

Aus dem  
Deutschen Diabetes-Zentrum,  
Leibnitz-Institut an der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. D. Müller-Wieland

# **Genexpression in humanen Skelettmuskelzellen nach Kokultur mit Adipozyten**

Dissertation

zur Erlangung des Grades des Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
vorgelegt von

Miriam Klähn  
2004

Als Inaugural-Dissertation gedruckt  
mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H. M. Raab  
Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. J. Eckel  
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. W. Scherbaum

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>3</b>
1.1. Der normale- und der pathologische Glukosestoffwechsel (Diabetes) .....	3
1.2. Insulin-Resistenz und die Bedeutung des Fettgewebes .....	6
1.3. Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF- $\alpha$ ) und sein Rezeptor .....	8
1.4. Therapie-Strategien des Diabetes-Typ II .....	9
1.5. Die Insulin-Signalkaskade .....	11
1.5.1. Der Insulin-Rezeptor .....	11
1.5.2. Die Insulin-Rezeptor-Substrat - Familie .....	12
1.5.3. Die Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase .....	14
1.5.4. Die Protein-Kinase B / AKT .....	15
1.5.5. Die Phosphoinositide-dependent kinase-1 .....	16
1.5.6. Die Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase-Isoenzyme .....	17
1.5.7. Die Cycline .....	19
1.5.8. Die Transkriptionsfaktoren c-jun, c-myc und c-fos .....	20
1.6. Aufgabenstellung .....	22
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>23</b>
2.1. Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	23
2.2. Experimenteller Ablauf der vorliegenden Arbeit .....	26
2.3. Zellkultur .....	27
2.3.1. Kultur der humanen Skelettmuskelzellen .....	27
2.3.2. Isolation und Kultur primärer, humaner Adipozyten .....	29
2.3.3. Kokultur humaner Skelettmuskelzellen mit Adipozyten .....	31
2.4. Genexpressions-Studien mittels semiquantitativer RT-PCR .....	32
2.4.1. RNA-Isolation aus humanen Skelettmuskelzellen und DNase-Behandlung .....	32
2.4.2. Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der RNA .....	33
2.4.3. Reverse Transkription zur Herstellung einer cDNA aus Gesamt-RNA .....	35
2.4.4. Semiquantitative RT-PCR, Primer-Sequenzen und PCR-Parameter .....	36
2.5. Genexpressions-Studien mittels eines radioaktiven cDNA-Arrays .....	39
2.5.1. Vorbereitungen .....	41
2.5.2. Reverse Transkription und Einbau von radioaktiv markiertem [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-dCTP .....	43
2.5.3. Hybridisierung und Detektion der markierten cDNA-Proben im Array .....	43
2.6. Proteinexpressions-Studien .....	44
2.6.1. Lyse der Protein-Proben und Protein-Bestimmung nach Bradford .....	44
2.6.2. SDS-Gel-Elektrophorese .....	45
2.6.3. Western-Blot, Coomassie-Färbung und Stripping der Membran .....	46
2.6.4. Antikörper-Detektion und Quantifizierung der Protein-Mengen .....	48
2.6.5. Fluoreszenzmikroskopie der Myozyten .....	49
2.6.6. Statistische Analyse der Daten .....	50
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>51</b>
3.1. Charakterisierung des Zellsystems im Mikroskop .....	51
3.1.1. Proliferation der Myoblasten .....	51
3.1.2. TNF- $\alpha$ beeinflusst die Morphologie der Zellkerne nicht .....	52
3.1.3. Lichtmikroskopie der Myozyten .....	53
3.1.4. Adipozyten im Lichtmikroskop .....	53
3.2. Genexpressions-Analysen im Skelettmuskel mittels semiquantitativer RT-PCR .....	54
3.2.1. Etablierung der PCR-Reaktionen .....	54
3.2.2. Etablierung einer Multiplex-PCR-Reaktion .....	56
3.2.3. Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-Genexpression bei Myozyten .....	59
3.2.4. IRS-1-Expression nach Langzeit-Behandlung mit TNF- $\alpha$ oder Troglitazon .....	60

3.2.5.	Zeitkinetik zur IRS-1-Genexpression bei Behandlung mit Troglitazon.....	62
3.3.	Genexpressions-Analysen im Skelettmuskel mit einem cDNA-Array .....	63
3.3.1.	<sup>32</sup> Phosphor und <sup>33</sup> Phosphor Markierung der cDNA-Proben .....	64
3.3.2.	Die Effizienz der Reinigung.....	66
3.4.	Der Einfluss der Kokultur auf die Genexpression in Skelettmuskelzellen .....	66
3.4.1.	Die Genexpression der Haushalts-Gene in der Kokultur .....	68
3.4.2.	Identifikation von Genen mit überdurchschnittlicher Expressionsänderung ...	70
3.4.3.	Die Genexpression der Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase-Isoform-2 .....	71
3.4.4.	Die Genexpression von AKT-1 und AKT-2 in der Kokultur.....	73
3.4.5.	Die Genexpression der Phosphoinositide-dependent-kinase-1 .....	76
3.4.6.	Die Genexpression von Cyclin-D1 in der Kokultur .....	77
3.4.7.	Die Genexpression von c-jun, c-fos und c-myc in der Kokultur.....	78
3.5.	Proteinexpressions-Analyse der PDK-2 in der Kokultur .....	79
3.6.	Proteinexpression der mit TNF- $\alpha$ behandelten Skelettmuskelzellen .....	80
<b>4.</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse .....</b>	<b>81</b>
4.1.	Myozyten exprimieren unabhängig von der TNF- $\alpha$ -Konzentration nur TNFR-1 .	81
4.2.	TNF- $\alpha$ und Troglitazon beeinflussen die IRS-1-Genexpression nicht.....	82
4.3.	Etablierung eines radioaktiven cDNA-Arrays zur Genexpressions-Analyse.....	83
4.4.	Ergebnisdiskussion zu einzelnen Genen des Arrays .....	83
4.4.1.	Die Expression der Haushalts-Gene bleibt in der Kokultur unverändert .....	83
4.4.2.	Die Kokultur senkt die mRNA-aber nicht die Protein-Expression der PDK-2	84
4.4.3.	Die Expression der PDK-1 ist abhängig vom Gewebe des Fettzellspenders .	87
4.4.4.	Die Expression von AKT-2 ist im Muskel etwa doppelt so stark wie AKT-1 .	88
4.4.5.	Die Expression von Cyclin-D1 bleibt unbeeinflusst von der sekretorischen Aktivität der Adipozyten .....	89
4.4.6.	Die Expression von c-jun, c-myc und c-fos bleibt unverändert .....	90
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>92</b>
<b>6.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>93</b>
6.1.	Literaturverzeichnis .....	93
6.2.	Alphabetisches Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen .....	118
6.3.	Danksagung .....	119
<b>7.</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>120</b>

## 1. Einleitung

### 1.1. Der normale- und der pathologische Glukosestoffwechsel (Diabetes)

#### Der normale Glukosestoffwechsel

Claude Bernard postulierte 1853 das Prinzip der Glukose-Homöostase für Mensch und Tier. Er erkannte die Bedeutung eines zu den Pflanzen analogen, konstanten „internen Milieus“. Glukose aus der Nahrung wird in periphere Gewebe aufgenommen oder durch die Leber produziert. Ihre Verbrennung unterhält wichtige Lebensvorgänge. Der Blutglukosespiegel wird durch ein hormonelles Regelsystem zwischen 60 und 180 mg/dl (3,3 – 10 mM) gehalten. Es gibt es mehrere Agonisten, die den Blutzuckerspiegel (BZ) erhöhen, z.B. Kortikoide, Katecholamine und Glucagon, aber nur ein Proteohormon, das den BZ senkt: Insulin. Das Pankreas produziert Insulin und seinen wichtigsten Antagonisten: Glukagon. Glukagon wird von  $\alpha$ -Zellen gebildet und erhöht den BZ durch Triggierung der Glukoneogenese in der Leber. Das 1922 von Banting und Best entdeckte Insulin wird von  $\beta$ -Zellen sezerniert. Es induziert, nach Abspaltung des C-Peptids, Schlüsselenzyme der Glykolyse in der Leber. Im Muskel- und im Fettgewebe fördert es die Glukose-Aufnahme und den Aminosäuretransport. In allen drei Geweben fördert es die Glykogen- und die Protein-Synthese und hemmt die Lipolyse. Das zentrale Nervensystem steuert die Sekretion der beiden Antagonisten. Zwischen den Nervenzellen sind adrenerge, cholinerge und peptiderge Übertragungswege involviert. Dazu gehören die Botenstoffe des sympathischen und parasympathischen Systems (Katecholamine, Dopamin, Acetylcholin) sowie primär hypothalamische Neuropeptide wie CRH (Kortikotropin releasing hormone), TRH (thyreotropin releasing hormone) und Neurotransmitter wie Substanz P, Bombesin, Endorphine, Neuromedin oder GRP (gastrin releasing peptide). Die Botenstoffe binden an ihre Rezeptoren und aktivieren verschiedene Signalwege, die die Aufnahme von Glukose in die abhängigen Gewebe oder die Neusynthese bewirken.

#### Der pathologische Glukose-Stoffwechsel: Diabetes

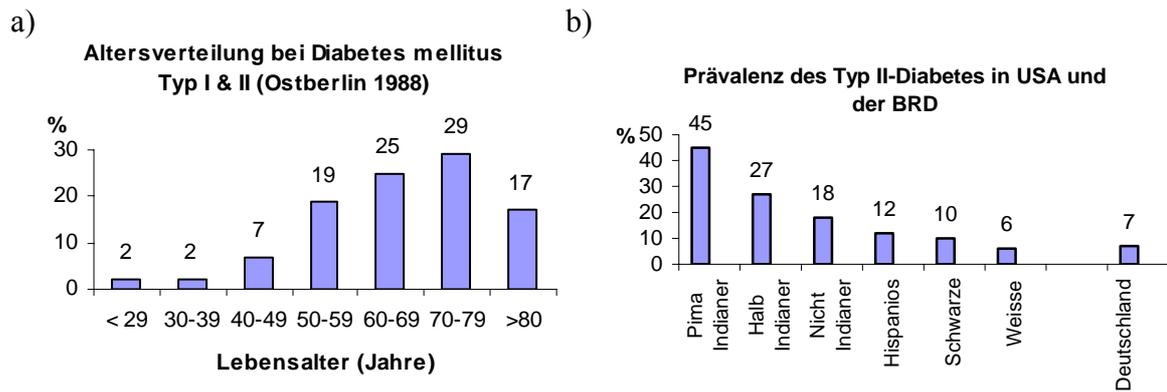
Ein gestörter Glukosestoffwechsel kann an vielen Stellen seine Ursachen und vollkommen verschiedene Auswirkungen haben. Da Insulin der einzige BZ-Senker ist, führen Störungen im Insulin-Regelkreis zu schwerwiegenden Erkrankungen. Eine Überproduktion von Insulin kommt z.B. beim Insulinom, dem häufigsten endokrinen Pankreastumor, vor. Einen relativen oder absoluten Insulinmangel bezeichnet man als Diabetes. Die diabetische Stoffwechsellaage ist gekennzeichnet durch zu hohe BZ-Werte (nüchtern  $>120$  mg/dl und im oralen Glukose-Toleranz-Test (oGTT) nach 2 h Werte  $>180$  mg/dl).

Himsworth entdeckte 1936 bei Diabetikern Unterschiede in der Insulin-Sensitivität [Himsworth *et al.*], heute unterscheidet man daher mehrere Unterformen des Diabetes:

1. Der Typ I-Diabetes (Insulin-dependent diabetes mellitus, IDDM) beginnt meist vor dem 40. Lebensjahr und zeigt, bedingt durch eine Insulinsekretionsstörung, einen absoluten Insulin-Mangel. Wahrscheinlich handelt es sich um eine HLA-assoziierte, durch einen Virusinfekt getriggerte Autoimmunerkrankung, die mit der Zerstörung der Insulin-sezernierenden  $\beta$ -Zellen des Pankreas einhergeht.
2. Der Typ II-Diabetes (Non-IDDM) manifestiert sich meist im höheren Lebensalter. Es besteht eine periphere, zelluläre Insulin-Resistenz der Insulin-abhängigen Organe (Leber, Muskel und Fettgewebe) [De Fronzo *et al.*]. Diese wird zunächst durch eine Insulin-Hypersekretion kompensiert, die Plasma-Insulin-Konzentrationen liegen höher als bei Gesunden [Yalow *et al.*]. Später kommt es zur Sekretionsstarre, eine weitere Erhöhung der Insulinmenge ist nicht mehr möglich und zuletzt erschöpft sich die pankreatische Sekretion. Man unterscheidet die Subformen IIa (normgewichtige Patienten) und -IIb (übergewichtige Patienten).
3. Der MODY (maturity onset diabetes of the young) ist ebenfalls eine Unterform des Typ II-Diabetes, die im Jugendalter auftritt, milde verläuft und autosomal dominant vererbt wird. Seltene Formen sind der Gestationsdiabetes bei 3 % aller Schwangeren und der sekundäre Diabetes, der medikamenteninduziert (z.B. im Rahmen einer Kortikosteroid-Gabe) oder bei Erkrankungen z.B. des Pankreas, bei Morbus Cushing oder beim Phäochromozytom auftritt.

Diabetes ist die häufigste endokrine Erkrankung. Die Inzidenz steigt im Alter (Abb. 1 a). 80 % sind übergewichtige Typ IIb-Diabetiker, je ca. 10 % verteilen sich auf Typ IIa und Typ I. Das Erkrankungsrisiko hängt u.a. von der ethnischen Zugehörigkeit ab (Abb. 1 b).

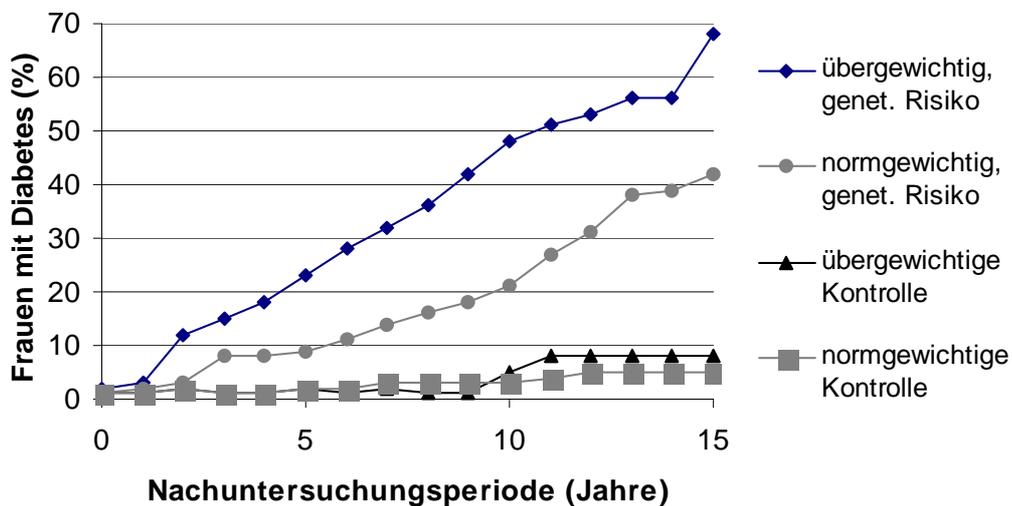
Familienstudien u.a. am Joslin-Diabetes-Center (Boston, USA), in denen über 25 Jahre nichtdiabetische Kinder von Eltern mit Diabetes nachuntersucht wurden [Martin *et al.*], belegen eine hereditäre Komponente bei der Disposition für Diabetes [Vaag *et al.*, Martin *et al.*]. Die molekulare Ätiologie scheint heute polygen. Eine Längsschnittstudie untersuchte über 8 Jahre das Gewicht als Risikofaktor bei der Entwicklung eines Diabetes mellitus an 113.861 Frauen [Colditz *et al.* 1990]. Das höchste Erkrankungsrisiko besteht bei genetischer Belastung in Kombination mit Übergewicht. Ein stark erhöhtes Risiko besteht bei genetischer Disposition und Normgewicht. Bei Übergewicht von 25-35 kg ist das Risiko an Diabetes zu erkranken 11-fach erhöht (Abb. 2), die Insulinresistenz korreliert mit dem BMI [Looker].



**Abb. 1: Statistische Daten zum Diabetes [Modifiziert nach Berger]**

Altersverteilung des Typ I- und Typ II-Diabetes in Ostberlin 1988 in Prozent (a). Prävalenz des Typ II-Diabetes in Prozent in der erwachsenen Bevölkerung abhängig von der ethnischen Zugehörigkeit in den USA und der BRD (b).

Adipositas stellt also einen eigenständigen exogenen Risikofaktor für den Ausbruch eines Diabetes dar. Wegen der Vielzahl der fehl- und überernährten Personen in westlichen Ländern erhält diese Tatsache im Hinblick auf die Diabetes-assoziierten Folgeerkrankungen (z.B. Herzinfarkt, Schlaganfall, metabolisches Syndrom) eine enorme Bedeutung [Reaven 1993]. Diabetes ist nicht nur ein medizinisches sondern auch ein volkswirtschaftliches Problem.



**Abb. 2: Kumulative Inzidenz des Diabetes in einer Hochrisiko- und einer Kontroll-Gruppe**

Die Abbildung zeigt das Diabetes-Risiko in einer Studie an Frauen in 4 Risiko-Gruppen, die über 15 Jahre nachuntersucht wurden. Aufgetragen ist der Prozentsatz an Neuerkrankungen kumulativ gegen die Zeit in Jahren.

## 1.2. Insulin-Resistenz und die Bedeutung des Fettgewebes

Der Manifestation eines Typ II-Diabetes geht eine Insulin-Resistenz z.T. um Jahre voraus [Smith, U], man nennt dies einen latenten Diabetes [Warram *et al.*]. Der Begriff Insulin-Resistenz bezieht sich u.a. auf Auswirkungen im Glukose-Metabolismus: eine verminderte Insulin-vermittelte Glukoseaufnahme in Fett- und Muskelgewebe sowie die Glukose-Speicherung in der Leber. Es liegen über die Norm erhöhte Insulin-Plasma-Spiegel vor, um eine Insulin-resistenz zu kompensieren. Irgendwann reicht die sezernierte Insulin-Menge nicht mehr aus, um eine adäquate zelluläre Antwort auf den Insulin-Stimulus auszulösen. Der Diabetes wird manifest. Die Insulin-Signal-Kaskade scheint gestört, die Ursachen hierfür bzw. die Einflussfaktoren sind noch unzureichend verstanden.

Insulin zeigt neben der systemischen Beeinflussung des Glukose-Stoffwechsels andere metabolische - und auch mitogene Effekte [Reaven 1995] und auch eine lokale Wirkung in Fett-, Muskel- oder Leber-Gewebe. Es determiniert die Differenzierung von Präadipozyten [Smith, PJ *et al.*] und beeinflusst die Expression von Genen der Lipogenese [Klemm *et al.*; Shimomura u. Bashmakov *et al.*; Foretz *et al.*] und der Lipolyse [Kim, JB *et al.*]. Es ist ein wichtiger Regulationsfaktor im Stoffwechsel adulter Adipozyten und fördert z.B. die Glukose-Aufnahme insbesondere über den Glukose-Transporter GLUT4 [Ducluzeau *et al.*]. Es stimuliert die Lipoproteinlipase und begünstigt so die Aufnahme von Triglyzeriden aus dem Blut außerdem inhibiert es die Fettsäureoxidation.

Einige metabolische Effekte im Körper sind abhängig von der Insulin-Konzentration [Kitamura *et al.*]. Antilipolytische Eigenschaften des Insulins werden bereits durch niedrige Konzentrationen vermittelt [Kamel *et al.*], bei hohen Insulin-Konzentrationen (Insulin-Resistenz oder Insulin-Ersatz-Therapie) wird daher eine Gewichtszunahme gefördert.

Unklar ist wie die Insulin-Resistenz durch Einflüsse des Fettgewebes hervorgerufen wird. Heute weiß man, dass das Fettverteilungsmuster das Diabetesrisiko beeinflusst [Bolinder; Despres *et al.*]. Patienten mit einem zentralen, abdominellen Fettpolster sind häufiger von Diabetes betroffen, als solche mit gluteal- oder Extremitäten-betontem Fettmuster. Fett scheint abhängig von der Körper-Region unterschiedliche Enzym-Expressionsmuster [Bujalska *et al.*] und konsekutiv eine unterschiedliche Insulin-Sensitivität zu zeigen [Johnson, JA *et al.*].

Eine Hypothese ist, dass intraabdominelle Adipozyten aufgrund ihrer höheren Zahl an  $\beta_3$ -adrenergen Rezeptoren eine höhere lipolytische Aktivität besitzen; einen Überblick gibt Arner

[1995]. Die Aufnahme von freien Fettsäuren (FFA) in die Zelle ist dabei verringert, als Folge gelangen mehr freie Fettsäuren in die Pfortader und verhindern die Insulin-Clearance. Dies führt zur Steigerung der Triglyzerid (TG)-Plasma-Konzentration und konsekutiv zur erhöhten VLDL-Synthese durch die Leber; zwei Parameter, die ein erhöhtes Atherosklerose-Risiko bedeuten [Kahn, BB *et al.*].

Umgekehrt scheint auch eine Hypertriglyzeridämie die Insulin-Resistenz zu fördern, denn ein Mausmodell mit genetischer Lipoatrophie, dem Fettgewebe fehlt, zeigt bei Fütterung mit hohem Fettanteil neben erhöhten FFA eine Insulin-Resistenz [Hamann *et al.* 1995, 1996], die sich durch Transplantation von normalem Fettgewebe bessern lässt [Gavrilova *et al.*].

Ein Zusammenhang zwischen der Fettsäure-Zusammensetzung der Muskel-Phospholipide und der Insulin-Resistenz ist ebenfalls beschrieben [Borkman *et al.*].

Der Vermutung, dass freie Fettsäuren allein die Insulin-Resistenz hervorrufen, widerspricht ein Knockout-Maus-Modell, dem der Fettsäure-Transporter CD36 fehlt. Diese Tiere zeigen zwar erhöhte TG-Spiegel, da die Zellen aktiv keine Fettsäuren in die (Muskel)-Zellen transportieren können. Sie sind aber nicht insulinresistent, sondern besonders insulinsensibel, weil der Muskel stärker auf die Glukose-Aufnahme angewiesen ist [Febbraio *et al.*].

Mäuse, die CD36 selektiv im Muskel überexprimieren zeigen schon bei niedrigen FFA- und TG-Plasma-Konzentrationen eine Insulin-Resistenz [Ibrahimi *et al.*].

Das eine scheinbar komplexe Beziehung zwischen dem erhöhten Fettsäure-Umsatz und der Insulin-Resistenz besteht, bestätigen Studien mit Thiazolidindionen, einer Wirkstoffklasse, die Auswirkungen auf die Fettverteilung und auf die Insulin-Resistenz hat [Miyazaki *et al.*].

