein vom Insulinrezeptor modifiziertes Protein, hat eine ungefähre Größe von 180 kDa (White *et al.*, 1985; Kadowaki *et al.*, 1987; Sun *et al.*, 1991). Das Insulinrezeptor-Substrat-1 wird wie andere zelluläre Insulinrezeptorsubstrate (IRS-2, -3, -4) vom Insulinrezeptor phosphoryliert und dient als Bindeglied zu weiteren Effektormolekülen in der Zelle, z. B. der Phosphoinositol-3-Kinase (Sun *et al.*, 1995; Lavan *et al.*, 1997a; Lavan *et al.*, 1997b). Die cPIP- Synthase weist ebenso wie das Insulinrezeptor-Substrat-1 Tyrosinphosphorylierungen auf (Wasner *et al.*, 1996) und man geht davon aus, dass die Aktivitätssteigerung der cPIP- Synthase in Gegenwart von ATP durch eine Tyrosinphosphorylierung zu erklären ist (Wasner *et al.*, 2000). In diesen Versuchsreihen wurde kein Tyrosinkinase-Hemmer eingesetzt.

Amini (1997) vermutete eine enge Beziehung zwischen dem Insulinrezeptor-Substrat-1 und der cPIP- Synthase, da die cPIP- Synthase nur in Tyrosinphosphorylierter Form aktiv ist und Anti-IRS-1-Antikörper solubilisierte cPIP- Synthase binden und Schaefer (1998) fand bei der Gelfiltration ein vergleichbares Molekulargewicht von dem Insulinrezeptor-Substrat-1 und der cPIP- Synthase. Jedoch gibt es bisher keine Beweise, die den Schluss nahe legen, dass das

Insulinrezeptor-Substrat-1. Die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass ATP kein Cofaktor der cPIP- Synthase ist, sondern vielmehr eine andere Funktion übernimmt, nämlich als Cosubstrat für die Tyrosinkinase.

4.4 Charakterisierung der cPIP- Synthase haltigen Fraktion mittels MALDI-MS

Vorversuche von Wasner konnten zeigen, dass sich die cPIP- Synthase mit an Protein-A-Sepharose gekoppelte Anti-P-Tyr Antikörper und Anti-IRS-1 Antikörper fällen ließ (1997).

Wie in Abb.24 gezeigt, konnte auch in der cPIP- Synthase haltigen Fraktion nach erfolgreicher Reinigung durch Gelfiltration und SDS-Page Gelelektrophorese ein deutliches Signal bei der Anti-IRS-1 Antikörper Detektion (Westernblot) ermittelt werden. Wie schon in vorhergehenden Arbeiten aufgeführt wurde, ist die Beziehung zwischen Insulinrezeptor-Substrat-1 und der cPIP- Synthase immer noch ungeklärt. Genauere Angaben sollte hierzu die Identifizierung der erhaltenen Proteinbanden mittels MALDI- Massenspektrometrie liefern. Die cPIP- Synthase haltigen Fraktion wird auf einem eindimensionalen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Identifizierung erfolgt nach proteolytischer Spaltung der Proteine im Gel durch MALDI-MS-Analyse und anschließender Suche in geeigneten Protein-Datenbanken (Mascot Search). Die identifizierten Proteine zeigten keinen Hinweis auf die Insulin-Rezeptor-Substrate oder die cPIP- Synthase. Jedoch konnte ein Großteil der Proteine nicht näher untersucht werden, da ein Teil der Proteine agglomerierte bzw. im SDS-Gel oben liegen blieb und sich nicht in Banden auftrennen ließ. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die cPIP- Synthase oder die Insulin-Rezeptor-Substrate von

dominierenden Proteinen überdeckt wurden. Hier kann nur eine zweidimensionale Elektrophorese mit MALDI-MS weiterführen.

5 Zusammenfassung

Die zyklische Prostaglandylinositol-Phosphat- Synthase ist ein Enzym, welches in der Rattenleber die höchste Aktivität aufweist. Aus Prostaglandyl E_1 und aktivierten Inositolphosphat (n-IP) bildet die cPIP- Synthase den Hormonboten Prostaglandylinositolcyclophosphat (kurz cPIP), einen cAMP-Antagonisten.

Ziel dieser Arbeit waren Untersuchungen zur Regulation der cPIP- Synthase, insbesondere der Rolle des ATPs im Rahmen der Aktivierung, sowie die Lokalisation der cPIP- Synthase in den Zellen.