Heute betrachtet man das Fettgewebe nicht nur als Energie-Speicher, sondern auch als exo- und endokrines Organ, das Peptidhormone und Cytokine sezerniert [Mohamed-Ali *et al.*]. Einige sind bei Adipositas in ihrem Sekretionsmuster verändert und beeinflussen unter anderem den Glukosestoffwechsel. Eine Auswahl zeigt Tabelle 1.

**Tabelle 1: Von Adipozyten sezernierte Faktoren und ihre Beeinflussung durch Adipositas**

(↑ = erhöht, ↓ = erniedrigt, ↔ = unverändert)

Von Fett sezernierte Komponente	Sekretion bei Adipositas	Von Fett sezernierte Komponente	Sekretion bei Adipositas
Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$	↑	Plasminogen activator inhibitor-1	↑
Leptin	↑	Renin	?
Resistin	↑	Angiotensin converting enzyme	?
Komplement-Faktor-D (Adipsin)	↔ bis ↓	Angiotensinogen	?
Acylation stimulating protein	↔	Angiotensin II	?
Adiponectin	↓	Östrogene	↓

Das 1994 entdeckte Leptin ist ein vor allem im Hypothalamus wirksames Hormon, das als neuroendokriner Mediator wirkt und u.a. das Hungergefühl beeinflusst [Friedman *et al.*, Zhang Y *et al.*]. Defekte im Leptin-Gen oder seinem Rezeptor bewirken die Neigung zu Übergewicht und fördern Insulin-Resistenz und Diabetes, die sich durch Gabe von Leptin bessern [Halaas *et al.*; Shimomura u. Hammer *et al.*].

Resistin ist ein 2001 erstmals beschriebenes Protein, das von Adipozyten in weißem Fettgewebe produziert wird und dessen Genexpression bei Adipositas und Diabetes hochreguliert wird [Steppan *et al.*]. Zur Resistin-Familie gehören weitere strukturverwandte Vertreter, die „resistin like molecules“, die eine gewebespezifische Verteilung besitzen. Die Resistin Spiegel diabetischer Mäuse waren unter Thiazolidindion- und Resistin-Antikörper-Therapie vermindert, die Diabetes-Symptome besserten sich. Nach neueren Studien hat der Einfluss von Resistin jedoch keine so große Bedeutung wie zunächst angenommen [Ukkola].

Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF- $\alpha$ ) wird in Adipozyten von Adipösen überexprimiert [Halle *et al.*].

### 1.3. Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF- $\alpha$ ) und sein Rezeptor

Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), früher auch Cachexin genannt, ist ein hauptsächlich von Makrophagen sezerniertes, 26 kDa großes, transmembranäres Prohormon, das nach proteolytischer Spaltung ein 17 kDa großes, lösliches homotrimeres Protein ergibt. Da beide Formen biologisch aktiv sind, kann TNF- $\alpha$  lokale- oder systemische Wirkungen haben [Hotamisligil *et al.*; Xu *et al.*]. Eine TNF- $\alpha$ -Expression ist beim Menschen zusätzlich in Adipozyten [Hotamisligil *et al.* 1995], in Kardiomyozyten, im Skelettmuskel sowie in humanen Myozyten-Zelllinien nachgewiesen [Saghizadeh *et al.*]. Im Gewebe adipöser Menschen wird TNF- $\alpha$  überexprimiert [Hotamisligil *et al.* 1995]. Bei diabetischen Patienten fand sich in Muskelbiopsien und in -Primärzellkulturen eine 4-fach höhere TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression als bei insulinresistenten Personen [Saghizadeh *et al.*]. Da insulinresistente Patienten auch höhere TNF- $\alpha$ -Konzentrationen im Blut zeigten [Nilsson *et al.*], nimmt man an, dass TNF- $\alpha$  zur Pathogenese des Typ IIb-Diabetes beiträgt. Die Infusion von anti-TNF-Antikörpern verbesserte bei diabetischen Ratten die Insulin-Resistenz und die Glukose-Utilisation stieg [Hotamisligil *et al.* 1994]. Einen Überblick über die Induktion einer Insulin-Resistenz an Adipozyten geben Qi und Pekala [2000].

Es wird diskutiert, ob das von Adipozyten sezernierte TNF- $\alpha$  autokrin oder parakrin agiert. Für beide Mechanismen gibt es Hinweise.

Ein endokriner Effekt, der *in vitro* gefunden wurde, ist eine verminderte insulinstimulierte Glukose-Aufnahme in humane Adipozyten 24 h nach Exposition mit TNF- $\alpha$  [Hauner *et al.*]. Weiter inhibiert TNF- $\alpha$  in Adipozyten die Tyrosin-Phosphorylierung des Insulinrezeptor-Substrates-1 (IRS-1) als Antwort auf einen Insulinstimulus und hemmt die IRS-1 assoziierte PI3K in ihrer Aktivität. Die Autophosphorylierung des Insulinrezeptors (IR) bleibt dabei unverändert [Liu, LS *et al.* (b)].

Hotamisligil *et al.* [1994] vertreten die These, dass die Insulin-Sensitivität des Muskels durch das den Muskel durchsetzende oder das vom benachbarten Fettgewebe gebildete TNF- $\alpha$  beeinflusst wird. Diese parakrine Wirkung wird auch als „cross talk“ bezeichnet. An humanen Myozyten wurden dazu nur wenige Studien durchgeführt [Halse *et al.*; Ciaraldi *et al.*; Dietze *et al.*].

TNF- $\alpha$  entfaltet seine Wirkung über zwei Rezeptor-Isoformen, TNFR1 (60 kDa) und TNFR2 (80 kDa). Sie unterscheiden sich hauptsächlich in ihrem intramembranal Anteil und in ihren Bindungskonstanten. Über den TNFR1 werden nukleäre Transkriptionsfaktoren aktiviert. Dies sind hauptsächlich nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) und c-jun [Chen *et al.*]. Es lassen sich Apoptose-Vorgänge [Tartaglia *et al.* 1993 (b)] und antiapoptotische-Wege einschlagen. Außerdem wird die Interleukin-6-Produktion über TNFR1 vermittelt. TNFR2 mediert zumindest bei Mäusen die Ausreifung von Thymozyten [Tartaglia *et al.* 1991] und inhibiert die frühe Hämatopoese [Vandenaabele *et al.*]. Ferner scheint es bei der Rekrutierung von Liganden für den TNFR1 durch „Ligand-Passing“ beteiligt zu sein [Tartaglia *et al.* 1993 (a)]. Beide Rezeptoren können von der Oberfläche durch proteolytische Spaltung gelöst werden und existieren auch als lösliche Form. Diese ist bei bestimmten Erkrankungen erhöht, insbesondere bei Adipositas [Hotamisligil *et al.* 1997, Tsigos *et al.*], weshalb auch die Rezeptordichte bei der TNF-vermittelten Insulin-Resistenz als Langzeit-Effekt pathogenetisch bedeutsam sein könnte. Die Signalwege nach dem TNFR sind bis jetzt nur unzureichend untersucht und verstanden. Einen Überblick geben Chen *et al.* [2002].

#### **1.4. Therapie-Strategien des Diabetes-Typ II**

Bei Typ I-Diabetikern ist der Insulinersatz die einzig mögliche Behandlung. Bei Typ II-Diabetikern lässt sich die Insulin-Resistenz durch Gewichtsreduktion bereits positiv beeinflussen und ist der erste Therapie-Schritt. Kann durch eine kohlenhydratarme Kost und Diät eine normale Stoffwechselsituation nicht hergestellt werden, wird eine orale Medikation

begonnen. Eine aktuelle Übersicht gibt Nauck [2001]. Am gebräuchlichsten sind Sulfonylharnstoffe (z.B. Glibenclamid), die die Insulin-Sekretion in den Langerhans-Inseln des Pankreas fördern. Ähnlich, jedoch kürzer, wirken Glinide (z.B. Repaglinid). Eine weitere Klasse sind Biguanide, von denen nur Metformin im Handel ist. Es reduziert die hepatische Glukoseproduktion und steigert die Insulinwirkung am Muskel ohne zur Gewichtszunahme zu führen. Einen anderen Wirkansatz haben  $\alpha$ -Glukosidase-Hemmstoffe. Sie verzögern als Nahrungsbeigabe im Darm die Resorption von Kohlenhydraten und federn einen raschen BZ-Anstieg nach der Nahrungsaufnahme ab. Thiazolidindione erhöhen die Insulin-Sensitivität der peripheren Gewebe. Vertreter sind die Glitazone, z.B. Rosiglitazon, Pioglitazon oder das in der Forschung verwendete Troglitazon.

### **Thiazolidindione (TZD) - eine neue Stoffgruppe**

Die TZD wirken als „Insulin-Sensitizer“ [Olefsky]. Die Aufklärung ihres Wirkmechanismus kann Hinweise zur Entstehung der peripheren Insulin-Resistenz geben. TZD binden an den PPAR- $\gamma$  (Peroxisome Proliferator Activated Rezeptor- $\gamma$ ), einen nukleären Transkriptionsfaktor [Lehmann *et al.*]. PPAR- $\gamma$  wird in geringen Mengen in Muskel, Leber und Immunzellen exprimiert. Die Expression im Fettgewebe ist relativ hoch, weshalb man von der Hauptwirkung der TZD dort ausgeht. Der PPAR- $\gamma$  ist für die Determination in der Adipogenese ein wichtiger Faktor, dessen Expression im Laufe der Differenzierung steigt. Es gibt genetische Beweise für einen Zusammenhang zwischen PPAR- $\gamma$ -Signaling und dem Kohlenhydrat-Stoffwechsel. Eine dominant negative PPAR- $\gamma$ -Missense-Mutation beim Menschen geht mit Diabetes mellitus, einer nur partiellen Lipodystrophie und Bluthochdruck einher [Barroso *et al.*]. Eine Pro<sup>12</sup>Ala-Mutation im PPAR- $\gamma$ -Gen bewirkt umgekehrt eine gesteigerte Insulinsensitivität bei erhöhtem- [Beamer] oder erniedrigtem BMI [Deeb *et al.*].

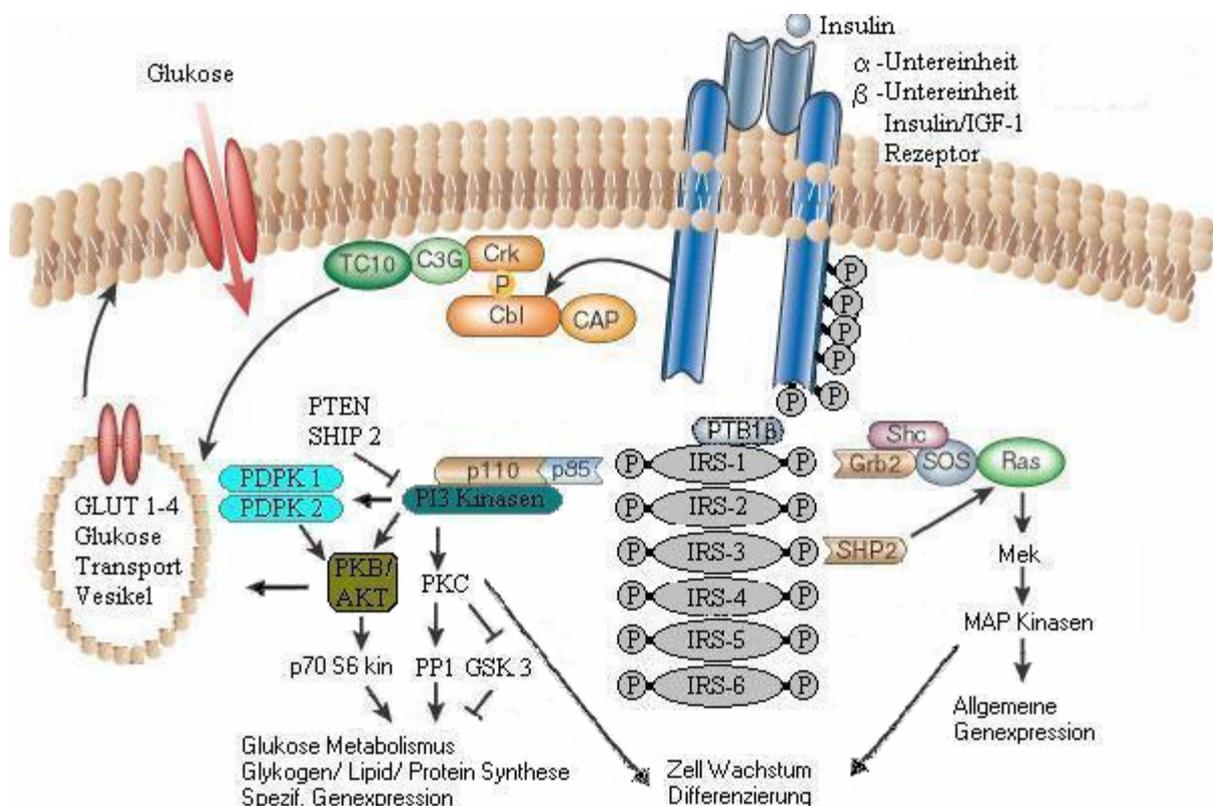
Zwischen Mensch und Tiermodell gibt es wichtige Unterschiede, denn homozygote PPAR- $\gamma$ -Knockout-Mäuse weisen im Gegensatz zum Menschen eine Lipoatrophie und Insulin-Resistenz auf. Heterozygote Tiere zeigen keine Insulin-Resistenz.

Bei Ratten reduzieren TZD durch Promotor-Wirkung auf das obesity (ob)-Gen die Leptin-Transkription und -Translation und induzieren über eine erhöhte Nahrungsaufnahme eine Gewichtszunahme, die die Stoffwechselsituation eher verschlechtern müsste. Die Adipozytenzahl steigt, die Zellen verkleinern sich aber und weisen eine erhöhte Insulin-Sensitivität auf [Olefsky]. Unklar bleibt, ob dies durch Stimulation der Adipogenese oder durch verminderte Antilipolyse aufgrund der sinkenden Insulin-Spiegel geschieht. Möglicherweise sezernieren Adipozyten unter TZD weniger TNF- $\alpha$ .

Die Einflüsse der TZD auf die TNF- $\alpha$ -Signalwege und auf die Sekretion freier Fettsäuren sind noch unzureichend verstanden. Es scheint aber bezüglich der Insulinwirkung eine Schnittstelle zwischen Fett- und Muskelgewebe zu geben, an der TZD ansetzen.

### 1.5. Die Insulin-Signalkaskade

Die Mediatoren in der Insulin-Signalkaskade sind in ihrer Struktur hochkonserviert, von *C. elegans* bis zum Menschen [Paradis *et al.*]. Abb. 3 zeigt wichtige Glieder der Insulin-Signalkaskade schematisch, die im folgenden näher beschrieben werden.



**Abb. 3: Schematische Darstellung des Insulin-Signal-Wegs in der Zelle**

Isoenzyme sind gleichfarbig dargestellt. Pfeile bedeuten eine Aktivierung, die Kaskade läuft in Pfeilrichtung ab, -| bedeutet inhibitorische Wirkung. Modifiziert nach Nature Insight „Diabetes“.

#### 1.5.1. Der Insulin-Rezeptor

Der Insulin-Rezeptor (IR) gehört zur Rezeptor-Tyrosin Kinase-Familie, zu der ebenso der IGF-1-R (Insulin like growth factor-1 receptor), der EGF-R (epidermal growth factor receptor), der FGF-R (fibroblast growth factor receptor) und der PDGF-R (platelet derived growth factor receptor) gehören. Das 150 kb lange humane IR-Gen ist auf dem Chromosom

19p lokalisiert und enthält 22 Exons, die für die 4,2 kb lange cDNA-Sequenz kodieren [Ulrich *et al.* (a)]. Das Genprodukt ist ein  $\alpha_2\beta_2$ -heterotetramerer Protein-Komplex, dessen Untereinheiten über Disulfidbrücken verbunden sind. Insulin bindet extrazellulär an die  $\alpha$ -Untereinheiten des IR. Die transmembranale Weiterleitung des Signals aktiviert über eine Konformationsänderung eine Tyrosin-Kinase-Domäne in der  $\beta$ -Untereinheit, was zur Autophosphorylierung weiterer Tyrosin-Reste der  $\beta$ -Untereinheit führt [Kahn, CR *et al.*; Rosen, Ebina *et al.*; Ullrich *et al.*].

Die Diversifizierung der Insulin-Signal-Kaskade beginnt hier, bedingt durch eine Multifunktionalität der Tyrosin-Reste. C-terminale Tyrosin-Reste medieren eventuell mitogene Effekte des Insulins, die in der Kinase-Domäne gelegenen Tyrosin-Reste beeinflussen die katalytische Aktivität des IR [Scaldefferri *et al.*]. Die juxtamembranär gelegenen Phospho-Tyrosin-Reste dienen zur Bindung der Insulin-Rezeptor-Substrate (IRS).

Weitere Domänen des IR modulieren die Rezeptor-Funktion. Sie unterliegen einer Serin- und Threonin-Phosphorylierung z.B. durch die Protein-Kinase C (PKC), was in vitro zu einer Herabsetzung der Tyrosin-Kinase-Aktivität führt. Bei insulinresistenten Individuen und bei diabetischen Ratten sind PKC-Isoformen chronisch erhöht [Ishizuka *et al.*; Considine *et al.*; Avignon *et al.*].

IR-Mutationen, die mit schwerem Diabetes einhergehen, sind beim Menschen bekannt aber selten (z.B. bei Typ A-Syndrom, bei Leprechaunismus oder bei Rabson Mendenhall-Syndrom [Taylor *et al.*; Krook *et al.*]. Im Tiermodell erzeugte IR-Mutationen sind letal [Accili *et al.*; Joshi *et al.*]. Diabetes ist also eher ein polygenes Krankheitsbild, bei dem die Defekte auf Postrezeptor-Ebene liegen.

### **1.5.2. Die Insulin-Rezeptor-Substrat - Familie**

1985 wurde erstmals ein Insulin-Rezeptor-Substrat (IRS) beschrieben [White *et al.* 1985]. Heute sind 6 Proteine bekannt. Einen Überblick über IRS-1 bis -4 geben Giovannone *et al.* [2000] und White [2002]. IRS-5 und -6 wurden erst kürzlich von Cai *et al.* [2003] beschrieben. IRS weisen unterschiedliche Gewebsverteilungen, eine unterschiedliche subzelluläre Verteilung und ein unterschiedliches Wirkprofil auf.

Gemeinsam sind einige hochkonservierte Regionen wie die N-terminale Plextrin-homologe-Domäne (PH), die an Membran-Phospholipide oder saure Bereiche anderer Proteine bindet. Daran schließt sich ein Phosphotyrosin-bindender Bereich (PTB) an. Damit binden die IRS an Phospho-Tyrosin im NPXY-Motiv (die AS-Sequenz asp-pro-glut-gls-ptyr), das in der

$\beta$ -Untereinheit des IR in der juxtamembranären Region vorkommt. Doch trotz gemeinsamer Tertiärstruktur der PH- und PTB-Domänen binden die IRS unterschiedlich an den IR.

Am schwach konservierten, C-terminalen Ende besitzen die IRS Tyrosin-Reste, die durch PH und PTB-Interaktion phosphoryliert werden. Phosphoryliertes IRS kann mit src2-Homologie-2 (SH2)-Domänen anderer Moleküle in Wechselwirkung treten und so zur Signalweiterleitung beitragen.

Humanes IRS-1 wurde 1993 kloniert [Araki *et al.*]. Genlokus ist 2q36-37. Das Gen besteht aus nur einem Exon für die 5' nicht-translatierte- sowie die kodierende Region. Es gibt zwei 6 und 6,9 kB große mRNA-Spezies, das Protein hat eine Größe von 180 kDa [Sun *et al.*]. Eine stärkere Expression zeigen Skelettmuskel, Hirn, Lunge, Dünndarm und Nieren [Araki *et al.* 1993]. IRS-1 ist in allen Zell-Organellen vertreten. Die Homologie zwischen humanem Muskel- und Ratten-Leber IRS-1 beträgt 88 % [Inoue *et al.*; Anai *et al.*].

Phosphoryliertes IRS-1 bindet an mehrere Isoformen und Splicevarianten der Phosphatidylinositol Kinase 3 (PI3K)-Untereinheit p85, an growth receptor binding protein 2 (Grb-2) an Nck, crk, c-fyn, Phospholipase C $\gamma$  und SHP-2 [White 1997].

Im Fettgewebe von NIDDM-Patienten ist die IRS-1-Expression vermindert. IRS-2 ersetzt seine Funktion an der PI3-Kinase [Rondinone *et al.*]. Im Skelettmuskel ist hingegen die Proteinexpression von IRS-1 und IRS-2 normal aber die PI3K-Aktivität ist herabgesetzt [Kim, YB *et al.*].

Durch Überexpression zeigte sich die mitogene Wirkung von IRS-1 (über Grb-2 und SHP) sowie eine verbesserte Insulin-Antwort und -Sensitivität beim Glukosetransport und der Glukoneogenese [Wang *et al.* 1993; Hribal *et al.*].

Heterozygote IRS-1-Knockout-Mäuse sind von unauffälligem Phänotyp. Homozygote Tiere zeigen Wachstumsretardierung, Hypertension, Hypertriglyzeridämie und eine nur milde Insulin-Resistenz ohne Übergang in manifesten Diabetes [Araki *et al.* 1994; Tamemoto *et al.*; Abe *et al.*]. Vermutlich steigern sie kompensatorisch die  $\beta$ -Zell-Masse im Pankreas [Kadowaki].

IRS-2 Knockout-Mäuse zeigen ebenfalls Wachstumsretardierung und Insulin-Resistenz. Sie entwickeln jedoch früh Diabetes, weil ihnen die Fähigkeit zur kompensatorischen Erhöhung der  $\beta$ -Zell-Masse fehlt [Withers *et al.*; Kadowaki].

Auch IRS-6 weist im Northern Blot eine im Vergleich zu anderen Organen hohe Expression im Skelettmuskel auf [Cai *et al.*], weiter sind die beiden neuen IRS-Proteine und ihre Funktion jedoch noch nicht untersucht.

### 1.5.3. Die Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase

Die Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase (PI3K) ist ein Heterodimer aus einer katalytischen p110-Untereinheit (110 kDa) und einer regulatorischen p85-Untereinheit (85 kDa).

Auf 3 Genen sind 8 Isoformen der p85-Untereinheit kodiert p85 $\alpha$ , p85 $\beta$  [Otsu *et al.*] und p55<sup>PIK</sup> [Pons *et al.*] bzw. entstehen durch alternatives Spleißen von p85 $\alpha$  (p85/AS53, p55 $\alpha$  und p50 $\alpha$ ). Phospho-IRS-1 bindet dabei an p85, p50, p55, p85 $\alpha$  und p55<sup>PIK</sup>.