Die cPIP- Synthase konnte in der menschlichen Leber (Abb.5) und der Leber des Schweins (Abb.7), sowie in Homogenaten aus Primärkulturen von Rinder- und Schweineblasenepithelzellen (Abb.8) und in Zellkulturen wachsenden HepG2-Zellen, menschlichen Thrombozyten und Zellen aus Stroma, Schilddrüsenzellen aus M. Basedow und in einem Insulinom nachgewiesen werden. Die höchsten Enzymaktivitäten bestehen nach wie vor in der Ratte.

Die subzelluläre Verteilung der cPIP- Synthase in der Rattenleber weist darauf hin, dass die cPIP- Synthase zu mindestens 80 Prozent in der mikrosomalen Fraktion vorliegt.

Die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass ATP kein Cofaktor der cPIP- Synthase ist, sondern vielmehr eine andere Funktion übernimmt, nämlich als Substrat für die Tyrosinkinase. Es wurden 6-7fache Aktivitätssteigerungen der cPIP-

Synthase unter kovalenten Einbau von Phosphat erzielt. Offenbar wird die cPIP-Synthase durch Tyrosinphosphorylierung aktiviert.

Weitere Arbeiten müssen die genauere Lokalisation der cPIP-Synthase, das trafficking und auch die Enzymstruktur klären.

Durch eine bessere Reinigung des Enzyms und Auftrennung in einer zweidimensionalen Elektrophorese gekoppelt mit MALDI-MS können dann auch Aussagen zur Verwandtschaft der cPIP- Synthase mit anderen Enzymfamilien gemacht und dessen Funktion in der Zelle genauer charakterisiert werden.

6 Literaturverzeichnis

Abel, J.J., Geiling, E.M.K., Roullier, C.A., Bell, F.K. and Wintersteiner, O.:

Crystalline insuline (1927)

J. Pharmacol. Exp. Ther., 31, 65-85

Ahn J, Donner DB and Rosen OM.:

Interaction of the human insulin receptor tyrosine kinase from the baculovirus expression system with protein kinase C in a cell-free system ((1993))

J Biol Chem., 268, 7571-6

Alemanly S, Mato JM and Stralfors P.:

Phospho-dephospho-control by insulin is mimicked by a phospho-oligosaccharide in adipocytes (1987)

Nature, 330, 77-9

Amini, H.:

Regulation der Aktivität der Prostaglandylinositol-cyclophosphat-Synthetase, (1997)

Dissertation, Math.-nat. Fakultät, Düsseldorf

Araki, El.,Sun, X-J.,Haag,B.L., Chuang, L.M., Zhang, Y., Yang-Feng, T.L., White, M.F. and Kahn, R.:

Human skeletal muscle insulin receptor substrate: Characterization of the cDNA, gene, and chromosomal localization ((1993))

Diabetes 42, 1041-1054

Backer, J.M., Schroeder, G.G., Kahn, C.R., Myers, M.G., Wilden, P.A., Cahill, D.A. and White, M.:

Insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity maps to insulin receptor regions required for endogenous substrate phosphorylation ((1992))

Am. J. Biol. Chem., 267,1367-74

Baltensperger, K., Lewis, R.E., Woom, C.W., Vissavajjhala, P., Ross, A.H. and Czech, P.:

Catalysis of serine and tyrosine autophosphorylation by the human insulin receptor (1992))

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 7885-7889

Banting, F.G. and Best, C.H.:

The internal secretion of the pancreas (1922)

J. Lab. Klin. Med., 7, 27-34

Banting, F.G., Best, C.H., Collip, J.B. and McLeod, J.J.R.:

Physiological effects of insulin (1922)

Proc. Trans. Roy. Soc. Can., 16, 27-34

Blaicher, Michael und Michael Kastner: Membrane Protein Purification (1993))

Pharmacia Biotech

Brunswick, D.J. and Cooperman, B.S.: Photo-affinity labels for adenosine 3,5-cyclic monophosphate (1971)

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 1801-1804

Castan, I., Wijkander, J., Manganiello, V. and Degerman E.: Mechanisms of inhibition of lipolysis by insulin, vanadate and peroxovanadate in rat adipocytes (1999))

Biochem. J. 339, 281-289

Cheatham B, Vlahos CJ, Cheatham L, Wang L, Blenis J and Kahn CR.:

Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation (1994))

Mol Cell Biol., 14, 4902-11

Cooperman, B.S. and Brunswick, D.J. : The preparation and use of diazomalonyl derivatives of cyclic AMP in isolating and identifying cyclic AMP receptor sites (1974)

Methods Enzymol., 38, 387-398

Cushman, S.W. and Wardzala, L.J.:

Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell. Apparent translocation of intracellular transport systems to the plasma membrane (1980)

J Biol Chem., 255, 4758-4762

Czech, Michael P.: Molecular basis of insulin action (1985)

Plenum Press

Czech MP, Corvera S.

Signaling mechanisms that regulate glucose transport ((1999))

J Biol Chem., 274, 1865-1868

DeDuve, C.:

From cytochromes to lysosomes (1964)

Fed. Proc., 23, 1045-1049

Denton RM, Midgley PJ, Rutter GA, Thomas AP and McCormack JG:

Studies into the mechanism whereby insulin activates pyruvate dehydrogenase complex in adipose tissue ((1989))

Ann N Y Acad Sci., 573, 285-96

Diezel, W., Kopperschlager, G. and Hofmann, E.:

An improved procedure for protein staining in polyacrylamide gels with a new type of coomassie brilliant blue (1972)

Anal. Biochem., 48, 617-620

Doherty, J.J., Kay, D.G., Lai, W.H., Posner, B.I. and Bergeron, J.J.M.:

Selective degradation of insulin within rat liver endosomes ((1990))

J. Cell Biol., 110, 35-42

Egan JJ, Greenberg AS, Chang MK and Londos C.:

Control of endogenous phosphorylation of the major cAMP-dependent protein kinase substrate in adipocytes by insulin and beta-adrenergic stimulation ((1990))

J Biol Chem. 265, 18769-75

Egan JJ, Saltis J, Wek SA, Simpson IA and Londos C.:

Insulin, oxytocin, and vasopressin stimulate protein kinase C activity in adipocyte plasma membranes ((1990))

Proc Natl Acad Sci U S A, 87, 1052-6

Eyidi, A.:

Untersuchungen zur Aktivität der cPIP- Synthase in verschiedenen Organen viviparer Wirbeltiere ((2002))

Diplomarbeit, Math.-nat. Fakultät, Düsseldorf

Farese RV, Standaert ML, Barnes DE, Davis JS and Pollet RJ.:

Phorbol ester provokes insulin-like effects on glucose transport, amino acid uptake, and pyruvate dehydrogenase activity in BC3H-1 cultured myocytes (1985)

Endocrinology, 116, 2650-5

Farese RV, Davis JS, Barnes DE, Standaert ML, Babischkin JS, Hock R, Rosic NK and Pollet RJ.:

The de novo phospholipid effect of insulin is associated with increases in diacylglycerol, but not inositol phosphates or cytosolic Ca²⁺ (1985)

Biochem J., 231, 269-78

Feener, E.P., Backer, J.M., King, G.L., Wilden, P.A., Sun, X.J., Kahn CR, White MF.:

Insulin stimulates serine and tyrosine phosphorylation in the juxtamembrane region of the insulin receptor ((1993))

J Biol Chem., 268, 11256-64

Fiske, C.H. and Subbarow, Y.:

The colorimetric determination of phosphorus (1925)

J. Biol. Chem, LXVI, 375-399

Gottschalk WK and Jarett L:

The insulinomimetic effects of the polar head group of an insulin-sensitive glycopospholipid on pyruvate dehydrogenase in both subcellular and whole cell assays ((1988))

Arch Biochem Biophys., 261, 175-85

Grocki, Kurt: Trends in der elektrophoretischen Aufreinigung von Proteinen ((1996))

CLB Heft 3

Gypakis, A.:

Untersuchungen zur Biosynthese von aktiviertem Inositolphosphat ((1999))

Dissertation, Math.-nat. Fakultät, Düsseldorf

Gypakis, A. and Wasner, H.K.:

Phosphatidylinositol 3-kinase and prostaglandylinositol cyclic phosphate (cyclic PIP), a mediator of insulin action, in the signal transduction of insulin ((2000))

in press

Harada S, Smith RM, Smith JA, White MF and Jarett L.:

Insulin-induced egr-1 and c-fos expression in 32D cells requires insulin receptor, Shc, and mitogen-activated protein kinase, but not insulin receptor substrate-1 and phosphatidylinositol 3-kinase activation ((1996))

J Biol Chem., 271, 30222-6

Heesom, K.J., Harbeck, M., Kahn, C.R. and Denton, R.M.:

Insulin action on metabolism ((1997))

Diabetologia, 40, B3-B9

Heffetz, D., Buchkin, I., Dror, R. and Zick, Y.:

The insulinometric agents H_2O_2 and vanadate stimulate protein tyrosine phosphorylation in intact cells ((1990))

J. Biol. Chem. 265, 2896-2902

Heller-Harrison, R., Morin, M. and Czech, P.:

Insulin regulation of membrane-associated insulin receptor substrate I ((1995))

J. Biol. Chem. 270, 24442-24450

Heidenreich K, Paduschek M, Molders M and Klein HW:

The insulin receptor: a protein kinase with dual specificity? ((1994))

Biol Chem Hoppe Seyler, 375, 99-104

Heukeshoven J. and Dernick, R.:

Improved silver staining procedure in phast system development unit I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels ((1988))

Electrophoresis, 9, 28-32

Heusch, R. and Kopp, F.:

Structures in mixtures of p-tert-Octylphenol polyoxyethylene and water. 1. Triton X-114^R (1987)

Ber. Bunsenges. Phys. Chem., 91, 806-811

Holmann, G.D. and Kasuga, M.:

From receptor to transporter: insulin signaling to glucose transport ((1997))

Diabetologia 40, 991-1003

Hubbard, A.L., Wall, D.A. and Ma, A.:

Isolation of rat hepatocyte plasma membranes (1983)

J. Cell Biol., 96, 217-229

Hubbard, M.J. and Cohen, P.:

On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation ((1993))

Trends Biochem. Sci., 18, 172-177

Husebye, E.S., Letcher, A.J., Lander, D.J. and Flatmark, T.:

Purification and kinetic properties of a membrane-bound phosphatidylinositol kinase of the bovine adrenal medulla ((1990))

Biochim. Biophys. Acta. 1042, 330-337

Inoue, G., Cheatham, B., Emkey, R. and Kahn, C.R. :

Dynamics of insulin signaling in 3T3-L1 Adipocytes ((1998))

JBC, 273, 11548-11555

Jaffe, B.M., Behrmann, H.R. and Parker, C.W.:

Radioimmunoassay measurement of prostaglandine E, A and F in human plasma (1973)

J. Clin. Invest., 52, 398-405

James, D.E. and Piper, R.C.:

Insulin resistance, diabetes, and the insulin-regulated trafficking of GLUT-4 ((1994))

J Cell Biol., 126, 1123-1126

Jorgensen, P. L.:

Purification of Na⁺,K⁺-ATPase: enzyme sources, preparative problems, and preparation from mamalian kidney ((1988))

Methods in Enzymology, 156, 29-43

Kahn, C. R.:

Causes of insulin resistance ((1995))

Nature, 373, 384-385

Kahn, C. R.:

Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes ((1994))

Diabetes 43, 1066-1084

Kaiser, A.M., Wasner, H.K. and Spindler, K.D.:

Synthesis and action of the cyclic AMP antagonist, prostaglandylinositol cyclic phosphate (cyclic PIP), in *Dictyostelium discoideum* ((1998))

Biol. Chem. 379, 727-730

Karnieli, E., Zarnowski, M.J., Hissin, P.J., Simpson, I.A., Salans, L.B. and Cushman, S.W.:

Insulin-stimulated translocation of glucose transport systems in the isolated rat adipose cell. Time course, reversal, insulin concentration dependency, and relationship to glucose transport activity (1981)

J Biol Chem., 256, 4772-4777

Kasuga, M., Fujita-Yamaguchi, Y., Blithe, D.L., White, M.F. and Kahn, C.R.:

Characterization of the insulin receptor kinase purified from human placental membranes (1983)

J Biol Chem., 258, 10973-10980

Kassner, A., Leßmann, M. and Wasner, H.K.:

Degradation of the cyclic AMP antagonist prostaglandylinositol phosphate (cyclic PIP) by dephosphorylation ((1999))

Biol. Chem. 380, 85-88

Kelly KL, Mato JM and Jarett L.:

The polar head group of a novel insulin-sensitive glycopospholipid mimics insulin action on phospholipid methyltransferase (1986)

FEBS Lett., 209, 238-42

Kelly KL, Mato JM, Merida I and Jarett L.:

Glucose transport and antilipolysis are differentially regulated by the polar head group of an insulin-sensitive glycopospholipid (1987)

Proc Natl Acad Sci U S A, 84, 6404-7

Khan, M.N., Baquiran, G., Brule, C., Burgess, J., Foster, B., Bergeron, J.J. and Posener B.I.:

Internalization and activation of rat liver insulin receptor kinase in vivo ((1989))

JBC, 264, 12931-12940

Kincses, M.:

Biosynthes von aktiviertem Inositolphosphat ((2002))

Dissertation, Math.-nat. Fakultät, Düsseldorf

Kohanski, R.A.:

Insulin receptor autophosphorylation. II. Determination of autophosphorylation sites by chemical sequence analysis and identification of the juxtamembrane sites ((1993))

Biochemistry, 32, 5773-80

Kopp, F., Meyer, H. and Reinauer, H.: Insulin receptor protein rendered visible in Triton X-114^R Membranes (1985)

Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 366, 695-698

Kopp, F., Meyer, H.E., Reinauer, H. and Heusch, R.:

Elektronenoptische Darstellung hydrophober Membranproteine in einem lamellaren Polyglykoetherhydrat des Triton X-114^R (1986)