Von p110 sind ebenfalls Isoformen mit einer gewebsspezifischen Verteilung bekannt: p110  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\delta$  [Alessi *et al.* 1998, Shepherd *et al.* 1998]. Die PI3K scheint gewebsspezifisch reguliert zu sein. Die humanen p85-Isoformen unterscheiden sich in der Gewebsverteilung, der Potenz zur Enzym-Aktivierung und ihrer Sensitivität gegenüber einem Insulin-Stimulus [Fruman *et al.* 1996, Kerouz *et al.*, Pons *et al.*].

In Kardiomyozyten der Ratte assoziiert p85 $\beta$  mit IRS-1/2 [Kessler *et al.*]. Im humanen Skelettmuskel und im Gehirn bindet bevorzugt p85 $\alpha$  an IRS-1 obwohl von den p85-Splice-Varianten die mRNA von p85/AS53 den höchsten Anteil und eine 7-fach höhere Protein-Menge hat. Fettgewebe weist überwiegend die p85 $\alpha$ -Form auf [Antonetti *et al.*].

Knockout-Mäuse für p85 $\alpha$ -Isoformen sterben kurz nach der Geburt [Fruman *et al.* 2000]. Heterozygote weisen, möglicherweise wegen einer günstigeren Molekül-Stöchiometrie, eine verbesserte Insulin-Sensitivität auf [Terauchi *et al.*].

Das Insulin-Signal läuft über die p85 Einheit ein und wird über beide Unterformen (p85 und p110) weitergeleitet. Insulin bewirkt eine direkte Interaktion [Liu, LS *et al.* (a)] der Phospho-Tyrosin-Motive des IRS (= pYMXM und pYXXM) mit 2 SH2-Domänen der p85-Untereinheit der PI3K [Myers *et al.*].

Bei Signal-Weiterleitung über die p85-Untereinheit stimuliert deren Serin-Kinase-Aktivität 3 Klassen von Zielmolekülen [Kessler *et al.*]. Dies sind:

1. Die Serin/Threonin-Kinasen der AGC-Familie (PKA, PKG, PKC), die atypischen Protein-Kinase C-Isoformen PKC  $\lambda$  +  $\zeta$ , die PDPK-1 (Phosphatidylinositol-dependent Protein-Kinase) [Peterson *et al.*, Datta *et al.*, Chang *et al.*, Alessi *et al.* (c, d)].
2. Die Rho-Familie der GTPasen (Guanin-Nukleotid-Phosphat-hydrolysierende Enzyme) [Mackay *et al.*].
3. Die Tyrosin-Kinasen der TEC-Familie [Ziegler *et al.*].

Die p110-Untereinheit phosphoryliert Plasmamembranlipide (Phosphoinositide) an der 3-Hydroxy-Gruppe des Inositol-Ringes. Wichtigstes Substrat ist Phosphatidylinositol-3,4-

bisphosphat. Das entstandene Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat [PtdIns (3,4,5)P<sub>3</sub>] hat „second messenger“ Funktion und aktiviert in vivo und in vitro ebenfalls die AKT durch Interaktion mit der PH-Domäne der AKT [Coffer *et al.*].

Zu den von der PI3K angesteuerten Signalwegen, die z.T. durch Wortmanin inhibierbar sind gehören die Stoffwechsel-Regulation inklusive der Protein-Synthese [Lin *et al.*], der Lipid-Synthese [Okada *et al.*], der Glykogen-Synthese [Cheatham *et al.*, Shepherd *et al.* 1995], die insulinstimulierte Glukose-Aufnahme [Shimizu *et al.*, Okada *et al.*] und das „Glukose-Transport-Vesikel-Trafficking“ [Shepherd 1996 *et al.*, Kessler *et al.*, Ozanne *et al.*]. Auch Wachstum und Differenzierung (Zell-Überleben, Modifikation des Cytoskeletts) [Toker *et al.* 1997], und mitogenes Signaling (z.B. die Genexpression) ist bei Inhibition der PI3K betroffen [Cichy *et al.*, Sutherland *et al.*]. Überblicke geben Alessi und Wymann [Alessi (b) *et al.*, Wymann *et al.*].

#### 1.5.4. Die Protein-Kinase B / AKT

C-AKT (cellular AKT), synonym Protein-Kinase B (PKB) oder RAC (related to protein kinases A & C) ist eine Serin/Threonin-Kinase, die eine starke Homologie mit den Protein-Kinasen A und C aufweist. Die Kinase ist ein Protoonkogen das der AKT 8 Virus v-AKT (viral AKT) ähnelt. Die humane AKT wurde 1991 kloniert [Jones *et al.*]. Die mRNA ist 3,4 kB, das Protein 64,2 kDa groß. Zusätzlich zu den Isoformen 1-3 bei Säugern sind Spleiss-Varianten von der AKT-2 bekannt. Einen Überblick gibt Franke [1999]. Die AKT-1 wird ubiquitär, die AKT-2 besonders im Muskel, im Intestinum, in den Reproduktionsorganen und in Fettgewebe exprimiert. In Adipozyten hat die AKT-2 70 %, die AKT-1 ca 30 % Anteil.

Das Enzym ist im Zytosol lokalisiert. Es transloziert nach einem Insulin- oder IGF-1-Stimulus PI3K-vermittelt zur Zellmembran. Es wird vermutlich durch die PI3K direkt und durch die dort lokalisierte Phosphoinositide-dependent protein kinase (PDPK-1) phosphoryliert und transloziert zum Nukleus [Andjelkovic *et al.*]. Die AKT-Aktivierung erfolgt an Thr<sup>308</sup> durch die PDPK-1 [Alessi *et al.* (a), Scheid *et al.*] und dann an Ser<sup>473</sup> durch Autophosphorylierung [Toker *et al.* 2000].

Die AKT kontrolliert Zellfunktionen wie Apoptose, Protein-Translation und über die Inhibition der Glykogen-Synthase-Kinase 3 (GSK3) den Glykogen-Metabolismus. Die GLUT4-Translokation wird besonders durch die AKT-2 beeinflusst [Calera *et al.*].

Es gibt Hinweise, dass eine reduzierte AKT-Aktivität mit einem verringerten Glukose-Transport einhergeht, bzw. dass nach AKT-Überexpression in Adipozyten die Glukose-transport-Aktivität und die GLUT4-Translokation zur Plasmamembran steigen [Kohn *et al.*]. Troglitazon bewirkte bei Diabetes gefährdeten Personen eine erhöhte AKT-Phosphorylierung gegenüber der Placebo-Gruppe, was die Sensitizer-Eigenschaften erklären könnte [Meyer *et al.*]. Bei 3T3L1-Adipozyten ließ sich die Glitazon-Wirkung mit der Thr<sup>308</sup>/Ser<sup>473</sup>-Phosphorylierung und der AKT-Aktivität assoziieren [Standaert *et al.*]. Dietze *et al.* konnten am Skelettmuskel mit Troglitazon eine gesteigerte AKT-Proteinmenge und eine gesteigerte Phosphorylierung induzieren. Am Kokultur-Modell fand sich nur eine veränderte Phosphorylierung.

Es gibt aber auch Belege dafür, dass die AKT auf die muskuläre Insulin-Resistenz kaum Einfluss hat. Kim YB *et al.* [1999] untersuchten AKT-Aktivität und Phosphorylierung im Skelettmuskel vor und nach einer Insulin stimulierten Glukose-Aufnahme. Probanden waren schlanke-, übergewichtige Gesunde und übergewichtige Typ II-Diabetiker. Die basale AKT-Aktivität und die Aktivität nach der Insulin-Stimulation (die stets eine Stimulation der AKT bewirkte) zeigten keinen Unterschied zwischen Gesunden, Adipösen und Diabetikern. AKT-1/ 2-Aktivität und Glukose-Aufnahmerate korrelierten nicht. Die Glukose-Verteilung und Glykogen-Synthase-Aktivität wiesen bei Diabetikern deutliche Unterschiede auf. Auch eine reduzierte IRS-1- und IRS-2-assoziierte PI3K-Aktivität wurde bei ihnen gefunden. Die verminderte Metabolisierung bei Adipösen und Diabetikern könnte also unabhängig vom AKT-Signaling sein. Möglicherweise differieren *in vivo* und *in vitro* Ergebnisse.

### 1.5.5. Die Phosphoinositide-dependent kinase-1

Alessi und James *et al.* [1997] klonierten im Skelettmuskel von Hasen die PDK-1 (Phosphoinositide-dependant protein kinase-1), auch PDPK-1 genannt. PDPK wird hier wegen der Verwechslung mit der ebenfalls behandelten Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase (PDK) geführt. Genort ist 16p3.3 [Stephens *et al.*]. Homologie-Vergleiche der PDPK-1-cDNA-Sequenz zeigten die ubiquitäre Expression in Säuger-Gewebe sowie Ähnlichkeit mit einem Drosophila-Gen (protein kinase DSTPK61) [Alessi *et al.* (a); Stephens *et al.*]. Bei Mäusen gibt es Splice-Varianten [Dong *et al.* 1999], die stärkste mRNA-Expression findet sich in Hoden, Hirn und Herz.

Die PDPK-1 liegt stromab der PI3-Kinase. Einen Überblick geben Hansen *et al.* [1999] sowie Cohen [1999]. Die Interaktion mit PIF (PDPK-Inhibiting factor) hemmt einige ihrer Funktionen. Ihre Aktivierung erfolgt durch PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> und PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, „second

messenger“-Produkte der PI3K. Nur in ihrer Gegenwart aktiviert die PDPK-1 Mitglieder der AGC-Kinase-Familie (s.o.) sowie PKB/AKT [Alessi *et al.* (c,d), Stephens *et al.*] oder PKC- $\xi$  [Bandyopadhyay *et al.* 1999].

PKC und PKB unterliegen einer PDPK-1 abhängigen Thr-Phosphorylierung an homologen Stellen einer Aktivierungsdomäne im Molekül [Bandyopadhyay *et al.* 1997]. Bei der AKT ist dies Thr<sup>308</sup> [Wick *et al.*], was zu einer Autophosphorylierung der Akt an Ser<sup>473</sup> führt und nicht durch eine vermutete PDPK-2 bedingt ist [Toker *et al.* 2000]. Die 3 AKT-Isoformen werden dabei gleichermaßen stark aktiviert [Walker *et al.*].

Die PDPK-1 mediiert neben der insulinstimulierten GLUT4-Translokation in L6-Myotuben und Adipozyten [Alessi *et al.*, Bandyopadhyay *et al.* 2000 u.a.] auch mitogene Signale des Insulins [Alessi (d)]. Sie aktiviert in vivo die p70S6-Kinase, in vitro führte die Phosphorylierung der katalytischen Domäne von p70 an Thr<sup>252</sup> zu einer Aktivierung von S6 und zwar unabhängig von PtdIns. Dies geschah allerdings nur, wenn weitere Stellen in der p70-Einheit PDPK-unabhängig und z.T. durch Autophosphorylierung aktiviert wurden.

Eine genetische Komponente der Insulin-Resistenz bei NIDDM Patienten und deren Verwandten auf Höhe der PKB oder der PDPK konnte nicht nachgewiesen werden [Hansen *et al.*].

Meyer *et al.* [2002] untersuchten die Auswirkungen von Troglitazon auf das Insulin-Signalverhalten bei Diabetes-gefährdeten Personen und fanden für die PDPK-1 keine veränderte Proteinexpression unter der Wirkung von Troglitazon.

#### **1.5.6. Die Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase-Isoenzyme**

Der oxidative Glukose-Metabolismus wird durch den Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex (PDC) reguliert. Das Multi-Enzymsystem katalysiert die oxidative Decarboxylierung des bei der Glykolyse entstehenden Pyruvats zu Acetyl-CoA. Der PDC wird durch die Pyruvat-Dehydrogenase-Phosphatase aktiviert und durch die Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase (PDK) inhibiert.

PDK 1-4 sind Isoformen mitochondrialer Serinkinasen. Die Sequenzen der humanen PDK-1 und -2 sind homolog zur Ratte. Dort ist eine gewebespezifische mRNA-Expression nachgewiesen [Bowker-Kinley *et al.*]: PDK-1 wird besonders im Rattenherz exprimiert, PDK-2 wird, von Milz und Lunge abgesehen, ubiquitär gleich stark exprimiert. PDK-3 war am stärksten im Rattenhoden und die PDK-4 hauptsächlich in Skelett- und Herzmuskel vertreten. Die höchste spezifische Aktivität wies PDK-3 auf, sie betrug das 25-fache der PDK-2 [Gudi *et al.*]. Die an synthetischen Derivaten gemessenen Substrat-

Bindungskonstanten variierten erheblich. Die PDK reagieren *in vivo* auf Stimuli durch Stoffwechselprodukte besonders aus der Fettsäure-Oxidation und aus dem PDC. PDK-1 und PDK-2 schienen die höchste Aktivierung durch NADH und Acetyl-CoA zu erfahren, während PDK-3 und -4 durch NADH alleine wenig und in Kombination mit Acetyl-CoA kaum stärker aktiviert wurden. Dies sind weitere Hinweise für die gewebsspezifische Regulation des PDC.

Bei der Regulation des PDC durch die PDK unterscheidet man Lang- und Kurzzeit- Effekte. Ein Kurzzeit-Effekt ist die Änderung von Ruhe zu körperlicher Aktivität, man findet eine Aktivierung der PDK durch Acetyl-CoA und NADH, der PDC wird inhibiert.

Langzeit-Veränderungen bei diabetischer Stoffwechsellage und Fasten sind unzureichend untersucht. Bei beiden herrscht ein Mangel an verfügbaren Kohlenhydraten, die den PDC nicht durchlaufen sollen, weil sie zur Ernährung glukoseabhängiger Organe benötigt werden. Die Energie-Gewinnung findet vermehrt über die  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren statt. Der PDC wird dabei durch eine Veränderung des Phosphorylierungszustandes stärker inhibiert.

Bei diabetischen- [Hutson *et al.*] und gefasteten Ratten [Kerbey *et al.*] ließ sich eine gesteigerte Aktivität der PDK-Isoformen nachweisen [Stace *et al.*]. Es werden auch Genexpressionsänderungen als Pathomechanismus diskutiert. Bei Insulin-Resistenz könnte eine mangelnde Herunter-Regulation der PDK-mRNA die Ursache der resultierenden, zu hohen PDK-Proteinexpression sein. Diese verhindert durch eine Inhibition des PDC eine adäquate Glukose-Oxidation zur Energiegewinnung, was zu einer vermehrten Fettsäure-Verstoffwechselung führt [Majer *et al.*].

Bei Pima-Indianern ergab sich im Skelettmuskel eine positive Korrelation zwischen PDK-2 und PDK-4 mRNA-Menge und der Nüchtern-Insulin-Konzentration sowie der 2 h-Plasma-Insulin-Konzentration im oGTT. Weiter korrelierte die mRNA-Menge mit dem Körperfettanteil. Ein negativer Zusammenhang ergab sich für die PDK-2- und -4-mRNA-Menge und die insulinvermittelte Glukose-Aufnahme.

*In vitro* wurden PDK-2 und -4-mRNA als Insulin-Antwort bei einer hyperinsulinämischen, euglykämischen „Clamp“ herunter reguliert [Majer *et al.*].

Ein anderer Ansatz sieht die erhöhte  $\beta$ -Oxidation als Ursache für eine erhöhte PDK-Aktivität, die dann zur Entwicklung der Insulin-Resistenz bei Adipösen beiträgt [Peters *et al.* (a)]: Gesunde Probanden, erhielten, bei gleicher Kalorienzahl, über 3 Tage eine fettthaltige gegenüber einer normal bilanzierten Diät mit höherem Kohlenhydrat-Anteil. Bei fettreicher Kost fand sich eine erhöhte PDK-Gesamt-Aktivität in Biopsien des Musculus vastus lateralis. Die PDK-4-mRNA- und die PDK-4-Protein-Menge stiegen besonders am ersten Tag an.

PDK-2 mRNA- und Proteinexpression bleiben unbeeinflusst. Andere Isoformen wurden nicht quantifiziert.

Weitere Hinweise, dass die Genexpression der PDK-Isoformen in vitro mit der Genese des Diabetes zusammen hängt, liefern Huang *et al.* [2002]. Sie induzierten an Hepatoma Zellen Expressionssteigerungen der PDK-4 durch Glukokortikoide (einen PPAR- $\alpha$ -Agonisten) und freie Fettsäuren (die Substrate des PPAR- $\alpha$ ), die sich durch Insulinzusatz rückgängig machen ließen. Die PDK-2-mRNA-Expression wurde durch Insulin ebenfalls herabgesetzt.

### 1.5.7. Die Cycline

Cycline sind Protoonkogene, die in Tumoren häufig überexprimiert sind [Rosenberg *et al.*]. Sie gehören zu den Proteinen, die den Zell-Zyklus durch Interaktion mit den Cyclin-dependent-kinases (CDK) steuern [Nigg]. Die CDK / Cyclin-Komplexe phosphorylieren Proteine, die die bei der Replikation beteiligten Gene kontrollieren. Cyclin-D1 steuert wahrscheinlich den Übergang von der G1- in die S-Phase [Motokura *et al.* 1993]. Das Cyclin-D1-Gen ist auch unter dem Namen PRAD1 oder D11S287 bekannt. Es ist auf Chromosom 11q13 lokalisiert [Inaba *et al.*], wurde 1991 kloniert [Motokura *et al.* 1991] und liefert zwei mRNAs (4,2 kB und 1,5 kb).

Die Differenzierung muriner C2C12-Myoblasten setzt u.a. nach Serum-Deprivation ein. Im proliferierenden Skelettmuskel wird sie unter anderem durch MyoD reguliert, ein DNA-bindendes Protein, das durch Cyclin-D1 und CDK4 inhibiert wird [Skapek *et al.*; Zhang *et al.*]. Bis 16 h nach Beginn der Differenzierung verdoppeln sich die mRNA-Spiegel von Cyclin-D1 und werden innerhalb von 42 h komplett herunterreguliert. Sie sind jedoch im Gegensatz zu anderen Cyclinen durch erneuten Serum-Zusatz wieder auf das Level undifferenzierter Zellen zu bringen [Jahn *et al.*]. Unter ähnlichen Bedingungen konnte an differenzierten Myotuben genauer gezeigt werden, dass dabei neben Cyclin-D1-mRNA auch die mRNA-Spiegel der early-response-Gene c-jun, c-myc und c-fos kurzfristig erhöht waren [Tiainen *et al.*]. Dies wird so interpretiert, dass Muskelzellen von der G0- zurück in die G1-Phase eintreten und diese partiell durchlaufen können, sofern ein adäquater mitogener Reiz besteht.

Die Progression glatter Muskelzellen in die G1-Phase ist im Zusammenhang mit Diabetes bei der Arteriosklerose-Entwicklung bedeutsam.

Es ist nachgewiesen, dass Thiazolidindione die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen hemmen [Law *et al.*]. So ist in A10-Aorten-Muskelzellen, deren Cyclin-D1-Expression mit einem Wachstumsfaktor (platelet derived growth factor (PDGF)) stimuliert wurde, die Cyclin-

D1-Protein-Menge nach TZD-Zusatz reduziert [Hupfeld *et al.*]. Durch Kombination mit Insulin wurde sogar noch eine verstärkte Wirkung des PDGF auf die Expression der wachstumsfaktor-regulierten Gene nachgewiesen [Goalstone *et al.*]. Mechanistisch ist jedoch nicht bekannt, ob die Änderung auf Transkriptionsebene oder auf der Translationsebene geschieht

Die mitogenen Effekte von Insulin werden bei C2C12-Zellen durch zwei Signalwege vermittelt, die selektiv hemmbar sind. Sowohl über die Stimulation des IRS-1 / PI3K / AKT / p70S6-Kinase-Wegs, als auch durch Aktivierung des p42 / p44 und p38 mitogen activated kinase (MAPK)-Wegs wurde die Myogenese gefördert, wobei u.a. die Cyclin-D1-Protein-Menge zunahm [Conejo *et al.*]. Wahrscheinlich spielt die PI3K eine Rolle bei der posttranskriptionalen Regulation der Cyclin-D1-Expression nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren (z.B. IGF-1). Die Aktivität des Cyclin-D1-Promotors ist bei Überexpression der PI3K gesteigert. Die Cyclin-D1- mRNA-Stabilität wird durch PI3K-Inhibitoren verringert, was für andere schnell regulierbare Gene wie c-jun, c-fos und c-myc in einer Tumorzell-Linie ausgeschlossen ist [Dufourny *et al.*].

Es besteht auch eine Assoziation mit weiteren Diabetes-induzierten Folgeerkrankungen wie z.B. der Hypertrophie der Mesangien bei der diabetischen Nephropathie. Bei STZ-diabetischen Mäusen und *in vitro* kommt es unter den hohen Glukosekonzentrationen zur Entwicklung einer renalen Hypertrophie und dabei zur Steigerung der Cyclin-D1-Protein Expression [Feliars *et al.*].

#### **1.5.8. Die Transkriptionsfaktoren c-jun, c-myc und c-fos**

Die Steuerung von Wachstum und Differenzierung geschieht nach Stimulation der Wachstumsfaktor-Rezeptoren über diverse Signalwege. Dies ist u.a. der MAPK-Weg (Abb. 3) und deren Subfamilien wie z.B. die p38 MAPK  $\alpha$ - $\delta$ , die extracellular signal-regulated kinases (ERK 1-11) [Clerk *et al.*] und c-jun NH2-terminal kinases (sog. Januskinasen-JNK1-3) [Davis]. Die JNK unterliegen dem Einfluss von 13 MAPK-Kinase-Kinasen (MAPKKK) [Johnson, GL *et al.*]. Man vermutet, dass JNK auch über die PKC- $\delta$  reguliert werden könnten [Morino *et al.*]. Ab hier verzweigen sich die Signalwege [Jun pathway map]. Johnson GL *et al.* [2002] geben einen Überblick. Die MAP-Kinase Mitglieder translozieren in den Nukleus und aktivieren letztlich u.a. Transkriptionsfaktoren wie z.B. die Protoonkogene c-jun, c-fos und c-myc. C-fos und c-jun (aus der Familie der b-ZIP-Proteine) bilden ein Heterodimer, das als activator protein-1 (AP-1)-Komplex im Nukleus direkt mit cis-DNA-Sequenzen

interagiert, die die Genexpression regulieren [Bohmann *et al.*, Chiu *et al.*, Schonthal *et al.*, Lucibello *et al.* 1988].

Malignome zeigen oft Translokationen oder Deletionen im jun-Gen [Rahmsdorf., Hattori *et al.*].

Das c-jun-Gen auf Chromosom 1p31-32 ist Intron-frei, 3,25 kB groß und kodiert mehrere etwa 39 kDa große Transkripte [Hattori *et al.*]. Die Sequenz weist eine große Homologie zum avian sarcoma virus 17 transforming protein (v-jun) auf.

Extrazelluläre Stimuli für die Aktivierung von c-jun sind: Insulin [Greene *et al.*, Lee YH *et al.*], proinflammatorische Cytokine wie z.B. TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  im Myokard [Clerk *et al.*], UV-Licht oder andere, die DNA schädigende Agenzien. Für uterines Gewebe ist eine Stimulation durch Steroide nachgewiesen [Nephew *et al.*]. Hyperglykämische Bedingungen führten in verschiedenen Zell-Modellen zur Aktivierung des MAPK-Signalwegs [Bandyopadhyay *et al.* 2000] und seiner Subfamilien JNK, ERK sowie p38 MAPK [Igarashi *et al.*, Ho *et al.*, Liu W *et al.*, Duzgun *et al.*].

Die c-jun Regulation scheint nicht nur über den MAPK-Weg zu laufen [Greene *et al.*] sondern auch über den PI3K/ AKT-Weg [Lee, YH *et al.*, Levresse *et al.*]. In Ratten-Fibroblasten, die den IR überexprimieren, fand sich eine erhöhte SAPK-1/ ERK Phosphorylierung [Morino *et al.*].

Letztlich aktivieren jedoch JNK c-jun durch eine N-terminale Phosphorylierung an Ser<sup>63</sup> und Ser<sup>73</sup>. C-jun-Protein kann ausserdem seine eigene Transkription steigern [Angel *et al.*].

Im Gegensatz zu c-jun werden c-fos- und c-myc-Expression und -Phosphorylierung als stark insulinreagibel und als gewebsabhängig beschrieben [Thompson *et al.*, Olson *et al.*, Kim SJ *et al.*].

C-fos-Protein supprimiert seine eigene Transkription [Lucibello *et al.* 1989, Sassone-Corsi *et al.*].

Die c-myc-Expression verdreifacht sich bei gesunden Probanden bereits 30 min nach einem Insulin-Stimulus, bei Insulinresistenten ist diese Antwort schwächer [Thompson *et al.*].

## 1.6. Aufgabenstellung

Der Manifestation eines Typ II-Diabetes geht stets eine Phase der peripheren Insulinresistenz voraus [Warram *et al.*], deren Induktion pathomechanistisch nicht komplett verstanden ist. Neben primär diabetogenen Faktoren, wie z.B. genetische Varianten, sind sekundäre Einflüsse involviert, zu denen exogene Bedingungen wie z.B. die Lebensweise, die Ernährung und das Altern gehören. Diese bewirken eine Modulation der von Insulin getriggerten, divergierenden Signalwege, unter anderem den Glukosetransport, die Glykogensynthese, das mitogene Signalverhalten und den Lipidstoffwechsel. Das Fettgewebe spielt dabei aus heutiger Sicht eine bedeutende Rolle, weil es ein exo- und endokrin aktives Gewebe darstellt [Mohamed-Ali *et al.*]. Es sezerniert neben weiteren Faktoren TNF- $\alpha$  [Hotamisligil *et al.* 1995]. Die Wirkung dieser Faktoren auf andere Gewebe bezeichnet man als „Crosstalk“.

Effektororgan des Crosstalks bzw. der Auswirkungen einer Insulinresistenz ist u.a. der Skelettmuskel, der sich für Studien anbietet. Die Primär-Kultur humaner Myozyten stellt ein Modell zur Untersuchung der Insulinsignalwege dar, das nah an den in vivo-Bedingungen ist und dennoch die Standardisierung der Untersuchungsbedingungen erlaubt.

Ein direkter Einfluss von Fettgewebe in und um den Muskel auf die Insulinsensitivität wurde gezeigt [Despres *et al.*, Goodpaster *et al.*]. Das von subkutanem Fett sezernierte TNF- $\alpha$  ist wahrscheinlich nicht daran beteiligt [Koistinen *et al.*]. Die Kombination beider Gewebe in einer Kultur ist von Interesse, um die Induktion einer Insulinresistenz in vitro nachzubilden.

In unserer Arbeitsgruppe ist seit kurzem ein neuartiges System etabliert, in dem Myoblasten und Präadipozyten aus Primärkulturen von Brustfett parallel ausdifferenziert und dann für 48 h zusammen in Kokultur gehalten werden. Ziel dieser Arbeit war die Evaluation von Genexpressionsänderungen, die bei der Induktion einer Insulinresistenz durch Fettgewebe auftreten. Für das methodische Vorgehen wurden zwei Strategien gewählt. Zum einen wurde in der proximalen Insulin-Signalkette für IRS-1, für das auf Proteinebene bereits Expressionsänderungen bekannt sind [Dietze *et al.*] mittels einer in dieser Arbeit etablierten semiquantitativen RT-PCR nach Genexpressionsänderungen gesucht. Dabei wurden Experimente an differenzierten Skelettmuskelzellen mit TNF- $\alpha$  in hohen Konzentrationen (2,5 nM) sowie dem neuen Antidiabetikum Troglitazon durchgeführt, um eine Einzelfaktoren-Analyse durchzuführen. Zum anderen wurde die Genexpression im Kokultur-Modell mittels eines Oligonukleotid-Arrays untersucht. Für die als verändert gefundenen Kandidatengene wurde die Proteinexpression im Westernplot überprüft und mit den für TNF- $\alpha$  gefundenen Ergebnissen verglichen, um die Rolle des TNF- $\alpha$  als Diabetogen besser zu verstehen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterialien

#### Chemikalien:

1 kB DNA-Marker	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
1 kB plus DNA-Marker	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
Agarose	Sigma, Deisenhofen
Anti-human-Aktin C2-IgG <sub>1</sub> -Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti human-PDK-2-Antikörper	Arbeitsgruppe Harris*
Anti mouse-IgG-Antikörper, HRP-konjugiert	Promega, Madison USA
Anti-rabbit-IgG-Antikörper, HRP-konjugiert	Promega, Madison USA
BSA (Bovines Serum-Albumin), reinst	Roche Diagnostics, Mannheim
BCA Protein Assay reagent	Pierce, Rockford, USA
Bio-Rad-Protein Assay	BioRad, München
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Chloroform, p.a.	Merck, Darmstadt
Cortisol	Sigma, Deisenhofen
Coomassie-Brilliant Blue R250	Sigma, Deisenhofen
DAPI (4,6-Diamino-2-phenylidole) „Vectashield“	Vector Laboratories, Burlingame, USA
DEPC (Diethyl-Pyrocbonat)	Sigma, Deisenhofen
DMEM (Dulbecco's Minimal Essential Medium)	Biochrom, Berlin
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma, Deisenhofen
DNase I (Desoxyribonuclease I, Amplific. Grade)	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
DNase I Reaktionspuffer 10 x	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
dNTP (je 10 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
DTT (Dithiothreitol)	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
EDTA (Ethylendiamin-tetraacetat)	Sigma, Deisenhofen
EGTA (Ethylenglycol-bis(β-aminoethylether)N,N,N',N',-tetraessigsäure)	Sigma
Ethanol, p.a.	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
ExcelGel Pufferstreifen	Amersham Biosciences, Freiburg
ExcelGel SDS Gradienten Gel 8-18 %	Amersham Biosciences, Freiburg
Fötale Kälber Serum	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
Formaldehyd (37 % in aq)	Merck, Darmstadt
Fluoreszenz-Mounting-Medium	DAKO, Hamburg
Gene ruler 100 bp Ladder plus,	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Gentamycin	Sigma, Deisenhofen
Glycerol	Merck, Darmstadt
HAM's F12-Medium	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
HBSS (Hepes buffered balanced salt solution)	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
Hering-Sperma-DNA	Serva, Heidelberg
Insulin (human)	Hoechst, Frankfurt
Isoamylalkohol, p.a.	Merck, Darmstadt
Isopropanol, p.a.	Merck, Darmstadt
Kollagenase (230-250 U/mg)	Biochrom, Terre Haute, USA
Magermilch-Pulver	Supermarkt

$\alpha$ -MEM-(Modified Eagle Medium) pH 7,4	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
MMLV-Reverse-Transkriptase H <sup>-</sup>	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
MOPS (3-N-Morpholino-Propancarbonsäure)	Sigma, Deisenhofen
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumdeoxycholat	Sigma, Deisenhofen
Natriumfluorid	Sigma, Deisenhofen
Natriumorthovanadat	Sigma, Deisenhofen
NP-40: Nonidet P40-Ersatz	Fluka, Deisenhofen
Oligo-dT <sub>12-18</sub> Primer	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
Orange G	Sigma, Deisenhofen
PBS Dulbecco's steril	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
Petroleum-Benzin	Roth, Karlsruhe
Phenol (f. Molekularbiol. Tris-stabilisiert pH 7,8)	Roth, Karlsruhe
Ponceau S	Sigma, Deisenhofen
Primer	MWG-Biotech, Ebersberg
Protease-Inhibitor Cocktail Complete	Roche Diagnostics, Mannheim
Protein-Marker Prestained	New England Biolabs, Frankfurt
Protein-Marker Broad Range	New England Biolabs, Frankfurt
PVDF-Blotmembran	Sigma, Deisenhofen
Q-Solution 5 x:	Qiagen, Hilden
Reaktionspuffer pH 8,3 (f. PCR)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
RNase away-Lösung	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
RNase out recombinant Rnase inhibitor (40U/ $\mu$ l)	Invitrogen, Karlsruhe
SDS (Sodiumdodecylsulfate ultra pure)	Roth, Karlsruhe
Serumalbumin Fraktion V (Rind)	Roche Diagnostics, Mannheim
Skelettmuskelzellen	PromoCell, Heidelberg
Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate	Pierce, Rockford, USA
Supplemet pack „Skeletal muscle cell growth medium“	PromoCell, Heidelberg
Supplemet pack „Skeletal muscle cell differentiation medium“	PromoCell, Heidelberg
Taq DNA-Polymerase rekombinant (1 U/ $\mu$ l)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$ (human, rekombinant)	Sigma, Deisenhofen
3,3',5'-Triiodo-L-Thyronin (T3)	Sigma, Deisenhofen
Transferrin	Sigma, Deisenhofen
TRIS Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan	ICN Biomedicals, Eschwege
TRIzol-Reagenz	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
Troglitazon	Sankyo Research Institute, Tokyo
Trypsin/EDTA-Lösung	PromoCell, Heidelberg
Trypsin-Inhibitor	PromoCell, Heidelberg
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen
Tween 20 (Polyoxyethylen Sorbitan Monolaurat)	Sigma, Deisenhofen
Western Blot Stripping buffer	Pierce, Rockford, USA
Xylencyanol	Sigma, Deisenhofen

\* Der polyklonale PDK-2-Antikörper wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Harris selber generiert und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Adresse : Department of Biochemistry und Molecular Biology, Indiana University School of Medicine, 635 Barnhill Drive, Indianapolis IN 46202-5122, USA.

**Geräte und Verbrauchsmaterialien**

Array "GEArray Human PI3-Kinase & AKT Pathway"	Superarray Inc., USA
Blotting-Apparatur Pharmacia LKB (Novablot)	Amersham Pharmacia, Freiburg
Brutschrank	Haereus, Düsseldorf
Faltenfilter 595 (110 mm Ø)	Schleicher & Schuell, Dassel
Folienschweiß-Gerät	Haushaltswarengeschäft
Hybridisierungsöfen Hybaid	
Kryo-Einfrier-Gefäße	Nunc, Wiesbaden
LUMI-Imager + Lumi Analyst Software	Roche Diagnostics, Mannheim
Membran N-Kultureinsätze 0,4 µm	Falcon, über P. Oehmen, Essen
Mikroskop IX70 mit Kamera SC 35	Olympus, Hamburg
PCR-Gerät: Trio Thermoblock	Biometra, Göttingen
PhosphoImager FUJIX BAS 1000	Fuji Company, USA
Phosphoimaging Plate BAS-MP for BAS 1000	Fuji Medical Systems, Stamford, USA
Phosphoimaging: SSG Imaging Plate Cassette, Fuji	Medical Systems, Stamford, USA
Polypropylen-Siebe (Porendurchmesser 150 µm)	Merck, Darmstadt
Probenauftragsplättchen 1 x 0,5 cm	Amersham Pharmacia, Freiburg
PVDF- Immobilon-0,45 µm P Blot Membran	Millipore, Schwalbach
Reaktionsgefäße 500 µl, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Spektrophotometer BECKMAN DU 7400	Beckman
Sterilbank: Haereus Laminair	Haereus, Düsseldorf
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Whatmanpapiere (f. Blot) MUNKTELL 1F	Amersham Pharmacia, Freiburg
Zell-Sieb (Strainer) (Porendurchmesser 70 µm)	Falcon, über Oehmen, Essen
Zellschaber	Renner GmbH, Darmstadt
Zentrifuge Eppendorf 5417R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Haereus Labofug 4R	Haereus, Düsseldorf

Sterile Plastikware wurde bezogen von Falcon sowie Beckten & Dickinson (über P. Oehmen GmbH, Essen); Nunc, Wiesbaden: Schalen, Röhrchen m. Schraubdeckel 15 ml, 50 ml, Zellkulturflaschen, -schalen, Serologische Pipetten, Röhrchen mit Deckel 50/ 15 ml

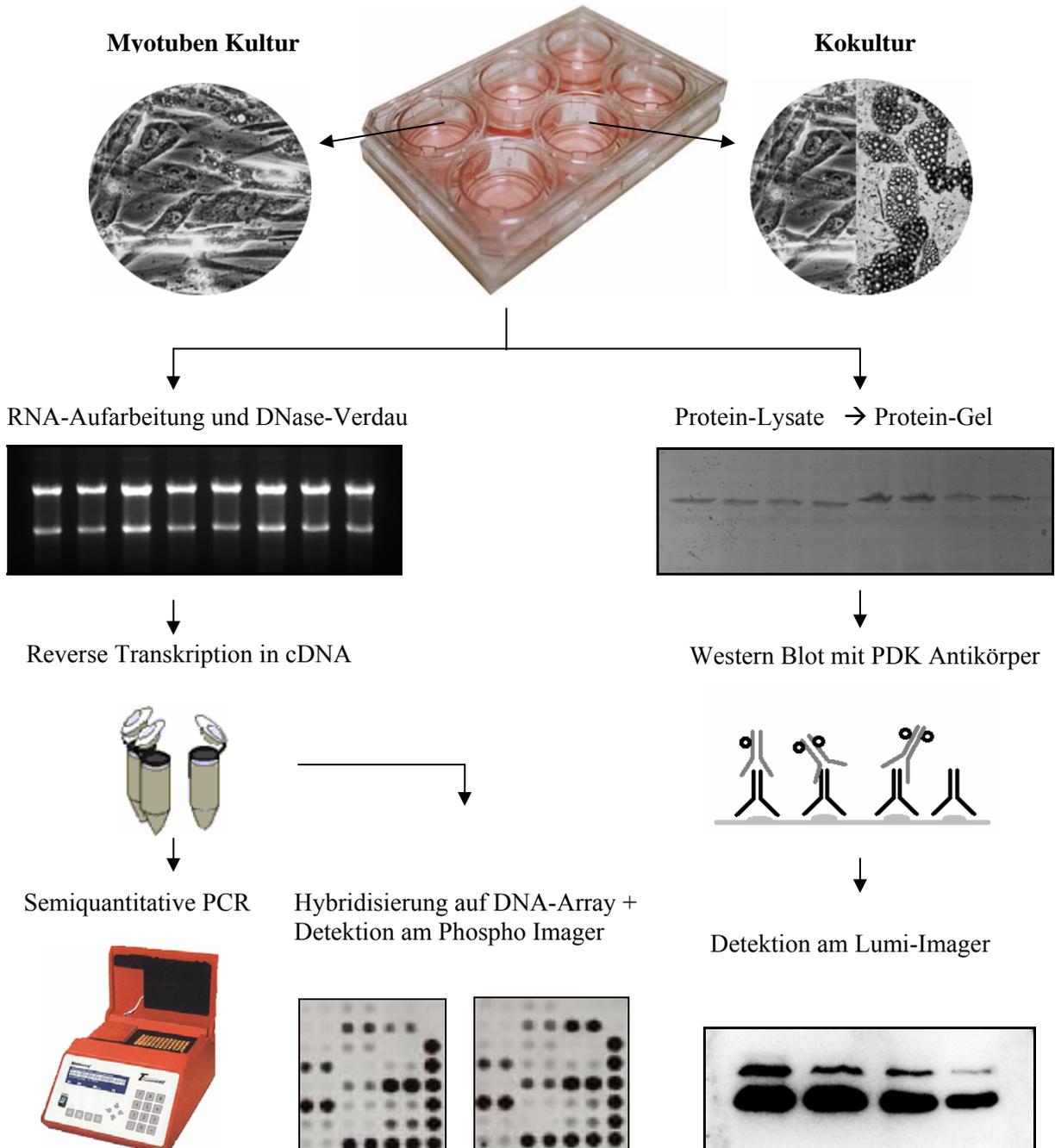
**2.2. Experimenteller Ablauf der vorliegenden Arbeit**

**A) Myozyten-Kultur**

1. Kultur der Myoblasten bis zur Konfluenz (7 d)
2. Differenzierung zu Myotuben (7 d)
3. Serumfreies Zellkultur-Medium (1 d)
4. Einsatz als Kontrolle, in der Kokultur oder Behandlung mit TNF- $\alpha$  (2 d)

**B) Kokultur mit Adipozyten**

1. Präparation einer Primärkultur von Präadipozyten (1-2 d)
2. Differenzierung zu Adipozyten (15 d)
3. Gewöhnung an das Myozyten-Medium (1 d)
4. Kokultur mit Myozyten (2 d)



**Abb. 4: Schematische Darstellung der experimentellen Vorgehensweise in der Arbeit**

## 2.3. Zellkultur

### 2.3.1. Kultur der humanen Skelettmuskelzellen

#### Angaben von der die humanen Myoblasten vertreibenden Firma PromoCell

Die in dieser Arbeit verwendeten humanen quergestreiften Skelettmuskelzellen stammten aus Extremitäten-Muskeln von Spendern zwischen 5 und 28 Jahren ohne chronische Erkrankungen.

Die Gewebe fallen bei Operationen ab. Die Isolation der Myoblasten als Primärkultur erfolgt beim Hersteller durch Trypsin-Verdau und Entfernung der Fibroblasten mit fibroblastenspezifischen „Magnetic-bead-Antikörpern“. Die Zellen wurden vom Hersteller mit einem Myosin-Antikörper auf ihre Differenzierungsfähigkeit nach Ausdifferenzierung in der 3. Passage getestet. Verdopplungszeiten (30-72 h) und die Wachstumsraten wurden bestimmt. Die Kulturen wurden auf Abwesenheit von Bakterien, Pilze und Mykoplasmen sowie auf HIV und Hepatitis B und -C negativ getestet. Die Myoblasten waren bei Erhalt in der 2. Passage und lassen sich noch 8 bis 15 mal subkultivieren, bevor ihre Teilungsfähigkeit verloren geht. (Anm.: Unsere Kulturbedingungen eigneten sich für maximal 3 weitere Passagen).

Alle Zellkultur-Schritte erfolgten unter einer Sterilbank und bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % KO<sub>2</sub> (v/v) gehalten. Alle Lösungen waren steril.

#### Basal-Zellkultur-Medien

##### Wachstums-Medium:

α-MEM + HAM'S F12 (1:1; je nur ½ für 1l vorgesehene Menge an Pulver)

##### Differenzierungs-Medium: α-MEM

Das Pulver wurde in bidest. Wasser gelöst, steril filtriert und bei 4 °C bis zu 5 Monate lichtgeschützt aufbewahrt.

#### Differenzierungs-Medium

##### 500 ml α-MEM:

Fötales Kälber Serum (FKS)	2 %
Insulin **	10 µg / ml
Amphotericin B	50 ng / ml
Gentamycin	50 µg / ml

#### Wachstums-Medium

**500 ml α-MEM/F12** + Supplement pack\* „growth“ bestehend aus:

Fötales Kälber Serum (FKS)	5 %
Fetuin	0,5 mg / ml
Basic fibroblast factor	1 ng / ml
Epidermal growth factor	10 ng / ml
Insulin **	100 µg / ml
Dexamethasone	0,39 µg / ml
Amphotericin B	50 ng / ml
Gentamycin	50 µg / ml

\*Die Supplement packs waren bei -20 °C bis zu 6 Monate haltbar.

\*\* Nach Insulin-Zusatz war das Medium 6 Wochen bei 4 °C haltbar.

**Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$** 

TNF- $\alpha$  (human, rekombinant, 17 kDa)  
0,01  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (=588 nM) in PBS / 0,1% BSA  
wurde aliquotiert in 42,5  $\mu\text{l}$  Portionen.  
Ein Aliquot wurde auf 10 ml Medium zur  
Herstellung einer 2,5 nM-Lösung gegeben.

**Einfrier-Medium**

10 % DMSO  
20 % FKS  
70 % Wachstums-Medium  
(steril filtrieren)

**Troglitazon**

MW 441,55 g/mol, (1  $\mu\text{M}$  = 0,44  $\mu\text{g} / \text{ml}$ )  
Die maximale Blutkonzentration nach oraler Gabe von 200 mg Troglitazon in Studien  
betrug 0,5-1,0  $\mu\text{g} / \text{ml}$  (Herstellerangabe)

200 mM Lsg: 88,31 mg / ml TRO in DMSO (stets frisch ansetzen), dann vorverdünnen  
mit BSA 20 % oder serumhaltigem Medium (steigert die Löslichkeit von TRO) und  
reduziert den DMSO-Anteil. Endkonz (5  $\mu\text{M}$  = 2,2  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ).

**Anzucht und Vermehrung der Zellen**

Die Zellen wurden als Myoblasten in Proliferation oder tiefgefroren geliefert, in flüssigem Stickstoff gelagert und bei Bedarf zügig aufgetaut, um Schäden durch das Einfriermedium zu minimieren. Wachstums-Medium (200  $\mu\text{l} / \text{cm}^2$  Wachstumsfläche) wurde im Brutschrank vorgewärmt. Das Zell-Pellet wurde im Medium suspendiert und mit der gewünschten Zellzahl auf die Zellkultur-Flaschen verteilt (3500-5000 Zellen /  $\text{cm}^2$ ). Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel, um Reste des Einfrier-Mediums zu entfernen. Danach wurde das Medium 3 mal pro Woche gewechselt. Ab 80 % Konfluenz erfolgte die Passagierung (nach ca. 1 Woche).