Tenside Detergents. 23, 119-124

Kramer, W.:

New approaches to the treatment of diabetes ((1998))

Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes 107, 52-61

Kuehn, L., Meyer, H. Rutschmann, M. and Thamm, P.:

Identification of photoaffinity labeled insulin receptor proteins by linear polyacrylamide gradient gel electrophoresis under non- denaturing conditions (1980)

FEBS Letters 113, 189-192

Larner J, Huang LC, Tang G, Suzuki S, Schwartz CF, Romero G, Roulidis Z, Zeller K, Shen TY and Oswald AS:

Insulin mediators: structure and formation (1988)
Cold Spring Harb Symp Quant Biol., 53, 965-71

Larner, J.:

Four questions times two: a dialogue on the mechanism of insulin action dedicated to Earl W. Sutherland (1975)
Metabolism, 24, 249-56

Lawrence, J.R.:

Shared diabetic care (1992)
Br. J. Hosp. Med., 48, 34-37

Lee, Y.H. Harada, S., Smith, R.M., Friedman, R. and Jarett, L.: The expression of and insulin binding to cellular thyroid hormone binding protein, but not insulin degrading enzyme, is increased during 3T3-L1 adipocytes differentiation (1996)

Biochem. Biophys. Res. Com., 222, 839-843

Lehr, S., Kotzka, J., Herkner, A., Klein, E., Siethoff, C., Knebel, B., Noelle, V., Bruning, J.C., Klein, H.W., Meyer, H.E., Krone, W. and Müller-Wieland, D.: Identification of tyrosine phosphorylation sites in human gab-1 protein by EGF receptor kinase in vitro (1999)

Biochem. 38, 151-159

Leßmann, M.:

Zur ‚in vitro‘ Biosynthese des cAMP-Antagonisten Prostaglandylinositol-cyclophosphat (cPIP) (1991)

Dissertation, Math.-nat. Fakultät, Düsseldorf

Lewis RE, Cao L, Perregaux D and Czech MP.:

Threonine 1336 of the human insulin receptor is a major target for phosphorylation by protein kinase C (1990)

Biochemistry, 29, 1807-13

Liu F and Roth RA.:

Identification of serines-1035/1037 in the kinase domain of the insulin receptor as protein kinase C alpha mediated phosphorylation sites (1994)

FEBS Lett., 352, 389-92

Low MG and Saltiel AR.:

Structural and functional roles of glycosyl-phosphatidylinositol in membranes (1988)

Science, 239, 268-75

Mackintosh, J.A., Choi, H.Y., Bae, S.H., Veal, D.A., Bell, P.J., Ferrari, B.C., Van Dyk, D.D., Verrills, N.M., Paik, Y.K. and Karuso, P.:

A fluorescent natural product for ultra sensitive detection of proteins in one-dimensional and two-dimensional gel electrophoresis (1972)

Proteomics, 3, 2273-2288

Mato JM, Kelly KL, Abler A and Jarett L.:

Identification of a novel insulin-sensitive glycopospholipid from H35 hepatoma cells (1987)

J Biol Chem., 262, 2131-7

McKeel, D. and Jarett, L.: Preparation characterization of a plasma membrane fraction from isolated fat cells (1970)

J. Cell. Biol., 44, 417-432

Majerus, Philip W.:

Inositol phosphate biochemistry (1992)

Annu. Rev. Biochem. 61, 225-250

Mann, M.:

Mass spectrometry resurrects protein-based approaches in functional genomics (2000)

Novartis Found. Symp., 229, 27-29

Myers Jr, M.G., Sun, X.J. and White, M.F.:

The IRS-1 signaling system (1994)

Trends Biochem Sci., 19, 289-93

Neville Jr., D.M.: Isolation of an organ specific protein antigen from cell- surface membrane of rat liver (1968)

Biochemica et Biophysica Acta, 154, 540-552

O'Brien R.M. and Granner, D.K.:

Regulation of gene expression by insulin (1991)

Biochem. J., 278, 609-619

Ogawa W, Matozaki T and Kasuga M.:

Role of binding proteins to IRS-1 in insulin signalling (1998)

Mol Cell Biochem., 182, 13-22

Ohmichi, M., Pang, L., Ribon, V., Gazit, A., Levitzki, A. and Saltiel, A.R.:

The tyrosine kinase inhibitor tyrphostin blocks the cellular actions of nerve growth factor (1993)

Biochem. 32, 4650-4658

Okada T, Kawano Y, Sakakibara T, Hazeki O and Ui M.:

Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin-induced glucose transport and antilipolysis in rat adipocytes. Studies with a selective inhibitor wortmannin (1994)