**Trypsinisierung**

Das Wachstums-Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit HBSS gewaschen. Die Zellen wurden mit 100  $\mu\text{l} / \text{cm}^2$  Trypsin/EDTA für 3 bis maximal 5 Minuten im Brutschrank inkubiert. Das Ablösen wurde unter dem Mikroskop kontrolliert und durch sanftes Klopfen gegen die Kulturgefäße beschleunigt. Das Trypsin wurde weitgehend abgesaugt und 50  $\mu\text{l} / \text{cm}^2$  Trypsin-Neutralisierungs-Lösung zugesetzt. Die Lösung wurde in der Pipette suspendiert, um Zellklumpen zu separieren und wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Die Flaschen wurden mit 50  $\mu\text{l} / \text{cm}^2$  Trypsin-Inhibitor nachgespült und die Lösung zur Zellsuspension hinzugefügt. Die Suspension wurde bei 1200 rpm (250 g) 4 min bei 20 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1 - 2 ml Wachstums-Medium gelöst und die Zellen gezählt. Die Zellen wurden entweder portioniert und eingefroren, dazu wurden

Aliquots mit 1-3 Mio. Zellen entnommen, erneut abzentrifugiert, das Pellet in 1 ml Einfrier-Medium gelöst und in Kryo-Röhrchen überführt oder die Zellen wurden in einer Dichte von 5000 / cm<sup>2</sup> in Wachstums-Medium ausgesät (20 ml pro 175 cm<sup>3</sup>-Flasche). Das Medium wurde einmalig bereits nach 24 h gewechselt.

### Zellzählung mit Trypanblau

100 µl Trypanblau, 80 µl Wachstums-Medium und 20 µl Zell-Suspension wurden vermischt, in ein Hämatocytometer (Neubauer-Zählkammer) gegeben und unter dem Mikroskop ausgezählt. Der Mittelwert aus 4 Großquadraten wurde mit dem Verdünnungsfaktor (hier 10) und mit dem Koeffizienten 10<sup>4</sup> multipliziert und ergab die Zellzahl pro ml.

### Differenzierung der Skelettmuskelzellen und Verwendung für Experimente

Für Experimente wurden stets Myoblasten der 2. bei uns durchgeführten Passage (= 4. Passage seit Kulturbeginn) verwendet. Pro 35 mm Ø Kultur-Schale (= 9,5 cm<sup>2</sup> je im „6 well“) wurden 100.000 Zellen ausgesät (ca. 10000 Zellen / cm<sup>2</sup>) und mit 2 ml Wachstums-Medium bedeckt. Ein Medium-Wechsel erfolgte 3 mal wöchentlich. Die Konfluenz war nach 7 Tagen erreicht, dann erfolgte der Wechsel zu Differenzierungs-Medium in gleichen Mengen und gleichem Rhythmus über 7 Tage. Differenzierte Myotuben sind polyploid und bilden ein Synzytium mit langen Zellfortsätzen. 24 h vor Differenzierungsende wurden die Myozyten in ein serumfreies Differenzierungs-Medium (für die Kokultur mit Zusatz von 10<sup>-12</sup> M Insulin) überführt, damit Serum-Effekte ausgeschlossen waren. Dann erfolgte die Behandlung der Zellen mit TNF-α (2,5 nM), Troglitazon (5 µM) oder die Kokultur mit Adipozyten über 48 h.

### 2.3.2. Isolation und Kultur primärer, humaner Adipozyten

#### DMEM/F12; pH 7,4 - (2 l)

DMEM Pulvermedium für 1 l  
 HAM's F12 Pulvermedium für 1 l  
 33 µM Biotin (16 mg)  
 17 µM D-Panhotenat (8 mg)  
 15 mM HEPES (7,14 g)  
 14 mM NaHKO<sub>3</sub> (2,4 g)  
 aqua bidest. ad 2000 ml

(vor der Steril-Druckfiltration den pH 0,1-0,3 Einheiten niedriger einstellen)

#### Kollagenase-Lösung

frisch ansetzen und steril filtrieren:  
 10 mM PBS (Ca + Mg frei!) pH 7,4  
 0,05 % Kollagenase TypI (200 U/mg)  
 2 % BSA

#### Erythrozyten-Lyse-Puffer pH 7,3

155 mM NH<sub>4</sub>Cl  
 5,7 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
 0,1 mM EDTA x 2 H<sub>2</sub>O

<b>Adipozyten Differenzierungs-Medium</b> (FKS-frei)		<b>DMEM/F12 + 10 % FKS</b> 500 ml DMEM/F12, 50 ml FKS, 2,5 ml Gentamycin (10 mg / ml)
DMEM/F12	(100 ml)	<b>Start-Medium zur Differenzierung</b> 100 ml Adipozyten Differenzierungs-Medium 100µl Troglitazon in DMSO (1µl/ml)
1 nM T3 (L-Thyronin)	(50 µl)	
66 nM Insulin	(300 µl)	
100 nM Kortisol	(100 µl)	
10 µg / ml Transferrin	(1000 µl)	
50 µg/ml Gentamycin	10 mg/ml (500 µl)	

Die Isolation der primären Adipozyten erfolgte nach einer Modifikation von Rodbell (1964). Die adipogene Differenzierung erfolgte nach einer Methode von Hauner *et al.* (1989). Alle Zellkultur-Schritte erfolgten unter einer Sterilbank und bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % KO<sub>2</sub> (v/v) gehalten. Alle Lösungen waren steril.

### Isolation von Präadipozyten

Weiblichen, gesunden, nichtdiabetischen Spenderinnen mit einem BMI von 20-26 kg/m<sup>2</sup> wurde während plastisch-chirurgischer Operationen Brust-Fett entnommen. 50-100 g Gewebe wurde in DMEM/F12-Medium bei RT transportiert und unter der Sterilbank mit Schere und Pinzette makroskopisch von Drüsen-Gewebe und Blut-Gefäßen befreit. Etwa 10 g Gewebe (10-15 ml Volumen) wurden in ein vorgewogenes 50 ml Röhrchen gegeben, mit der Schere zu einer breiartigen Konsistenz zerkleinert und das Gewicht ermittelt. Pro Gramm Fettgewebe wurden 3 ml frisch angesetzte Kollagenase-Lösung zugesetzt. Die Röhrchen wurden im Wasserbad bei 37 °C in horizontaler Lage 90 Minuten unter Agitation (80 Schläge / min) inkubiert. Es sollten keine größeren Fettgewebstücke mehr erkennbar sein. Anschließend wurden die Proben bei max. 200 g (hier 1000 rpm) für 10 min zentrifugiert. Der Überstand aus Lipiden, reifen Adipozyten, und Kollagenase-Lösung wurde bis auf 2 (- 3) ml abgenommen und darauf geachtet, dass der Ölfilm komplett entfernt war. Im Pellet befinden sich Präadipozyten, Erythrozyten, Zelldetritus und Bindegewebe. Das Restvolumen wurde 1: 10 mit Erythrozyten-Lyse-Puffer versetzt und mit der Pipette suspendiert. Die Lösung wurde frei durch Polypropylen-Siebe filtriert, um Bindegewebe zu entfernen. Eine ausreichende Lyse der Erythrozyten war nach 10 min erreicht, es folgte eine 10 minütige Zentrifugation bei 200 g. Der Überstand wurde abgenommen, dem Pellet wurden 3 - 4 ml DMEM/F12-Medium zugesetzt und sorgfältig resuspendiert. Die Präadipozyten-Suspension wurde durch einen Zell-Sieb (Porendurchmesser 70 µm) gegeben und anschließend die Zelldichte bestimmt.

Dazu wurden 50 µl Trypanblau-Lösung mit 50 µl Zellsuspension vermischt und in einem Hämatozytometer (Neubauer Zählkammer) ausgezählt. Der Mittelwert der 4 Großquadrate multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor (hier 2) und dem Koeffizienten  $10^4$  lieferte die Zellzahl pro ml.

### **Differenzierung der Präadipozyten zu Adipozyten**

Die Aussaat erfolgte in DMEM/F12-Medium mit 10 % FKS-Zusatz in permeablen Zellkultur-Sieb-Einsätzen (Membran N-) mit einer Dichte von ca. 30.000 (- 75.000) Präadipozyten / cm<sup>2</sup>. Die Zellen wurden bis zur Adhärenz nach 16 h im Brutschrank belassen, bevor die Differenzierung begonnen wurde.

Dazu wurden die Präadipozyten 2-fach mit warmem, sterilem PBS gewaschen und die Lösung mit reduziertem Sog und stets an der gleichen Stelle abgesaugt, da die Zellen kaum am Untergrund haften. Um die Differenzierung zu starten, wurde am Differenzierungs-Tag 1 Adipozyten Start-Medium verwendet (FKS-frei, mit Troglitazon-Zusatz, da FKS Adipozyten inhibiert). Nach max. 72 h wurde das Medium ersetzt durch Troglitazon-freies Differenzierungs-Medium, das bis zum Differenzierungs-Tag 14 in 2 - 3-tägigen Abständen gewechselt wurde. Ab dem 14. Tag erfolgten die Vorbereitungen für die Kokultur.

### **2.3.3. Kokultur humaner Skelettmuskelzellen mit Adipozyten**

Die Kokultur ist ein neu etabliertes System, das unter kontrollierten Bedingungen die Untersuchung der Effekte von Fettzellen auf Muskelzellen erlaubt.

Adulte Adipozyten (Differenzierungstag 14) wurden in serumfreies Myozyten-Differenzierungsmedium mit  $10^{-12}$  M Insulin überführt. Am nächsten Tag (15) erfolgte ein Austausch gegen frisches Medium. An diesem Tag bekamen auch differenzierte Myozyten (Differenzierungstag 6) serumfreies Myozyten-Differenzierungsmedium mit  $10^{-12}$  M Insulin (s.o.). Nach 1 Tag Gewöhnung erfolgte am nächsten Tag (Differenzierungs-Tag 7 der Myozyten / 16 der Adipozyten) die Kokultur. Das Medium beider Zellen wurde abgesaugt, die Adipozyten wurden mitsamt ihrem Kulturschalen-Einsatz in die Myozyten-Schalen überführt, die Myozyten erhielten 3 ml Medium, auf die Adipozyten im Sieb wurden zusätzlich 2 ml Medium gegeben. Das Verhältnis Myozyten zu Adipozyten betrug etwa 3 : 1. Die Kokultur mit den Myozyten erfolgte für 48 h.

## 2.4. Genexpressions-Studien mittels semiquantitativer RT-PCR

### 2.4.1. RNA-Isolation aus humanen Skelettmuskelzellen und DNase-Behandlung

Die RNA-Isolation erfolgte nach der modifizierten Phenol-Guanidiniumisothiocyanat-Methode (Chomczynski, 1987) mit TRIzol Reagenz. Um eine Kontamination durch RNasen zu vermeiden, wurden die Arbeitsflächen mit Rnase-ZAP behandelt und mit destilliertem Wasser gespült. Wässrige Lösungen (wie z.B. 75 % EtOH) wurden mit DEPC-Wasser angesetzt. Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße wurden vor Gebrauch autoklaviert. Alle Inkubationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur, alle Zentrifugations-Schritte bei 4 °C.

#### **DEPC-Wasser**

1. 0,1 % Diethyl-Pyrocyanat (DEPC)-Lösung in bidestilliertem Wasser für 24 h unter dem Abzug stehen lassen (Kanzerogen beim Ansetzen)
2. Lösung autoklavieren (DEPC wird zu CO<sub>2</sub> und Wasser umgesetzt)

Vor der Lyse wurden die Zellen 2-fach mit warmer PBS-Lösung gewaschen. Anschließend wurde je 6-well Schale 1 ml TRIzol zugesetzt, die Zellen mit einem Zell-Schaber unter Mikroskop-Kontrolle vom Untergrund gelöst und in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach 10 min Inkubation wurden 200 µl Chloroform pro ml TRIzol zugesetzt, 10 s geschüttelt (Vortex) und der Beginn der Phasentrennung nach 2-3 min abgewartet. Dann wurde die Probe 15 min bei 12000 g zentrifugiert. Ca. 600-700 µl der wässrigen Oberphase mit der gelösten Gesamt-RNA wurden mit einer 200 µl Pipette vorsichtig abgenommen, ohne die Interphase zu berühren und wurden mit dem gleichen Volumen an Isopropanol versetzt und für 10 min inkubiert. Der Fällungsansatz wurde 10 min bei 12000 g zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Präzipitat wurde durch Zugabe von 1 ml 75 % Ethanol/DEPC-Wasser von mitgefälltem Salz befreit und 5 min bei 7500 g zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde nach dem Abdekantieren des Überstands ca. 3 min im offenen, auf den Kopf gedrehten Reaktionsgefäß an der Luft getrocknet und in 20 µl DEPC-Wasser aufgenommen. Dann wurde die Probe 10 min bei 60 °C im Eppendorf-Thermomixer erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Im Anschluss erfolgte der DNase-Verdau oder eine Lagerung bei -80 °C.

#### **DNase-Behandlung**

Durch die DNase-Behandlung werden Fehler durch native DNA-Verunreinigungen vermieden. Im Array blockiert native DNA die Bindungsstellen auf der Membran, so dass radioaktiv markiertes Material nicht binden kann. Von allen Proben wurde das gleiche

Volumen entnommen und der Mix für die DNase-Behandlung zugesetzt. Dieser setzte sich wie folgt zusammen:

x µl	RNA-Lsg. (bis 10 µg)
10 µl	DNase I Reaktionspuffer (10 x)
1 µl	DNase I (10 U / µl)
ad 100 µl	DEPC-Wasser

Die Lösung wurde 15 min bei Raumtemperatur inkubiert (bei längerer Dauer kommt es zur  $Mg^{2+}$ -abhängigen Hydrolyse der RNA), dann wurde jeder Probe 10 µl EDTA-Lösung 25 mM zugesetzt, die Endkonzentration sollte mindestens 2 mM betragen. Es folgte eine 10 min Hitzeinaktivierung der DNase bei 65 °C und eine Isolation der RNA mit 900 µl TRIzol wie beschrieben. Die Probenkonzentrationen wurden anschließend fotometrisch ermittelt.

#### **2.4.2. Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der RNA**

Eine Qualitätskontrolle der RNA erfolgte durch fotometrische Messung und Agarose-Gel-Elektrophorese, zwei sich ergänzende Methoden. Im Fotometer können nur Protein-Verunreinigungen über den  $A_{260/280}$ -Quotienten nachgewiesen werden, nicht aber DNA-Kontaminationen, weil RNA und DNA gleiche Absorptionsmaxima besitzen. Das Maß der Degradation durch RNasen kann ebenfalls nicht nachgewiesen werden, da freie Nukleotide genauso zur Absorption beitragen, wie intakte RNA. Erst im denaturierenden Gel lässt sich die Qualität anhand der ribosomalen Banden beurteilen. Eukaryonte RNA zeigt zwei Banden, die nach ihren Sedimentationsgrößen in Svedberg Einheiten 28 S und 18 S benannt sind.

#### **Konzentrations- und Reinheitsbestimmung durch UV-Absorptions-Spektrometrie**

Nukleinsäuren haben Absorptionsmaxima bei 260 nm. Proteine mit aromatischen Resten absorbieren bei 280 nm, weshalb sich die Reinheit über die Ratio der Absorptionswerte abschätzen lässt. Eine reine 40 mM RNA-Lösung besitzt bei 260 nm ( $A_{260}$ ) eine Absorption von 1 und eine  $A_{260} / A_{280}$  Ratio von 2. Multiplikation der untergrundkorrigierten Absorption mit dem Verdünnungsfaktor und dem Koeffizienten 40 ergibt die RNA-Konzentration. Die Mindestkonzentration zur photometrischen Bestimmung beträgt 0,25 mM (Lottspeich, Auflage 1998). 0,5 µl der RNA-Lösung wurde 1:100 in 10 mM TRIS/HCL pH 7,8 verdünnt und in einer Quarzküvette (50 µl) im Photometer die Absorption gemessen. Jede Probe wurde mindestens doppelbestimmt. Nur RNA mit einer  $A_{260} / A_{280}$ -Ratio größer als 1,60 wurde weiter verwendet.

### Qualitätsbestimmung und Mengenkontrolle durch Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese fraktioniert Nukleinsäuren im elektrischen Feld nach ihrer Größe. Um ein unterschiedliches Wanderungsverhalten gleich großer Fragmente aufgrund der Ausbildung von RNA-Sekundärstrukturen zu vermeiden, müssen die Proben vor dem Auftragen denaturiert und in einem denaturierenden Gel getrennt werden.

#### 10 x MOPS-Puffer

##### Puffer (vor Licht schützen)

0,2 M MOPS  
0,05 M Natriumacetat  
0,05 M EDTA  
bidestilliertes Wasser  
mit 5 M NaOH auf pH 7 bringen

#### Denaturierendes Formaldehyd-Gel 1%

1 g Agarose +  
72 ml bidest. Wasser aufkochen,  
  
10 ml MOPS Puffer (10 x)  
17,8 ml Formaldehyd-Lsg (37 %) zusetzen,  
unter Rühren abkühlen, gießen (100 ml)

#### 5 x RNA-Ladepuffer

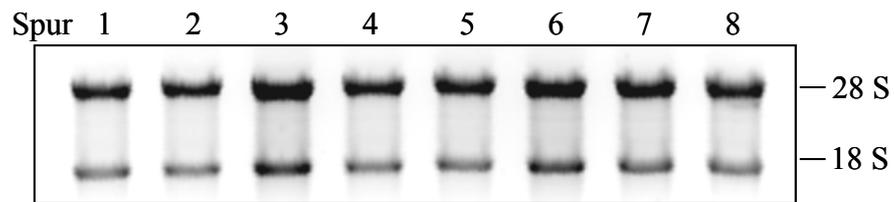
(zur Gelelektrophorese)

0,25 % Orange G  
30 % Glycerol  
bidestilliertes Wasser

#### Probenpuffer für 2,25 µl RNA-Lösung

1 µl MOPS (10 x)  
5 µl deionisiertes Formamid  
1,75 µl Formaldehyd  
2 µl RNA Ladepuffer (5 x)  
0,5 µl Ethidiumbromid-Lösung (1 %)  
Σ 10,25 µl je Probe

Pro Reaktionsgefäß wurden 10,25 µl Probenpuffer und 1 µg RNA in bis zu 2,25 µl Volumen pipettiert. Das Gemisch wurde 10 min bei 65 °C im Thermoblock denaturiert, 10 min auf Eis abgekühlt und dann auf ein denaturierendes 1 %iges Formaldehyd-Agarose-Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte 1 h bei 100 V (5 V / cm) in 1 x MOPS Puffer. Das Gel wurde mit einer digitalen Kamera (Lumi-Imager) unter UV-Licht aufgenommen und invertiert dargestellt. Mit dem Softwareprogramm Lumi-Analyst wurde die Pixeldichte gleichgroßer Flächen über den Banden bestimmt und untergrundkorrigiert. Die Pixeldichte ist der Bandenstärke und somit der eingesetzten RNA-Menge proportional. Idealerweise beträgt das Verhältnis der 28 S zu 18 S Banden 2 : 1. Verunreinigungen entlang der Laufstrecke weisen auf Degradation durch RNasen hin, diese Proben sind nicht zu verwenden. Über die Mengenunterschiede von Spur zu Spur ließen sich Mess-Ungenauigkeiten im Fotometer, die durch Absorption freier Nukleotide entstehen, abschätzen. Das Ergebnis einer Gelelektrophorese zeigt Abb. 5, die Quantifizierung zeigt Tab. 1. Bei Abweichungen > 20 %, entsprechend dem maximalen Fehler durch Auftragung und Färbung, erfolgte ein Mengen-Angleich im RT-PCR-Ansatz, z.B. für die Proben in Spur 3 u. 6 in Abb. 5.



**Abb. 5: RNA-Qualitätskontrolle in einem denaturierenden 1 %igen Formaldehyd-Gel**

Nach der fotometrischen Messung wurde das 1  $\mu\text{g}$  entsprechende Volumen an RNA-Lösung aufgetragen und die Elektrophorese bei 100 V für 1 h in 1 x MOPS-Puffer durchgeführt. Das Gel wurde im Ethidiumbromidbad gefärbt und unter UV-Licht fotografiert. Das invers dargestellte Gel wurde densitometrisch ausgewertet.

**Tab. 1: Verhältnis der 28 S zu 18 S Banden in der RNA-Gelelektrophorese**

Spur	1	2	3	4	5	6	7	8
28 S [%]	100	100	100	100	100	100	100	100
18 S [%]	53	51	62	50	50	57	51	49

### 2.4.3. Reverse Transkription zur Herstellung einer cDNA aus Gesamt-RNA

Die Herstellung einer Erststrang-cDNA aus mRNA erfolgte in einem 20  $\mu\text{l}$  Ansatz. 2  $\mu\text{g}$  RNA wurden in 9  $\mu\text{l}$  DEPC-Wasser gelöst und 1  $\mu\text{l}$  (0,5  $\mu\text{g}$ ) Oligo-dT<sub>12-18</sub> Primer hinzu pipettiert. Nach einem 10 minütigen Denaturierungsschritt bei 65 °C und einer 10 minütigen Inkubation in Eiswasser wurden 9  $\mu\text{l}$  eines RT-Mix aus folgenden Komponenten zugesetzt:

4  $\mu\text{l}$  Reaktionspuffer pH 8,3 (5 x)  
 2  $\mu\text{l}$  0,1 M DTT  
 1  $\mu\text{l}$  dNTP's (je 10 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP)  
 2  $\mu\text{l}$  RNase Inhibitor (20 U /  $\mu\text{l}$ ).  
 -----  
 $\Sigma$  9 $\mu\text{l}$  RT-Mix

Der Ansatz wurde 2 min bei 37 °C im Thermomixer unter leichter Agitation präinkubiert, bevor je 1  $\mu\text{l}$  RNase<sup>-</sup>-MMLV-Reverse-Transkriptase zugeben wurde. Die cDNA-Synthese erfolgte bei 37 °C und wurde nach 50 min durch eine 15 min Hitze-Inaktivierung des Enzyms bei 70 °C beendet. Die Proben wurden 1 zu 20 mit DEPC-Wasser verdünnt (Endkonzentration etwa 0,1 $\mu\text{g}$  /  $\mu\text{l}$ ) und bei -20 °C gelagert.

#### 2.4.4. Semiquantitative RT-PCR, Primer-Sequenzen und PCR-Parameter

Die Primer sind so gewählt, dass sie auf genomischer Ebene ein Intron einschließen. Da das Intron in der mRNA nicht mehr enthalten ist, können genomische Verunreinigungen der Probe an der Produktgröße erkannt werden, da die gewünschten PCR-Produkte kleiner sind.

##### Primer-Sequenzen:

<b>β2-Microglobulin</b>	Gene bank accession no: AB021288,	Produkt 139 bp
5' Primer (Sense-)	Nukleotide 1498-1516:	5'-TTC AGC AAG GAC TGG TCT-3'
3' Primer (Antisense-)	Nukleotide 2265-2252:	5'-CTG CTT ACA TGT CTC GAT-3'

<b>IRS-1</b>	Gene bank accession no: D23673,	Produkt 220 bp
5' Primer (Sense-)	Nukleotide 2212-2228:	5'-AGT GGC CAT GGC TCC AC -3'
3' Primer (Antisense-)	Nukleotide 2416-2432:	5'-TTG CAA CCC ATG CAG AT -3'

<b>TNFR1 (60 kDa-Form)</b>	Gene bank accession no: M58286,	Produkt 375 bp
5' Primer (Sense-)	Nukleotide 415-435:	5'-CAG GAT ACG GAC TGC AGG GAG -3'
3' Primer (Antisense-)	Nukleotide 769-789:	5'-ATT CTC AAT CTG GGG TAG GCA -3'

0

<b>TNFR2 (80 kDa-Form)</b>	Gene bank accession no S63368,	Produkt 319 bp
5' Primer (Sense-)	Nukleotide 62-80:	5'-GCT CGC CGG GCC AAC ATG C-3'
3' Primer (Antisense-)	Nukleotide 361-380:	5'-GGC TTG CAC ACC ACG TCT GA -3'

Die lyophilisierten Primer wurden zur Herstellung einer 100 µM Lösung in der vom Hersteller angegebenen Menge in bidestilliertem Wasser gelöst. Die genaue Konzentration in µg/ml wurde photometrisch bei  $A_{260}$  bestimmt. Mittels der molaren Masse wurde die Konzentration in pmol/µl berechnet und aus der Stocklösung eine 10 µM Arbeits-Lösung angesetzt. Aliquots mit 50 µl wurden bei -20 °C eingefroren.

##### Semiquantitative RT-PCR

Für die Etablierung wurde überprüft:

1. Die Annealing-Temperaturen der Primer, die MgCl<sub>2</sub>-Konzentration und die eingesetzte cDNA-Menge wurden auf die maximale Produktbildung ohne Nebenbanden hin optimiert.

2. Einflüsse von Pipettier-Differenzen in der PCR. Es wurden von einer cDNA zwei PCR-Reaktionen durchgeführt und beide Produkte auf einem Gel aufgetrennt.
3. Die Auswirkungen von Pipettier-Differenzen beim Auftragen auf das Gel wurden durch doppeltes Auftragen einer PCR-Probe auf dasselbe Gel evaluiert.
4. Die Einflüsse der Elektrophorese z.B. durch Verwendung verschiedener Kammern oder minimaler Dicken- oder Konzentrationsunterschiede der Gele, wurden geprüft durch Auftragen einer Probe auf zwei verschiedene Gele, die in verschiedenen Kammern aufgetrennt aber gleichzeitig gefärbt wurden.

Zusammenfassend ergab sich: Eine cDNA-Probe braucht in der PCR nicht doppelbestimmt zu werden, es sollten aber mehrerer cDNAs zu einer experimentellen Bedingung eingesetzt werden, da bei der reversen Transkription Unterschiede auftreten. Jede PCR-Probe sollte man doppelt auf das Gel auftragen, um Gel-Inhomogenitäten auszuschließen. Zwei in verschiedenen Ethidiumbromid-Bädern bzw. zu unterschiedlichen Zeiten gefärbte Gele sind untereinander nicht vergleichbar, Probenreihen müssen auf einem Gel aufgetragen werden.

Die PCR wurde wie unten angegeben in 50 µl Ansätzen durchgeführt: Auf Eis wurde ein Mastermix zusammen pipettiert, der bis auf die in einem Volumen von 10 µl gelöste cDNA alle PCR-Komponenten enthielt. Die benötigte cDNA-Menge und Wasser ad 10 µl wurden für jede Probe einzeln in ein Reaktionsgefäß pipettiert und anschließend 40 µl des Mastermix zugesetzt und gemischt. Die PCR-Reaktionen wurden in 200 µl Gefäßen durchgeführt.

#### **Auftragspuffer 10 x**

50 % Glycerol,  
2 % Xylenecyanol  
1 mM EDTA  
bidestilliertes Wasser

#### **Annealing-Temperaturen**

##### **optimiert:**

IRS-1 alleine: 57 °C  
β2-MG alleine: 53°C  
Multiplex PCR: IRS-1 + β2-MG: 56°  
  
TNFR-1: 57°C  
TNFR-2: 59°C

#### **PCR Ansatz je Probe:**

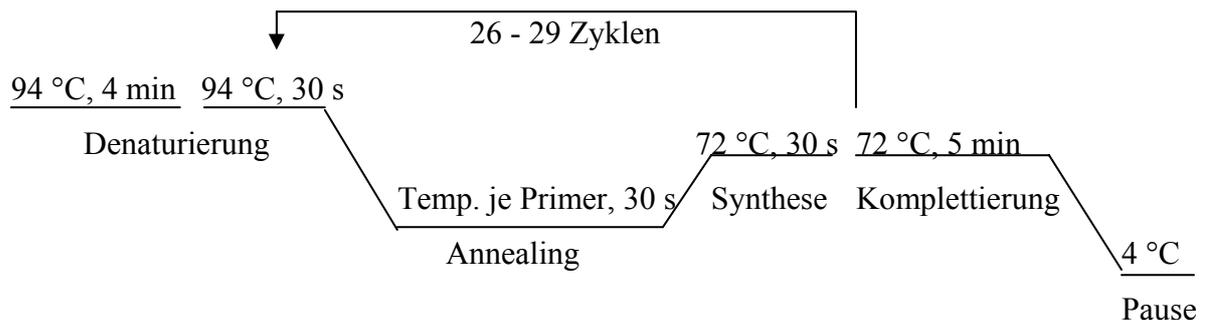
50 - 100ng cDNA (5 -10µl) + Wasser ad 10 µl  
+  
5 µl Reaktions-Puffer 10 x mit 25mM MgCl<sub>2</sub>  
10 µl Q-Solution 5 x  
1 µl dNTP Lösung 10 mM je dNTP  
2 µl IRS-1 Primer (sense) 10 pmol / µl  
2 µl IRS-1 Primer (antisense) 10 pmol / µl  
1 µl β2-MG Primer (sense) 10 pmol / µl  
1 µl β2-MG Primer (antisense) 10 pmol / µl  
0,4 µl Taq DNA-Polymerase (5 U / µl)  
H<sub>2</sub>O ad 40 µl

Σ 50 µl Gesamtansatz je Probe

Vorraussetzungen für eine Multiplex-PCR sind:

1. Geringe Interaktion der beiden Primer-Paare, um Nebenreaktionen auszuschließen.  
Mittels des PC-Programms „Gene runner“ war sichergestellt, dass sich die Primer-Paare kaum beeinflussen, damit die Produkt-Amplifikation nicht gehemmt wird und sich keine Nebenprodukte bilden.
2. Ähnliche Annealing-Temperaturen beider Primer für maximale DNA-Bindungs-Stringenz.
3. Vergleichbar große Amplikons, um kongruente Syntheseraten im PCR-Zyklus zu erreichen.
4. Analoge Anfangskopienzahlen der Gene, um bei PCR-Beginn gleichartige Amplifikationsraten zu erreichen, da in späteren Zyklen das häufigere Produkt öfter amplifiziert und die Reaktion somit verfälscht wird. Die Amplifikation des in geringerer Kopienzahl vorliegenden Gens kann in den ersten Zyklen durch eine erhöhte Primer-Menge gegenüber dem zweiten Primer-Paar positiv beeinflusst werden.

#### PCR-Programm:

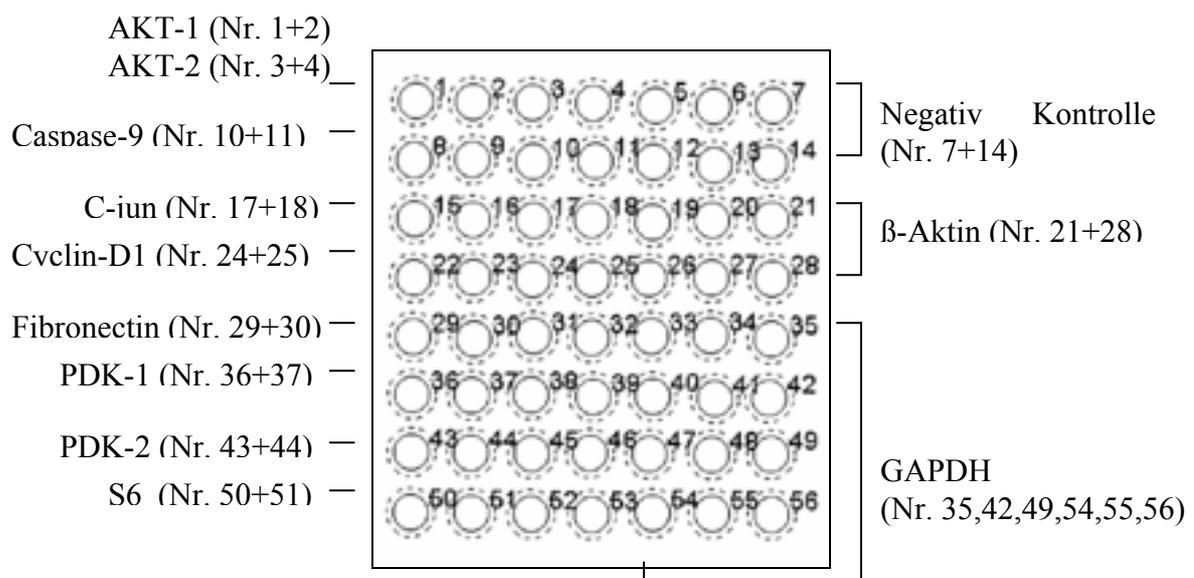


**Abb. 6: Schema des PCR-Programms: Zeitangaben [min]; Temperaturangaben [°C]**

15 µl jedes Ansatzes wurden mit 10 x Auftragspuffer vermischt und auf einem 2 %igen Agarosegel 1 h bei 100 V (5 V/cm) in 1 x TBS aufgetrennt. Das Gel wurde für 20 min in einem Ethidiumbromid-haltigen Wasser-Bad gefärbt, unter UV-Licht mit einer digitalen Kamera aufgenommen, invers dargestellt und mit der Lumi-Analyst-Software analog zu den RNA-Gelen quantitativ ausgewertet. Als Größen-Standard dienten der 1 kb-Marker und der 1 kb plus-DNA-Marker. Im ersten Versuch wurden zunächst gleiche Volumina der verdünnten cDNA-Lösung für eine PCR eingesetzt. In weiteren Vorversuchen erfolgte ein Abgleich der β2-MG Banden durch Variation der cDNA-Mengen, um eine ähnliche β2-MG-Bandenstärke zu erhalten. Bei Intensitäts-Abweichungen der Haushalts-Gene >25 % auf dem Ethidiumbromid-Gel erfolgte ein Mengengleich der cDNA im nächsten Experiment, da bei großen Mengendifferenzen die Amplifikation unterschiedlich beeinflusst wird.

## 2.5. Genexpressions-Studien mittels eines radioaktiven cDNA-Arrays

Der Nylon-Array "GEArray Human PI3-Kinase- & AKT-Pathway" wurde verwendet, um eine größere Anzahl von Genen in Bezug auf eine Expressionsänderung zu untersuchen. Es waren zwei identisch mit 56 Oligonukleotid-Spots von 26 verschiedenen Genen beschichtete Membranen vorhanden. Die Gene waren doppelbestimmt, eines 6-fach. An die Oligonukleotid-Spots bindet radioaktiv markierte cDNA abhängig von ihrer Menge. Mit Hilfe der Intensität der Radioaktivität lassen sich Aussagen über Genexpressionsänderungen machen. Dazu ist allerdings die Normierung über ein Haushalts-Gen notwendig, da die Membranen nicht direkt vergleichbar sind. Zwei RNA-Proben z.B. ein Experiment und eine Kontrolle wurden in einer reversen Transkription mit einem radioaktiven Phospho-Tri-Nukleotid (\*P-dCTP) markiert und als cDNA-Lösung auf den Array gegeben. Bei der entsprechenden Temperatur hybridisierte die markierte cDNA mit der ihr auf dem Array entsprechenden Gensequenz. Unspezifische Bindungen mussten durch Vorinkubation mit fremder DNA (Sheard-Hering-Spearm-DNA) blockiert werden. Abb. 7 zeigt schematisch den Aufbau des Arrays. Die einzelnen Oligonukleotid-Spots erhielten eine Nummer, neben der Darstellung des Arrays sind die wichtigsten Gene mit ihrer Nummer dargestellt. Im Anschluss zeigt Tab. 2 eine vollständige Liste der auf dem Array vorhandenen Gene und ihre Datenbank Nummer.



**Abb. 7: Schematischer Aufbau des Arrays**

Die Spots der einzelnen Gene sind mit Nummern versehen. Neben der Bezeichnung des Gens steht am Rand die Nummer der Gene, die im Array-Experiment eine stärkere Expression aufwiesen.

**Tab. 2: Liste der auf dem „Human PI3-Kinase & AKT-Pathway“-Array vorhandenen Gene**

<b>UniGene Nr.</b>	<b>Gen-Bank Nr.</b>	<b>Gen-Name</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Platz-Nr.</b>
Hs. 71816	NM_005163	AKT-1	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	1, 2
Hs. 200816	M77198	AKT-2	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2	3, 4
Hs. 76366	U66879	Bad	BCL-2 agonist of cell death	5, 6
Hs. 79241	M14745	Bcl-2	B-cell CLL/ Lymphoma 2	8, 9
Hs. 100641	U60521	Caspase-9 (Mch6)	Apoptosis related cysteine protease	10, 11
Hs. 74552	NM_004346	Caspase-3 (cpp32)	Apoptosis related cysteine protease	12, 13
Hs. 25647	V01512	c-fos	Human cellular oncogene c-fos	15, 16
Hs. 78465	AF022805	c-jun	v-jun avian sarcoma virus 17 oncogene homolog	17, 18
Hs. 79070	J00120	C-myc	v-nmyc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog	19, 20
Hs. 79194	NM_004379	CREB	Human transactivator protein CREB	22, 23
Hs. 82932	M64349	Cyclin-D1	Cyclin-D1	24, 25
Hs. 2007	U08137	Fas ligand	Ligand für Fas	26, 27
Hs. 118162	X02761	Fibronectin-1	Fibronectin-1	29, 30
Hs. 14845	AF041336	FKHRL-1	Homo sapiens forkhead protein	31, 32
Hs. 78802	NM_002093	GSK-3	Glycogen-Synthase-Kinase 3 beta	33, 34
Hs. 2256	X07819	MMP-7	Matrix Metalloproteinase 7 (Matrilysin, Uterin)	36, 37
Hs. 86858	M60724	P70S6Kinase	Ribosomale Protein 6 kinase,70 kD	38, 39
Hs. 154729	Y15056	PDK-1 (PDPK)	3-Phosphinositide-dependent protein kinase-1	40, 41
Hs. 92261	NM_002611	PDK-2	Pyruvate-dehydrogenase-kinase-2	43, 44
Hs. 3312	NM_006219	PI3-Kinase p110a	Phosphinositide-3-kinase, Katalytische Untereinheit	45, 46
Hs. 10712	U96180	PTEN	Phosphatase & Tensin homolog	47, 48
Hs. 85181	X03484	Raf (c-raf-1)	v-raf-1 murine leukaemia viral oncogene homolog	50, 51
Hs. 217493	NM_001010	S6	Ribosomal protein 6	52, 53
Hs. 180952	X00351	$\beta$ -Aktin	Beta-Aktin (Haushalts-Gen)	21, 28
Hs. 74456	M33197	GAPDH	Glyceraldehyd-3Phosphat-dehydrogenase (Haushalts-Gen)	35, 42, 49, 54, 55, 56
		pUC18	Bakterien-Plasmid (neg. Kontrolle)	7, 14

### 2.5.1. Vorbereitungen

#### Sheared Hering-Sperm DNA

Zum Blockieren unspezifischer Bindungen der Array-Membran benötigt man kurzmolekulare DNA-Stücke. Diese erhält man, indem man käufliche Heringssperma-DNA starken Scherkräften aussetzt (z.B. in einer Spritze) und die DNA mit Phenol-Chloroform isoliert.

#### PCI-Lösung

Phenol, Chloroform, Isoamylalkohol 25 : 24 : 1 (v / v / v)

Eine 10 mg / ml Lösung von Hering-Sperma DNA in DEPC-Wasser wurde 5 h gerührt, bis alles gelöst war. Mit 1 M NaCl wurde die Endkonzentration auf 0,1 M gebracht. Die DNA-Lösung wurde 1:1 (v / v) mit geschüttelter PCI-Lösung versetzt und gemischt. Es wurde bei 4 °C für 5 min bei 12000 g zentrifugiert und die wässrige Oberphase abgenommen. Die proteinhaltige Zwischenphase wurde zurückgelassen. Dieser Schritt wurde wiederholt, bis keine Zwischenphase mehr vorhanden war. Mit einer 17 G Kanüle wurde die Lösung 12 mal mit einer Spritze auf und ab gezogen, um die DNA zu fragmentieren. Nach Zusatz von 0,7 Volumen eiskaltem Isopropanol zu 1 Volumen DNA-Lösung und einer 15 min Inkubation auf Eis wurde die DNA gefällt und bei 12000 g und 4 °C 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert, das Pellet mit 75 % Ethanol gewaschen, erneut 5 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde luftgetrocknet und in wenig DEPC-Wasser aufgenommen. Die OD<sub>260</sub> wurde gemessen und die Konzentration der Sheared-Hering-sperm DNA-Lösung mit DEPC-Wasser auf 10 mg / ml eingestellt und bei -20 °C eingefroren.

#### Vorbereitung der Array Membranen

##### 10x dNTP-Mix

50 µM dCTP (0,001M) 2,5 µl

5 mM dATP (0,1M) 2,5 µl

5 mM dGTP (0,1M) 2,5 µl

5 mM dTTP (0,1M) 2,5 µl

40 µl Wasser RNase frei

Σ 50 µl Gesamtvolumen

##### 5x GEA Markierungspuffer

50 µl 10x dNTP-Mix

50 µl 10x RT Puffer

1 µl DTT 1M

Σ 101 µl Gesamtvolumen

Sheared Hering-Sperm-DNA 10 mg / ml wurde aufgetaut, 5 min bei 95 °C hitzedenaturiert und auf Eis abgekühlt. GEAhyb-Hybridisierungslösung wurde auf 68 °C erwärmt, um ausgeflockte Partikel zu lösen. 30 ml Lösung wurden entnommen und mit 300 µl der Hering-

Spearm-DNA-Lösung vermischt (Endkonzentration 100 µg/ml). Die Lösung wurde bei 68 °C warm gehalten.

Die Array-Membranen wurden durch Anfeuchten mit bidestilliertem Wasser regeneriert und in Folie eingeschweißt. Eine Ecke wurde aufgeschnitten und je Membran 10 ml der Hybridisierungslösung zugesetzt, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren. Die Arrays wurden bei 68 °C im Hybridisierungsöfen für 2 h präinkubiert. Die restlichen 10 ml der Lösung wurden zur Hybridisierung der Proben auf dem Array benötigt.

### **Wiederverwertung der Membran nach einem Versuch**

Nach Beendigung der Detektion wurde 0,5 % SDS-Lösung (verdünnt aus der 20 x-Lösung) in der Mikrowelle aufgeköcht und in zwei 100 ml Glasflaschen gefüllt. Die Membranen wurden mit einer Pinzette in die Glasflaschen überführt, diese verschlossen und für 10 min im Hybridisierungsöfen unter Rotation auf 98 °C gehalten. Die Flaschen wurden entnommen und die Lösungen für 10 min bei Raumtemperatur abgekühlt. Die Lösung wurde abdekantiert und für wenige Minuten gegen 2 x SSC-Lösung (verdünnt aus der 20 x-Lösung) ausgetauscht. Die Arrays wurden entnommen und feucht eingeschweißt. Die verbliebene Restradioaktivität wurde zur Kontrolle der Reinigung durch Auflegen auf einen Film für 4 Tage bestimmt und mit dem Werten vor der Reinigung verglichen. Die Array-Membranen wurden bis zur Wiederverwendung bei -20 °C tiefgefroren. Jeder Array wurde wie vom Hersteller empfohlen maximal 3 x verwendet.

### **Vorbereitung der Proben im 500 µl Eppendorf-Gefäß:**

Je Probe wurden 10 µg RNA (DNase behandelt, in RNase-freiem Wasser gelöst) mit 2 µl GEA Primer-Mix versetzt und mit Wasser zu einem Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt.

Für 2 Proben wurde ein Master-Mix unter Zusatz der Radioaktivität hergestellt. Alle radioaktiven Schritte erfolgten hinter einer geeigneten Plexiglas-Abschirmung, Arbeitsflächen und Materialien wurden mit einem Geigerzähler auf Kontaminationen überprüft.

#### **40 µl Master-Mix**

16 µl 5 x GEA Markierungs-Puffer
10 µl [ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]-dCTP (10 mCi / ml)
2 µl RNase-Inhibitor (20 U / µl)
4 µl MMLV Reverse-Transkriptase (200 U / µl)
8 µl Wasser (RNase-frei)
<hr/>
Σ 40 µl Gesamtvolumen

### 2.5.2. Reverse Transkription und Einbau von radioaktiv markiertem [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]-dCTP

Der Proben-Mix wurde im Thermomixer 2 min bei 70 °C denaturiert und sofort danach 2 min bei 42 °C in einem zweiten Thermomixer inkubiert. Auch der Markierungs-Mix wurde 2 min bei 42 °C präinkubiert und dann je 20  $\mu\text{l}$  auf beide Proben-Ansätze verteilt (Endvolumen: 40  $\mu\text{l}$  je Probengefäß). Durch Pipettieren wurde gemischt, und die cDNA-Synthese für 25 min bei 42 °C unter Schütteln durchgeführt. Die reverse Transkription wurde durch Zusatz von je 5  $\mu\text{l}$  10 x Stop-Lösung beendet. Nicht eingebautes  $^{32}\text{P}$  musste nicht aus der Probe entfernt werden. Die Proben wurden durch je 5  $\mu\text{l}$  Denaturierungs-Lösung und Inkubation bei 68 °C für 20 min denaturiert. Es folgte eine Neutralisierung mit je 50  $\mu\text{l}$  2 x Neutralisierungslösung für jeden 50  $\mu\text{l}$  Probenansatz (Gesamtvolumen 100  $\mu\text{l}$  je cDNA-Probe). Alternativ wurde mit [ $\alpha$ - $^{33}\text{P}$ ]-dCTP gleicher Aktivität wie beschrieben markiert.

### 2.5.3. Hybridisierung und Detektion der markierten cDNA-Proben im Array

Der Hybridisierungs-ofen wurde auf 68 °C vorgeheizt. Die verbliebenen 10 ml Hybridisierungslösung (s.o.) wurden aufgeteilt und zu je 5 ml die markierte cDNA-Probe (100  $\mu\text{l}$ ) hinzu pipettiert. Die eingeschweißte Membran wurde an der Ecke aufgeschnitten, die Blockierungslösung abdekantiert, die Probenlösung (5,1 ml) hinzu pipettiert und die Membran blasenfrei eingeschweißte. Die Arrays wurden zur Sicherheit ein zweites Mal eingeschweißte um bei Undichtigkeiten ein Auslaufen zu vermeiden. Da zur Hybridisierung nur Flaschen zur Verfügung standen, wurden die Membranen mit der beschichteten Seite nach innen um ein mit Papier umwickeltes 15 ml Falcon-Röhrchen gelegt, das das Kollabieren in der Flasche verhindern sollte und faltenfrei in die Flaschen geschoben. In diesen wurde bei 68 °C über Nacht (12 h) bei einer Rotation von max. 30-40 / min hybridisiert.