J Biol Chem., 269, 3568-73

Pessin, J.E., Thurmond, D.C., Elmendorf, J.S., Coker, K.J. and Okada, S.
Molecular basis of insulin-stimulated GLUT4 vesicle trafficking. Location! Location!
Location! (1999)
J Biol Chem., 274, 2593-2596

Pessin, J.E. and Saltiel, A.R.:
Signaling pathway in insulin action: molecular targets of insulin resistance (2000)
J. Clin. Inv., 106, 165-169

Pharmacia Biotech:
GST, Gene fusion system (1997)

Pilkis, S.J. and Johnson, R.A.:
Detergent dispersion of adenylate cyclase from partially purified rat liver plasma
membranes (1974)
Biochim. Biophys. Acta., 341, 388-395

Quon MJ, Butte AJ, Zarnowski MJ, Sesti G, Cushman SW and Taylor SI.:
Insulin receptor substrate 1 mediates the stimulatory effect of insulin on GLUT4
translocation in transfected rat adipose cells, (1994)
J Biol Chem., 269, 27920-4

Rosen, O.M., Herrera, R., Olowe, Y., Petruzzelli, L.M. and Cobb, M.H.:
Phosphorylation activates the insulin receptor tyrosine protein kinase (1983)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 3237-3240

Rothenberg, P.L., Lane, S.W., Karasik, A., Backer, J, White, M. and Kahn, C.R.:
Purification and partial sequence analysis of pp 185, the major cellular substrate of
the insulin receptor tyrosine kinase (1991)
J. Biol.Chem. 266, 8302-8311

Salge, U.:

Untersuchungen zur biologischen Synthese des cAMP-Antagonisten (1987)

Dissertation, Math.-nat. Fakultät, Düsseldorf

Saltiel, A.L., Rose, D.W., Majumdar, M., Decker, S.J. and Olffsky, J.M.:

Insulin receptor substrate-1 is required for insulin-mediated mitogenic signal transduction (1994)

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 797-801

Saltiel AR, Osterman DG and Darnell JC:

Role of glycosyl phosphoinositides in insulin action, (1988)

Cold Spring Harb Symp Quant Biol., 53, 955-63

Saltiel AR and Sorbara-Cazan LR.:

Inositol glycan mimics the action of insulin on glucose utilization in rat adipocytes (1987)

Biochem Biophys Res Commun., 149, 1084-92

Saltiel, A.R. :

Second messengers of insulin action (1990)

Diabetes Care, 13, 244-56.

Saltiel, A.R. and Kahn, C.R.:

Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism (2001)

Nature, 414, 799-806

Schaefer, M.:

Zur Stabilisierung der Aktivität der cPIP- Synthase (1998)

Diplomarbeit, Math.-nat. Fakultät, Düsseldorf

Schirmer, G.:

Hormonelle Langzeitregulation von Glycogengehalt, Gluconeogenese und Glucose-6-Phosphatase in Primärkulturen von Rattenhepatozyten 1983

Dissertation, Math.-nat. Fakultät, Düsseldorf

Siemeister, G., Al-Hasani, H., Klein, H.W., Kellner, S. and Streicher, R.:

Recombinant human insulin receptor substrate-1 protein (1995)

JBC 270, 4870-4874

Shashkin, P.N., Wasner, H.K., Ortmeyer, H.K. and Hansen, B.C.:

Prostaglandylinositol cyclic phosphate (cPIP): a novel second messenger of insulin action. Comparative analysis of two kind of 'insulin mediators' (2001)

Diabetes Metab. Res. Rev., 17, pp273-284

Shashkin, P.N., Meckmongkol, T., Wasner, H.K., Hansen, B.C and Ortmeyer, H.K.:

Prostaglandylinositol cyclic phosphate synthase activity in the liver of insulin-resistant rhesus monkeys before and after a euglycemic hyperinsulinemic clamp (2001)

J. Basic. Clin. Physiol. Pharmacol., 12, 1-18

Simpson, I.A., Yver, D.R., Hissin, P.J., Wardzala, L.J., Karnieli, E., Salans, L.B. and Cushman, S.W.:

Insulin-stimulated translocation of glucose transporters in the isolated rat adipose cells: characterization of subcellular fractions (1983)

Acta Biochim. Biophys., 763, 393-407

Singer, W.D., Brown, H.A. and Sternweis, P.C.:

Regulation of eukaryotic phosphatidylinositol-specific phospholipase C and phospholipase D (1997)

Annu. Rev. Biochem. 66, 475-509

Smith, R.M. and Jarett, L.:

Receptor-mediated endocytosis and intracellular processing of insulin: ultrastructural and biochemical evidence for cell-specific heterogeneity and distinction from nonhormonal ligands (1988)