#### Waschschritte:

**20 x SSC-Stammlösung (1 l)**

175.3 g NaCl  
88.2 g Natrium Citrat-Dihydrat  
ad 1000 ml mit bidest. Wasser auffüllen  
den pH mit 1 M HCl auf 7.0 einstellen

**20% SDS-Stammlösung (1 l)**

200 g SDS Sodium dodecyl sulfate  
ad 1000 ml mit bidest. Wasser auffüllen,  
ggfs. bei 65 °C lösen

**Waschlösung I: 2 x SSC mit 1 % SDS**

100 ml 20 x SSC  
50 ml 20 % SDS  
ad 1000 ml mit bidest. Wasser auffüllen

**Waschlösung II: 0,1 x SSC mit 0,5 % SDS**

5 ml 20X SSC  
25 ml 20% SDS  
ad 1000 ml mit bidest. Wasser auffüllen

Waschlösung I wurde in der Mikrowelle auf max. 68 °C erhitzt und zwei 100 ml Glasflaschen damit befüllt. Die eingeschweißten Membranen wurden nacheinander aufgeschnitten und die Lösungen in den Radioaktiv-Abfall abdekantiert. Die Membranen wurden mit einer Pinzette in die Glasflaschen überführt, diese verschlossen und für 20 min bei 68 °C im Hybridisierungs-Ofen unter Rotation gewaschen. Die Lösung wurde abpipettiert und der Waschschriff ein zweites Mal mit frischer Lösung I wiederholt.

Waschlösung II wurde ebenfalls in der Mikrowelle auf max. 68 °C erhitzt und gegen Waschlösung I ausgetauscht. Wieder wurde unter Rotation für 20 min bei 68 °C gewaschen. Auch dieser Schritt wurde ein zweites Mal wiederholt. Danach wurden die Arrays mit der Pinzette dem Gefäß entnommen, auf eine Folie gelegt und feucht blasenfrei eingeschweißt.

Die Membranen wurden in einer Phosphoimager-Filmkassette mit Klebeband fixiert und der Phosphoimager-Film aufgelegt. Nach 3 - 5 Tagen Exposition wurde der Film mit einem Phosphoimager ausgelesen. Dabei wurden mehrere Expositionszeiten gewählt um die optimalste auswählen zu können.

## 2.6. Proteinexpressions-Studien

### 2.6.1. Lyse der Protein-Proben und Protein-Bestimmung nach Bradford

#### RIPA Basis-Puffer

(Endkonzentrationen):

1 % (v / v) NP40-Ersatz  
 0,25 % Natrium-Deoxycholat  
           (10 % Stammlsg. in aq)  
 1 mM EGTA (100 mM Stock)  
 50 mM Tris / HCl pH 7,4  
 150 mM NaCl

#### RIPA-Lysispuffer (Endkonzentrationen)

am Versuchstag frisch vorbereiten:

1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (200 mM Stammlösung)  
 1 mM NaF (aus 200 mM Stammlösung)  
 40 µl / ml 25x Protease-Inhibitor Cocktail  
 Komplete (25 x Stammlösung = 1 Tablette auf  
 2 ml aq)  
 Ripa Basis-Puffer

#### Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> Aktivierung: (Aliquots werden eingefroren)

1. Stamm-Lösung 200 mM in bidest. Wasser ansetzen
2. pH auf 10 mit 1 N NaOH einstellen (gelbe Lsg.)
3. Kochen bis die Lösung klar ist (10 min)
4. Abkühlen und pH auf 10 einstellen (ggfs. nochmals aufkochen)
5. Lösung aliquotieren und bei -20 °C einfrieren

Aus jedem Kokultur-Experiment zu dem eine Array-Untersuchung mit RNA erfolgte, wurden parallel von jedem Spender Proben zur Gewinnung von Proteinen kultiviert. Je Experiment wurden Kontrolle und Kokultur-Probe doppelt oder 3-fach bestimmt und lysiert. Für 100.000 ausgesäte Zellen (ca. 10.000 Zellen / cm<sup>2</sup>) im 6 well (9,5 cm<sup>2</sup>) wurden je 50 µl RIPA-Puffer zugesetzt und auf Eis mit dem Zellschaber die Zellen abgekratzt. Die Lysate wurden bei 4 °C für 2 h auf dem Überkopfschüttler zum besseren Aufschluss geschüttelt (Frequenz 10 / min). Anschließend wurden die Zellmembran-Reste durch eine 15 min Zentrifugation bei 12000 g abgetrennt. Der Überstand wurde bei -20 °C bis zum Gebrauch tiefgefroren.

### **Protein-Bestimmung nach Bradford**

Zunächst wurde eine Kalibrierung durchgeführt. Dazu wurde eine Stammlösung BSA 1mg / ml in bidestilliertem Wasser angesetzt und eine Reihe mit 0, 1, 2, 5, 7, 10, 12, 15 und 20 µl BSA-Lösung und Wasser ad 800 µl pipettiert. Protein-Assay-Reagenz wurde parallel durch einen Faltenfilter filtriert. Die Protein-Proben wurden 1 : 20 oder 1 : 40 mit bidest. Wasser auf 100 µl vorverdünnt. Von der Vorverdünnten Lösung wurden je 10, 20 und 40 µl in eine Plastikkuvette pipettiert und mit bidestilliertem Wasser bis 800 µl aufgefüllt. Dann wurden jeweils 200 µl Protein-Assay-Reagenz mit einer Multipette zugesetzt. Die Proben wurden mit einem Stäbchen vorsichtig gerührt, ohne Luftblasen zu erzeugen und für 10 min zur Farbentwicklung stehen gelassen. Die Absorption bei 595 nm wurde im Spektralfotometer gemessen. Leerwert war Wasser mit dem Protein-Assay-Reagenz.

### **2.6.2. SDS-Gel-Elektrophorese**

#### **4 x Laemmli-Puffer**

250 mM Tris  
8 % (w / v) SDS  
40 % (w / v) Glycerol  
10% (w / v) Mercaptoethanol  
0,2 % (w / v) Bromphenolblau

Je 20 µg Gesamt-Protein-Lysat in max. 20 µl Volumen wurden mit 4 x Laemmli-Puffer (6,6 µl) vermischt und bei 95 °C im Thermomixer für 10 min denaturiert. Die Proben wurden auf Eis abgekühlt. Für die Gelelektrophorese wurden zunächst einige ml Petroleum-Benzin auf die Unterlage gegeben, ein Excel-Gradienten-Gel 8 – 18 % blasenfrei mit dem Sammel-Gel zur Kathodenseite hin darüber gelegt und die Schutzfolie abgezogen. Anoden- und Kathoden-Pufferstreifen wurden gewässert und blasenfrei parallel zueinander ausgerichtet.

Die Proben-Auftragsplättchen (bei 26 µl Volumen, je 2 übereinander) wurden nebeneinander im Abstand von mindestens 5 mm und mit ca. 2 cm Abstand zum Rand im Sammel-Gel platziert und die Proben aufgetragen. Als Größenstandard wurde ein „Colourmarker plus LMW“ mitaufgetragen. Die Kühlung der Gel-Kammer wurde auf 13 °C eingestellt. Die Stromstärke wurde auf 30 mA limitiert. Für 20 min liefen die Proben bei 20 W (und etwa 600 V) in das Sammel-Gel ein, bevor bei 30 W (600 V, 30 –max. 50 mA) die Trennung nach der Größe im Gel über ca. 3 h stattfand. Die farbige Lauffront des Markers hatte dann das Ende des Gels erreicht. Die Probenplättchen wurden mit der Pinzette entfernt und die Proteine mittels Western-Blot auf eine PVDF-Membran übertragen und immobilisiert.

### 2.6.3. Western-Blot, Coomassie-Färbung und Stripping der Membran

#### **Katoden-Lösung (1 l)**

40 mM 6-Amino-n-hexansäure (5,2 g)  
0,01 % Natriumdodecylsulfat (0,1 g)  
20 % (v / v) Methanol (200 ml)  
bidestilliertes Wasser ad 1000 ml

#### **Anoden-Lösung I (1 l)**

0,3 M Tris (36,3 g)  
20 % (v / v) Methanol (200 ml)  
bidestilliertes Wasser ad 1000 ml

#### **PONCEAU S**

0,1 % (w / v) Ponceau S (0,1 g)  
5 % (v / v) Essigsäure (5,0 ml)  
bidestilliertes Wasser ad 1000 ml

#### **Anoden-Lösung II (1 l)**

25 mM Tris (3,03 g)  
20 % (v / v) Methanol (200 ml)  
bidestilliertes Wasser ad 1000 ml

Für das Semi-dry-Western-Blot-Verfahren wurden vorbereitet: 18 Whatman-Papiere (Länge 10 cm, Breite entsprechend der Probenanzahl), 2 Aluschalen, gefüllt mit Anodenlösung I und Anodenlösung II, sowie eine PVDF-Membran gleicher Breite wie die Whatman-Papiere, ein Gel-Schneider und Methanol. Das Gel wurde aus der Apparatur entnommen, kopfüber in Anodenlösung II gelegt und 5 min inkubiert. Währenddessen wurde die PVDF-Membran zunächst für 1 min in Methanol aktiviert, dann mit destilliertem Wasser gespült und in Anodenlösung II eingelegt. Anodenlösung II kann mit Proteinen verunreinigt sein und kann daher nicht wieder verwendet werden. Die Graphit-Platte (Anode) der Blotapparatur wurde mit destilliertem Wasser befeuchtet und darauf wurden 6 in Anodenlösung I angefeuchtete Whatman-Papiere gelegt. Das Gel wurde mit der Folie nach unten auf den Gel-Schneider gelegt und mit dem Draht von der Folie getrennt. Die aktivierte PVDF-Membran wurde auf das Gel gelegt und darüber kamen 3 mit Anodenlösung II befeuchtete Whatman-Papiere. Das Gel-Membran-Paket wurde mit den Whatman-Papieren zuerst auf die Anode mit den 6 in

Anodenlösung I getränkten Papieren gelegt. Die Folie wurde vom Gel abgezogen. 9 Whatman-Papiere wurden in eine mit Kathodenlösung befüllte Schale getaucht und feucht auf das Gel gelegt. Mit einem Gummi-Roller wurden unter leichtem Druck noch verbleibende Luftblasen entfernt. Die Kathode der Blotapparatur wurde ebenfalls mit destilliertem Wasser befeuchtet und als Deckel aufgesetzt. Die Parameter für den Blotvorgang waren: Nennleistung: 5 W; 20 V, 0,8 mA / cm<sup>2</sup> Gel (ca. 200 mA = 33 mA\*h für ein Excel-Gel 10 x 25 cm, (100 mA\*h für 10 x 12,5 cm). Der Blotvorgang war nach 1 h beendet. Der Deckel und die über dem Gel liegenden Papiere wurden mit dem Gel entfernt und das Gel zur Coomassie-Färbung aufbewahrt. Die Membran wurde durch Abschneiden einer Ecke markiert, die Lage der Farb-Marker wurde mit einem Kugelschreiber angezeichnet. Die Membran wurde auf die zur Antikörper-Detektion benötigte Größe zurecht geschnitten. Der Marker wurde mit dem Skalpell abgetrennt, in Ponceau S-Lösung 5 (max. 60) Minuten gefärbt und mit destilliertem Wasser nachgewaschen. Die Blot-Membranen wurden entweder sofort weiter verwendet oder blockiert (s. 2.6.4), in Folie eingeschweißt und bei -20 °C tiefgefroren.

### **Coomassie- Brilliant-Gel-Färbung**

**Lösung 1:** 45 ml Methanol, 45 ml H<sub>2</sub>O und 10 ml Essigsäure

**Färbelösung:** 0,25 g Coomassie-Brilliant Blue R250 (oder G250) in Lösung 1 lösen und durch ein Faltenfilter filtrieren.

Die Vollständigkeit des Blotvorganges wurde mit der Coomassie-Färbung kontrolliert. Sie erlaubt die Detektion von bis zu 0,1 µg Protein in einer Bande im Gel. Das Gel wurde nach dem Western-Blot in Coomassie-Färbelösung bei Raumtemperatur für 3 – 4 h geschüttelt und dann mit Lösung I über Nacht entfärbt. Die Lösung I wurde mehrfach gewechselt und entsorgt, die Färbelösung kann gefiltert und wiederverwendet werden. Das feuchte Gel wurde in Folie eingeschweißt und konnte zur Dokumentation auf einem Scanner eingelesen werden.

### **Stripping der Western-Blot-Membran**

Die Western-Blot-Membran wurde in Western Blot Stripping-buffer eingelegt und 1 h bei RT auf dem Rotationsschüttler inkubiert. Anschließend wurde 5 x 10 min mit TBS-T 0,1 % gewaschen. Testweise wurde in ECL-Lösung für 5 min inkubiert und die Membran am Lumi-Imager eingelesen, um sicher zu gehen, dass der 2. Antikörper entfernt wurde. Einmalig

wurde durch erneute Inkubation mit dem Zweitantikörper und ECL-Lösung überprüft, ob der Stripping buffer unter den angegebenen Bedingungen den PDK-2-Erstantikörper entfernt.

#### 2.6.4. Antikörper-Detektion und Quantifizierung der Protein-Mengen

Die Detektion der Proteine erfolgte mit einem polyklonalen PDK-2-Antikörper aus dem Kaninchen, den freundlicherweise die Arbeitsgruppe von Prof. Harris zur Verfügung stellte. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe eines Aktin-Antikörpers. Dieser sollte die Protein-Beladung der Gele zeigen und somit eine exakte Quantifizierung der PDK-2 Menge ermöglichen.

##### **TBS 10 x (bei 4 °C lagern)**

Tris Cl (24,2 g)  
NaCl (8,0 g)  
bidest. H<sub>2</sub>O ad 1000 ml  
pH 7,6 (mit HCl 1 N)

##### **TBS-T 0,1 % Stammlösung**

100 ml TBS 10 x  
900 ml bidest. H<sub>2</sub>O  
1 ml Tween 20

##### **Blockierungslösung I**

5 % BSA (Albumin)  
TBS-T (0,1 % Tween) pH 7,4

##### **Blockierungslösung II**

5 % Milchpulver  
TBS-T (0,05 % Tween) pH 7,4

##### **ECL-Färbelösung:** (frisch anzusetzen, nur 1 Tag haltbar)

1 Teil SuperSignal<sup>®</sup> West PiKo *Stable Peroxid Solution*  
1 Teil SuperSignal<sup>®</sup> West PiKo *Luminol Enhancer*

#### **Detektion mit dem polyklonalen Anti-human PDK-2-Antikörper aus dem Kaninchen**

Die Blot-Membran wurde mit Blockierungslösung I bei Raumtemperatur 2 h auf dem Rotationsschüttler inkubiert. Der Erst-Antikörper PDK-2 wurde 1 : 500 mit Blockierungslösung I verdünnt. Die Blot-Membran wurde über Nacht in der Antikörper-Lösung bei 4 °C auf dem Rotationsschüttler inkubiert. Es wurde 5 mal für je 10 min in TBS-T 0,1 % gewaschen. Dann wurde der 2. Antikörper (Anti-Rabbit IgG (polyklonal), HRP-konjugiert) in Blockierungslösung I 1 : 2000 verdünnt und für 3 h auf die Membran geben (Rotationsschüttler, 4 °C). Nach anschließendem Waschen für 5 x 10 min in TBS-T 0,1 %, wurde die Membran 5 min unter Lichtausschluss in ECL-Lösung inkubiert. Sie wurde in eine Prospekt

Hülle blasenfrei eingelegt und über eine CCD-Kamera das durch Elektro-Chemo-Lumineszenz entstehende Licht am Lumi-Imager ca. 5 min eingelesen und quantifiziert. Die gewünschte Bande läuft bei etwa 43 kDa. Die Membranen wurden anschließend in TBS-T gewaschen, die Antikörper abgelöst und mit dem nächsten Antikörper detektiert oder in Folie eingeschweißt und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **Detektion mit dem monoklonalen IgG-Anti-human-Aktin-Antikörper aus der Maus**

Die Blotmembran wurde mit Blockierungslösung II bei RT 1 h blockiert. Der Erst-Antikörper Anti-Aktin C2 (200  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ) wurde 1 : 500 mit Blockierungslösung II verdünnt. Die Blot-Membran wurde in die Lösung eingelegt und über Nacht bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  auf dem Rotationsschüttler inkubiert. Es wurde 5 mal für je 10 min in TBS-T 0,05 % gewaschen. Dann wurde der 2. Antikörper (Anti- Maus IgG (polyklonal), HRP-konjugiert) 1 : 2000 in Blockierungslösung II verdünnt und für 3 h auf die Membran geben (Rotationsschüttler,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Nach dem Waschen für 5 x 10 min in TBS-T 0,1 % wurde die Membran 5 min unter Lichtausschluss in ECL-Lösung inkubiert. Sie wurde in eine Prospekt Hülle blasenfrei eingelegt und über eine CCD-Kamera das durch Elektro-Chemo-Lumineszenz entstehende Licht am Lumi-Imager ca. 5 min eingelesen und quantifiziert. Es zeigen sich zwei Banden bei 43 kDa und 55 kDa. Bei der gewünschten Bande handelt es sich um die niedriger molekulare 43 kDa Bande.

### **2.6.5. Fluoreszenzmikroskopie der Myozyten**

Die zytochemische Detektion der Nukleinsäuren und Proteine mit Acridinorange (AO) lässt sich zur Beurteilung der Zellen im Wachstum nutzen. Doppelsträngige DNA stellt sich grünfluoreszierend dar, einzelsträngige DNA und RNA fluoreszieren rotorange. Somit lässt sich die Zelle in ihrem Zyklus begrenzt darstellen, da Mitosen erkannt, Proteinsynthesephasen unterschieden und die Zellmorphologie beurteilt werden können. Der Mechanismus beruht auf einer Farbaggregation („Stacking“). Das Verhältnis von Nukleinsäurephosphaten zu Farbstoffmolekülen ist bedeutsam für die Farbentwicklung (Bradley Wolf 1959). Die Farbreaktion ist ebenfalls pH-abhängig (Schümmelfelder, Stock 1956), formalinhaltige Fixierungen stören die Farbentwicklung. Daher erfolgte die Färbung als Vitalfärbung. Es wurde eine Stammlösung von 0,1 g AO in 100 ml Wasser angesetzt. Im Versuch wurde diese Lösung 1 zu 10 mit PBS pH 6 verdünnt eingesetzt. Die Zellen wurden 2 x mit warmem PBS gewaschen und erhielten 1 ml AO-PBS-Lösung. Dann wurden sie für 10 min im Brutschrank inkubiert und erneut 2 x für 5 min mit warmem PBS zur Reduktion der Hintergrundfluoreszenz

nachgewaschen. Die Anregungswellenlänge im Fluoreszenzmikroskop betrug 420 – 490 nm, die Emission wurde bei 530 nm in grün (DNA) und bei 650 nm in rot (RNA) beobachtet.

DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol) bildet Komplexe mit AT-reichen Sequenzen doppelsträngiger DNA. Diese lassen sich durch Licht von 360 nm Wellenlänge anregen und emittieren blaues Licht mit einem Maximum bei 460 nm. Dadurch lässt sich im Kern DNA selektiv darstellen und zur Beurteilung z.B. der Kernintegrität und Morphologie und so z.B. zur Detektion apoptotischer Kernpyknosen nutzen. Die Myozyten wurden auf in die Kulturschalen eingelegten, sterilen Deckgläschen wie beschrieben kultiviert und entsprechend den Protokollen behandelt. Die Zellen wurden 2 x mit PBS gewaschen und für 20 min in 70 %igem Ethanol bei Raumtemperatur fixiert. Dann wurde 1 x mit PBS für 5 min nachgewaschen. 1 Tropfen (ca. 25 µl) Vectashield Mountingmedium mit DAPI (1,5 µg / ml) wurde auf das Deckglas mit den fixierten Zellen gegeben und luftblasenfrei ein Objektträger aufgesetzt und im Fluoreszenzmikroskop beurteilt.

#### **2.6.6. Statistische Analyse der Daten**

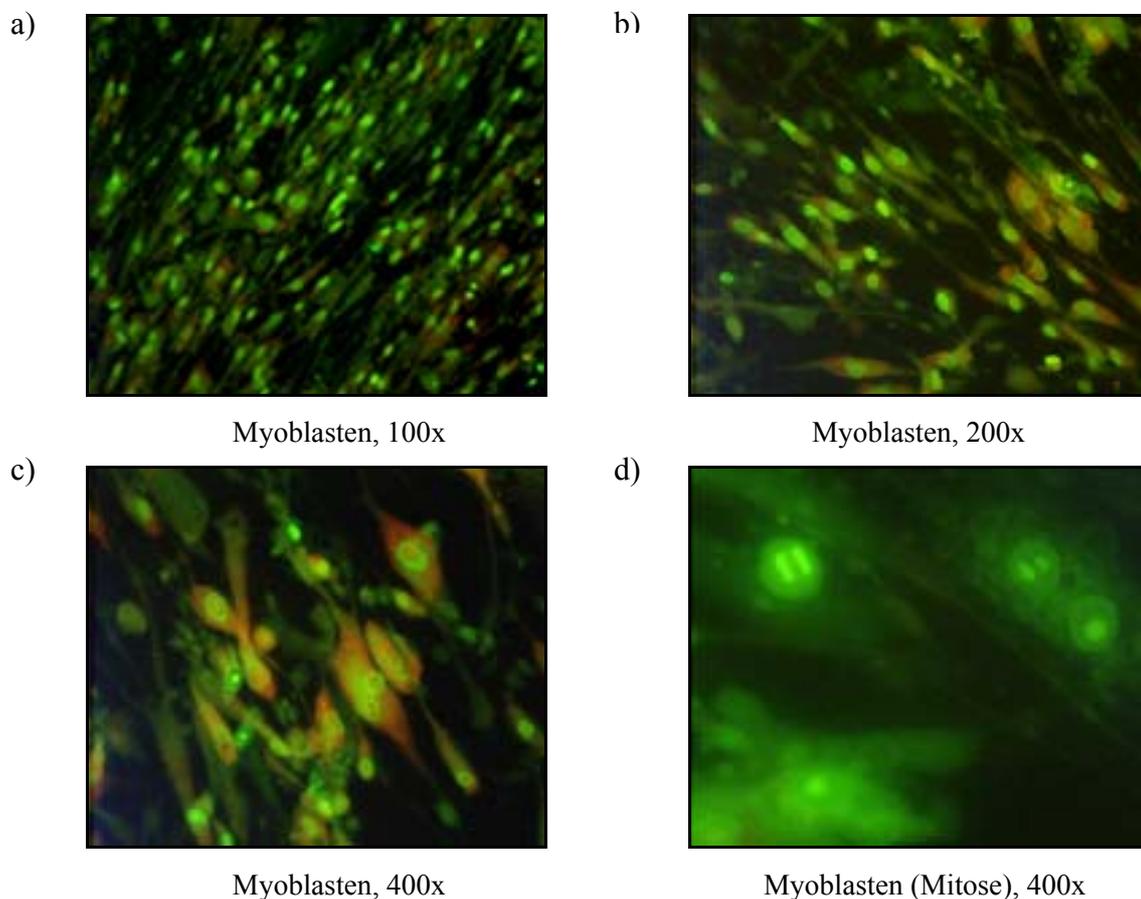
Die Auswertung der Daten erfolgte im PC mit Excel (Microsoft, Seattle, USA) und Prism (Graph Pad, San Diego, CA,USA). Die statistischen Analysen wurden mit dem Programm t-ease (ISI, Philadelphia USA) basierend auf dem Student t-test durchgeführt. Als signifikant galt bei der Analyse gepaarter Daten im two-tailed t-test ein positiver prädiktiver Wert von kleiner 0,05 ( $p < 0,05$ ).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Charakterisierung des Zellsystems im Mikroskop

##### 3.1.1. Proliferation der Myoblasten

Die Acridinorange-Vital-Färbung (AO) färbt DNA grün (530 nm) und RNA orange (650 nm). So kann man teilungsaktive Zellen im Zellzyklus darstellen, da sich Protein- oder DNA synthetisierende Zellen in ihrer Farbemission unterscheiden. In den folgenden Abb. 8 a-d wurden die noch teilungsaktiven Myoblasten eine Woche nach Aussaat, direkt vor Beginn der Differenzierung, mit AO gefärbt und unter dem Fluoreszenz-Mikroskop fotografiert.