Lab Invest., 58, 613-629

Smith, R.M., Harada S., Smith J.A., Zhang S. and Jarett L.:

Insulin-induced protein tyrosine phosphorylation cascade and signalling molecules are localized in a calveolin-enriched cell membrane domain (1998)

Cell. Signal., 10, 355-362

Solow, B.T., Harada, S., Goldstein, B.J., Smith, J.A., White, M.F. and Jarett, J.:

Differential modulation of the tyrosine phosphorylation state of the insulin receptor by IRS (insulin receptor subunit) proteins (1999)

Mol. Endo., 13, 1784-1798

Strauss, D.S.:

Growth-stimulatory actions of insulin in vitro and in vivo (1984)

Endoc. Rev., 5, 356-369

Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden PA, Cahill DA, Goldstein BJ and White MF.:

Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein (1991)

Nature, 352, 73-77

Tavare, J.M. and Denton, R.M.:

Studies on the autophosphorylation of the insulin receptor from human placenta.

Analysis of the sites phosphorylated by two-dimensional peptide mapping (1988)

Biochem. J., 252, 607-615

Thakker JK, DiMarchi R, MacDonald K and Caro JF:

Effect of insulin and insulin-like growth factors I and II on phosphatidylinositol and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate breakdown in liver from humans with and without type II diabetes (1989)

J Biol Chem., 264, 7169-75

Tornqvist, H.E., Pierce, M.W., Frackelton, A.R., Nemenoff, R.A. and Avruch, J.:

Identification of insulin receptor tyrosine residues autophosphorylated in vitro (1987)

J. Biol. Chem., 262, 10212-9

Touster, O., Aronson, N.N., Dulaney, J.T. and Hendrickson, H.:

Isolation of rat liver plasma membranes (1970)

The Journal of Cell Biology 47, 604-618

Tsuji, Y., Kaburagi, Y., Terauchi, Y., Satoh, S., Kubota, N.,

Tamemoto, H., Kraemer, F.B., Sekihara, H., Aizawa, S., Akanuma, Y., Tobe, K., Kimura, S. and Kadowaki, T.:

Subcellular localization of insulin receptor substrate family proteins associated with phosphatidylinositol 3-kinase activity and alterations in lipolysis in primary mouse adipocytes from IRS-1 null mice (2001)

Diabetes, 50, 1455-1463

Uddin, S., Yenush, L., Sun, X.J., Sweet, M.E., White, M.F. and Plataniias, L.C.:

Interferon- α engages the insulin receptor substrate-1 to associate with the phosphatidylinositol 3'-kinase (1995)

Am. S. Biochem. Mol. Biol. 270, 15938-15941

Wardzala, L.J., Cushman, S.W. and Salans, L.B.:

Mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell. Enhancement of the number of functional transport systems (1978)

J Biol Chem., 253, 8002-8005

Wasner, H.K., Gebel, M., Hucken, S., Schaefer, M. and Kincses, M.:

Two different mechanisms for activation of cyclic PIP synthase: by a G protein or by protein tyrosine phosphorylation (2000)

Biol. Chem. 381, 145-153

Wasner, H.K.: Preparation of a liver plasma membrane with an adrenalin-responsive adenylyl cyclase after inhibition of prostaglandin synthesis by indomethacin (1976)

FEBS Letters 72, 127-130

Wasner, H. K., Leßmann, M., Conrad, M., Amini, A., psarakis, E. and Mir-Mohammad-Sadegh, A.:

Biosynthesis of endogenous cyclic adenosine monophosphate (AMP) antagonist, prostaglandylinositol cyclic phosphate (cyclic PIP), from prostaglandin E and activated inositol polyphosphate in rat liver plasma membranes (1996)

Acta Diabetol., 33, 126-138

Wasner, H.K., Weber, S. Partke, H.J. and Amini-Hadi-Kiashar, H:

Indomethacin treatment causes loss of insulin action in rats: involvement of prostaglandins in the mechanism of insulin action (1994)

Acta Diabetol., 31, 175-182

Wasner, H.K., Lemoine, H., Junger, E., Leßmann, M. and Kaufmann, R.:

Prostaglandyl- inositol cyclic-phosphate, a new second messenger (1991)

Plenum Press, 153-168

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

Insulin resistance, a result of reduced synthesis of prostaglandylinositol cyclic phosphate, a mediator of insulin action? (1997)

Acta Diabetol., 34, 257-264

Wasner, H.K.: Mass spectrometric identification of prostaglandyl- inositol; the dephosphorylated cyclic AMP antagonist, cyclic PIP (1992)

Analisis, 20, 171-177

Wasner, H.K., Salge, U. and Gebel, M.:

The endogenous cyclic AMP antagonist, cyclic pip: its ubiquity, hormone-stimulated synthesis and identification as prostaglandylinositol cyclic phosphate (1993)
Acta Diabetol., 30, 220-232

Wasner, H.K., Müller, G. and Eckel, J.:

Direct comparison of inositol phosphoglycan with prostaglandylinositol cyclic phosphate, two potential mediators of insulin action (2003)
Exp Clin Endocrinol Diabetes, 111, 358-63.

Weber, S.:

Regulation des Glucoseausstromes aus der Rattenleber (1991)
Diplomarbeit, Math.-nat. Fakultät, Düsseldorf

Weber, S., Lemoine, H. and Wasner, H.K.:

Prostaglandin deficiency promotes sensitization of adenylyl cyclase (2000)
Biol. Chem. 381, 525-529

Wheeler, T.J. and Hinkle, P.C.:

The glucose transporter of mammalian cells 1985
Annu Rev Physiol., 47, 503-517

White, M.F. and Kahn, C.R.:

The insulin signaling system (1994)
J. Biochem. Mol. Biol., 269, 1-4

White, M.F., Maron, R. and Kahn, C.R.:

Insulin rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of a M_r – 185,000 protein in intact cells (1985)
Nature, 318, 183-186

White, M.F. and Kahn, C.R.:

Cascade of autophosphorylation in the beta-subunit of the insulin receptor (1989)
J Cell Biochem., 39, 429-441

White, M.F., Livingston, J.N., Backe,r J,M,, Lauris, V,, Dul, T.J., Ullrich, A. and Kahn, C.R.:

Mutation of the insulin receptor at tyrosine 960 inhibits signal transmission but does not affect its tyrosine kinase activity (1988)

Cell, 54, 641-649

White, M.F.:

The insulin signaling system and the IRS proteins (1997)

Diabetologia, 40, 2-17

Wick MJ, Dong LQ, Hu D, Langlais P and Liu F.:

Insulin receptor-mediated p62dok tyrosine phosphorylation at residues 362 and 398 plays distinct roles for binding GTPase-activating protein and Nck and is essential for inhibiting insulin-stimulated activation of Ras and Akt (2001)

J Biol Chem., 276, 42843-50

Wolheim, C.B. and Sharp, G.W.:

Regulation of insulin release by calcium (1981)

Physiol Rev., 61, 914-73

Zawalich,W.S. and Rasmussen, H.:

Control of insulin secretion: a model involving Ca²⁺, cAMP and diacylglycerol (1990)

Mol Cell Endocrinol. 70, 119-37

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Deutschen Diabetes-Forschungsinstitut an der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf durchgeführt.

Herrn Professor Dr. Hans Reinauer danke ich herzlich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Diabetes-Forschungsinstitut und für die Begutachtung meiner Arbeit. Gleichmaßen danke ich seinem Nachfolger Herrn Professor Dr. Dirk Müller-Wieland für das Interesse an der Arbeit.

Besonders zu danken habe ich Herrn Dr. K.H. Wasner für die Aufgabenstellung, die hilfreichen Ratschläge und die sehr gute Betreuung während meiner Doktorarbeit.

Bei Herrn Professor Dr. F. Wunderlich bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Dr. Stefan Lehr für die Möglichkeit bedanken, dass ich MALDI-MS in der Universität zu Köln durchführen konnte und für seine Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Herrn Dr. Stefan Lebrun, Herrn Dr. Schulz, Frau Dipl.-Biol. Tanja Günther, Herrn Prof. Müller-Wieland und Herrn Dr. Kotzka danke ich für die Bereitstellung der Zellen und der Fusionsproteine, sowie Herrn Dr. Ralf Flörke für die Unterstützung bei den Insulinrezeptor-Versuchen.

Bei Frau Waltraud Passlack, Herrn Dipl.-Biochem. Mathias Uhlig und Frau Dr. Monica Kincses möchte ich mich für die stete Diskussionsbereitschaft, die tolle Arbeitsatmosphäre und für die zahlreichen Tipps bedanken.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. J. Eckel für die nette Atmosphäre und Zusammenarbeit bedanken.

Auch möchte ich mich bei meinen Freundinnen und Freunden für das Korrektur lesen und die vielen aufmunternden Worte bedanken, ebenso danke ich Herrn Dipl.-Biol. Christian Goik für die spontanen Urlaubsgenehmigungen während der Zeit des Zusammenschreibens und das stete Interesse an der Arbeit.

Mein besonderer Dank geht an meine Eltern, meine gesamte Familie und meinen Freund Holger Klaf, die während dieser Zeit immer für mich da waren und nie an mir gezweifelt haben.

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen, die anderen Werken im Wortlauf oder im Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsanordnung sind mir bekannt.