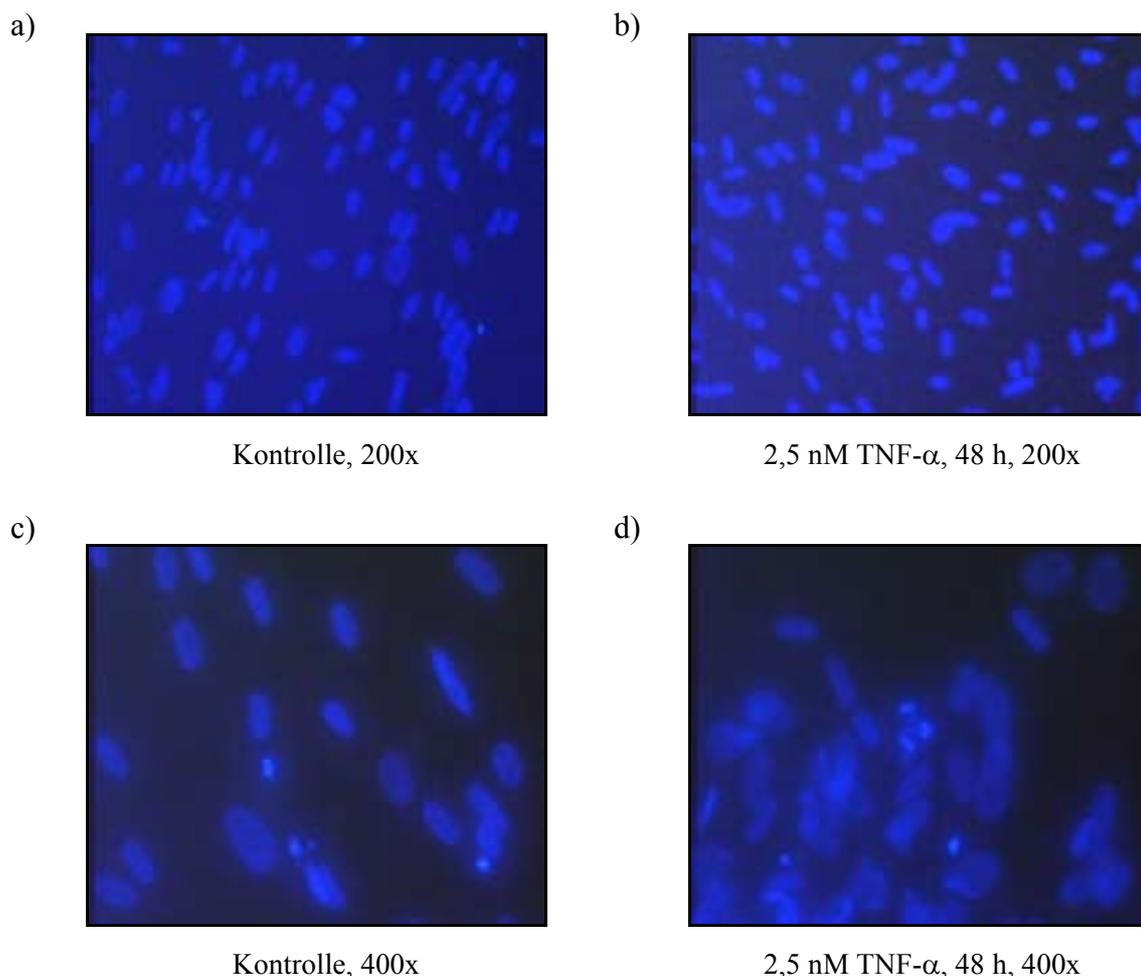
**Abb. 8: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Myoblasten in der AO-Vital-Färbung**

Gezeigt sind AO-gefärbte Myoblasten in verschiedenen Vergrößerungen zur Beurteilung des Zellwachstums anhand einer DNA/RNA-Unterscheidung (a-d).

Die AO-Färbung zeigt die spindelförmige Struktur der undifferenzierten, noch einkernigen Zellen. Proteinsynthetisierende Myoblasten zeigen perinukleär eine orange Fluoreszenz bedingt durch einen hohen RNA-Anteil (Abb 8 c). Mitosen sind in den eher grün imponierenden Zellen nachzuweisen (Abb. 8 d) und beweisen die Proliferation der Zellen.

### 3.1.2. TNF- $\alpha$ beeinflusst die Morphologie der Zellkerne nicht

Die Apoptose-Rate von Kardiomyozyten und Skelettmuskelzellen korrelierte bei chronischem Herzversagen mit den TNF- $\alpha$ -Serum-Spiegeln [Vescovo]. Hier sollte eine unerwünschte, durch die TNF- $\alpha$ -Behandlung induzierte Apoptose ausgeschlossen werden. Differenzierte Myozyten wurden mit 2,5 nM TNF- $\alpha$  für 48 h behandelt und weitere Zellen als Kontrollen für 48 h kultiviert. Die DAPI-gefärbten Zellen wurden bei 460 nm unter dem Fluoreszenzmikroskop fotografiert (Abb. 9). Apoptotische Kerne lassen sich an ihrer Größe erkennen.



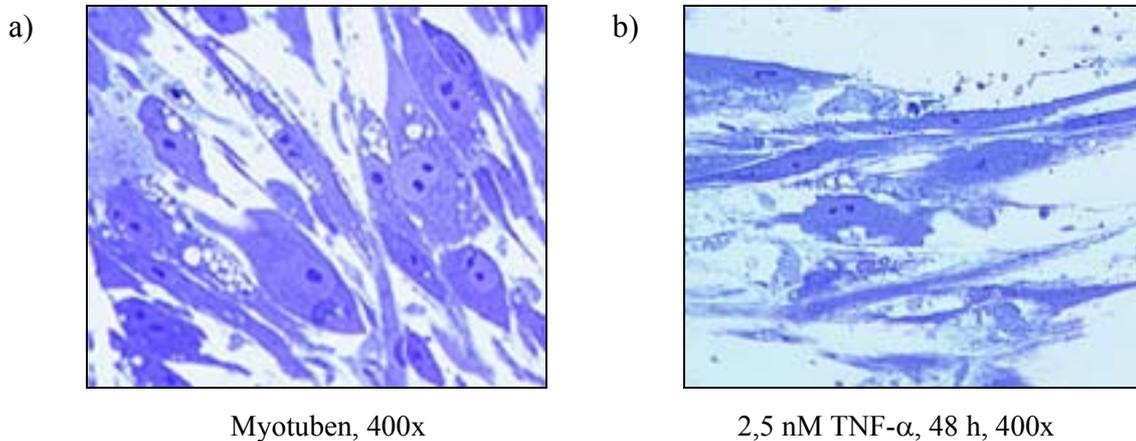
**Abb. 9: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Myotuben in der DAPI-Kern-Färbung**

Gezeigt sind zwei Vergrößerungen der Zellen mit und ohne TNF- $\alpha$ -Behandlung für 48 h (a-d).

Die 200 x Übersicht (Abb. 9 a, b) zeigt keine Unterschiede zwischen den unbehandelten und den TNF- $\alpha$  behandelten Zellen. Die 400 x Vergrößerung (Abb. 9 c, d) zeigt Zellkern-Reste (Zelldetritus) als helle Punkte und einige stark vergrößerte evtl. pyknotische Kerne, die jedoch in Kontrollen und behandelten Situationen gleich oft auftreten. Auch eine Tunel-Apoptose-Färbung ergab keinen Hinweis auf vermehrte Apoptose (nicht gezeigt) der nach dem Waschen noch adhärennten Zellen.

### 3.1.3. Lichtmikroskopie der Myozyten

Die Lichtmikroskopie dient einerseits der Überprüfung der Zellen während der Experimente. Die in der Dapi-Färbung vergrößerten Kerne wurden im Lichtmikroskop untersucht. Zwei repräsentative Darstellungen ohne und nach TNF- $\alpha$ -Behandlung zeigt Abb. 10.



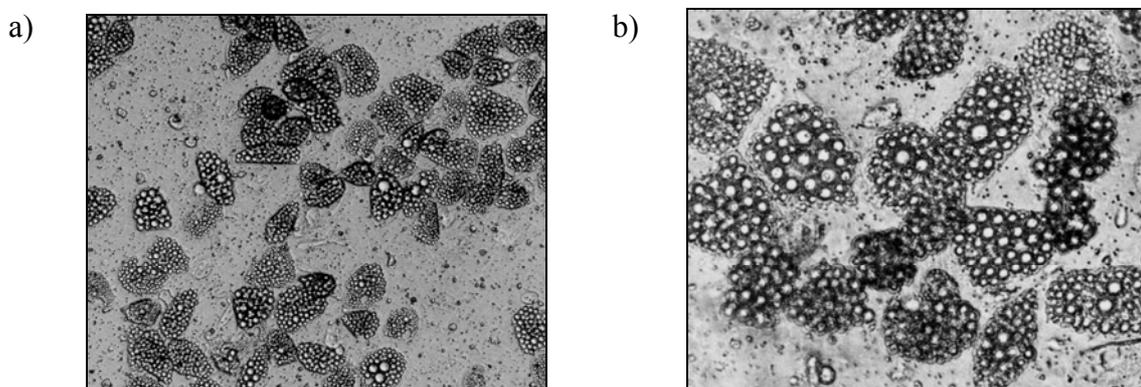
**Abb. 10: Vakuolisierung und Kernvergrößerung differenzierter Myotuben im Lichtmikroskop**

Gezeigt sind 7 Tage differenzierte Zellen ohne und mit TNF- $\alpha$  -Behandlung für weitere 48 h.

Die wenigen, in der DAPI-Färbung vergrößert erscheinenden Kerne gehören im Lichtbild zu vergrößerten, meist stark vakuolisierten Zellen. Die Vakuolen sind überwiegend perinukleär angeordnet, das Zytoplasma wirkt z.T. unruhiger. Die Häufigkeit unterscheidet sich zwischen den Behandlungssituationen nicht. Dies könnte ein Hinweis auf Alterung der Zellen sein.

### 3.1.4. Adipozyten im Lichtmikroskop

Adipozyten sind am Verfettungsgrad in ihrer Differenzierung gut zu beurteilen, da die Präadipozyten noch keine typischen Fetttröpfchen besitzen (Abb. 11 a und b).



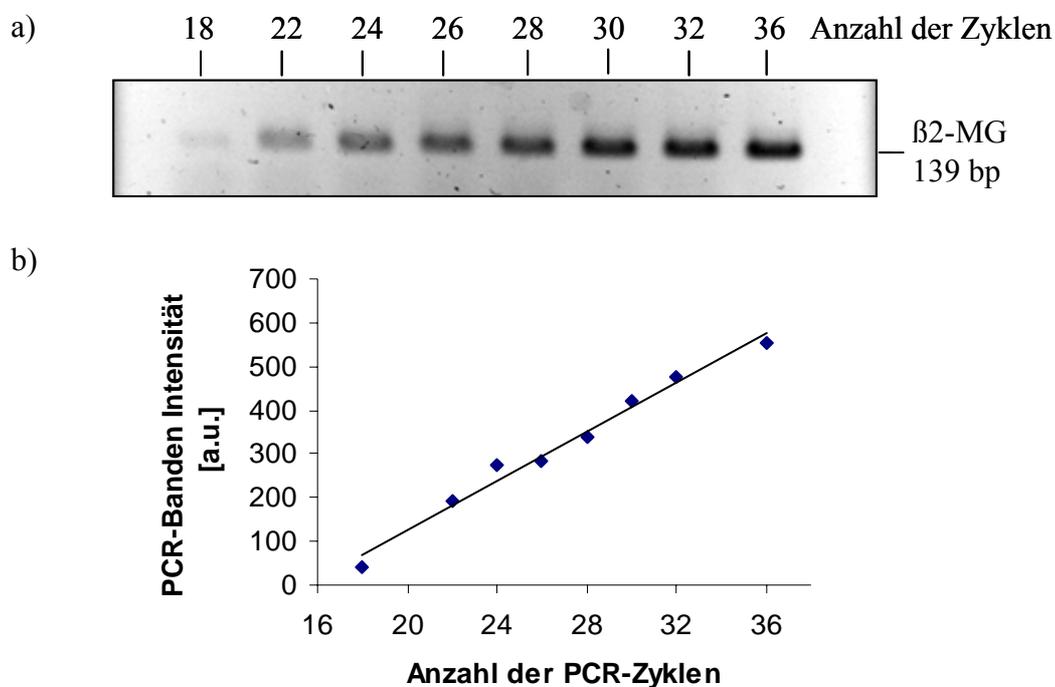
**Abb. 11: Verfettete adulte Adipozyten nach 16 d Differenzierung, 200x (a) und 400x (b)**

### 3.2. Genexpressions-Analysen im Skelettmuskel mittels semiquantitativer RT-PCR

#### 3.2.1. Etablierung der PCR-Reaktionen

##### Überprüfung des PCR-Amplifikations-Verhaltens

Die Produkt-Zyklen-Kurve der PCR-Reaktion verläuft bedingt durch Heizraten-, Diffusions-, und Enzym-Einflüsse eher sigmoidal. Die Produktbildung ist anfangs gering, da nur wenige cDNA-Kopien vorliegen. Bei maximaler Reaktionseffizienz steigt die Produktmenge zwischen zwei Zyklen stark an. Nach häufiger Amplifikation kommt es zu Kettenabbrüchen. Die Fragmente werden nicht weiter amplifiziert, weil nur ein Primer binden kann. Bei sinkender Polymerase-Aktivität, z.B. durch Hitzeschädigung, stagniert die Vervielfältigung. Hier sollte die Zyklenzahl für spätere Experimente auf maximale Effizienz optimiert werden. Ein Mastermix mit allen PCR-Komponenten wurde aufgeteilt. Jeder Ansatz enthielt 85 ng cDNA von 7 d differenzierten Myozyten und 10 pmol jedes Primers. Die Proben wurden 18 - 36 Zyklen mit einer Annealing-Temperatur von 55 °C amplifiziert. Nach Ende des 18., 22., 24. usw. Zyklus wurde aus dem PCR-Gerät eine Probe entnommen und bei 4 °C gelagert. Die Proben wurden auf einem 2 %igen Agarose-Gel aufgetrennt, das mit Ethidiumbromid gefärbt, unter UV-Licht fotografiert, invertiert und densitometrisch ausgewertet wurde (Abb. 12 a, b).



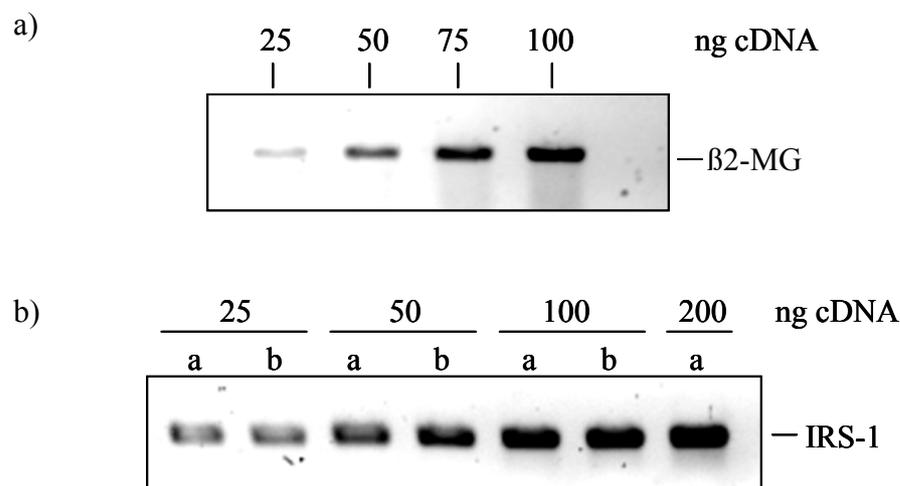
**Abb. 12: Verlauf der  $\beta$ 2-Mikroglobulin-Amplifikation in der PCR-Reaktion**

Ein Ansatz mit allen PCR-Komponenten wurde auf die Reaktionsgefäße verteilt (je 85 ng cDNA). Das Agarose-Gel zeigt die PCR-Zyklen-Anzahl an der zugehörigen Bande (a). In der Auswertung ist die Intensität der PCR-Banden in willkürlichen Einheiten (a.u.) gegen die Anzahl der PCR-Zyklen aufgetragen (b).

Die PCR-Reaktion zeigte keine unspezifischen Banden und nur eine geringe Primer-Dimer-Bildung. Die Amplifikation von  $\beta$ 2-MG verläuft im getesteten Bereich linear. Optimal sind 22 - 30 Zyklen, da dann die Reaktion mit einer guten Amplifikationsrate verläuft und die Banden gut sichtbar sind. Die Ergebnisse bleiben damit überprüfbar.

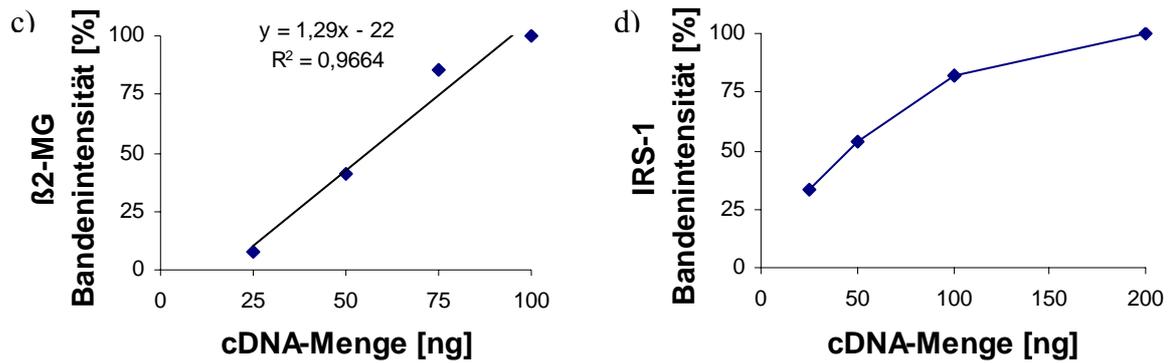
### Validierung und Überprüfung der Empfindlichkeit der PCR-Reaktion

Zur semiquantitativen Bestimmung müssen die PCR-Produkte linear amplifiziert werden. Dies wurde für  $\beta$ 2-MG und IRS-1 mit den optimierten Parametern bzgl. Zyklenzahl und Annealing-Temperatur mit verschiedenen cDNA-Mengen überprüft. 25 - 200 ng cDNA von 7 d differenzierten Myozyten wurde in Reaktionsgefäßen vorgelegt und mit Wasser auf das gleiche Volumen aufgefüllt. Dazu kamen gleiche Teile eines Mastermix mit den restlichen PCR-Komponenten ad 50  $\mu$ l pro Probe. Die  $\beta$ 2-MG-Proben wurden 27 Zyklen amplifiziert, die Annealing-Temperatur betrug 53 °C, die IRS-1 Proben wurden 29 Zyklen mit einer Annealing-Temperatur von 56 °C amplifiziert. Abb. 13 zeigt invertiert dargestellt Gele für  $\beta$ 2-MG (a) und für IRS-1 (b), die quantifizierte Banden-Intensität in Abhängigkeit von der cDNA-Menge zeigen c-d.



**Abb. 13 a, b:  $\beta$ 2-Mikroglobulin- und IRS-1-Amplifikation bei variablen cDNA-Mengen**

Die 2 %igen invertierten Agarose-Gele zeigen die  $\beta$ 2-MG-Banden nach 27 PCR-Zyklen (a) und IRS-1-Banden amplifiziert über 29 Zyklen (b) gezeigt. Die eingesetzte cDNA-Menge ist in ng angegeben, mit a und b bezeichnete Proben sind doppelbestimmte PCR-Ansätze aus einer cDNA.



**Abb. 13 c, d: Verlauf der  $\beta 2$ -MG und IRS-1 PCR-Reaktion mit verschiedenen cDNA-Mengen**

Die PCR-Produktmenge für  $\beta 2$ -MG (a) und für IRS-1 (b) ist als Bandenintensität in Prozent gegen die eingesetzte cDNA-Menge in ng aufgetragen. Die Bande von 100 ng cDNA wurde gleich 100 % gesetzt. In (a) wurde eine lineare Regressionsgerade eingefügt.

In Abb. 13 c ist die Amplifikation für  $\beta 2$ -MG annähernd linear, bei 50 ng ergibt sich etwa die halbe Intensität der Bande bei 100 ng, geringe Abweichungen gibt es für 25 ng und für 75 ng. Die gewählten Bedingungen sind somit für semiquantitative Analysen geeignet.

Die Kurve für IRS-1 flacht bei 200 ng cDNA ab und verhält sich daher in diesem Bereich nicht linear (Abb. 13 d). Banden von 25 - 50 ng erscheinen eher schwach. Um Mengenunterschiede beurteilen zu können, sollten zukünftig zwischen 50 und 100 ng cDNA eingesetzt werden.

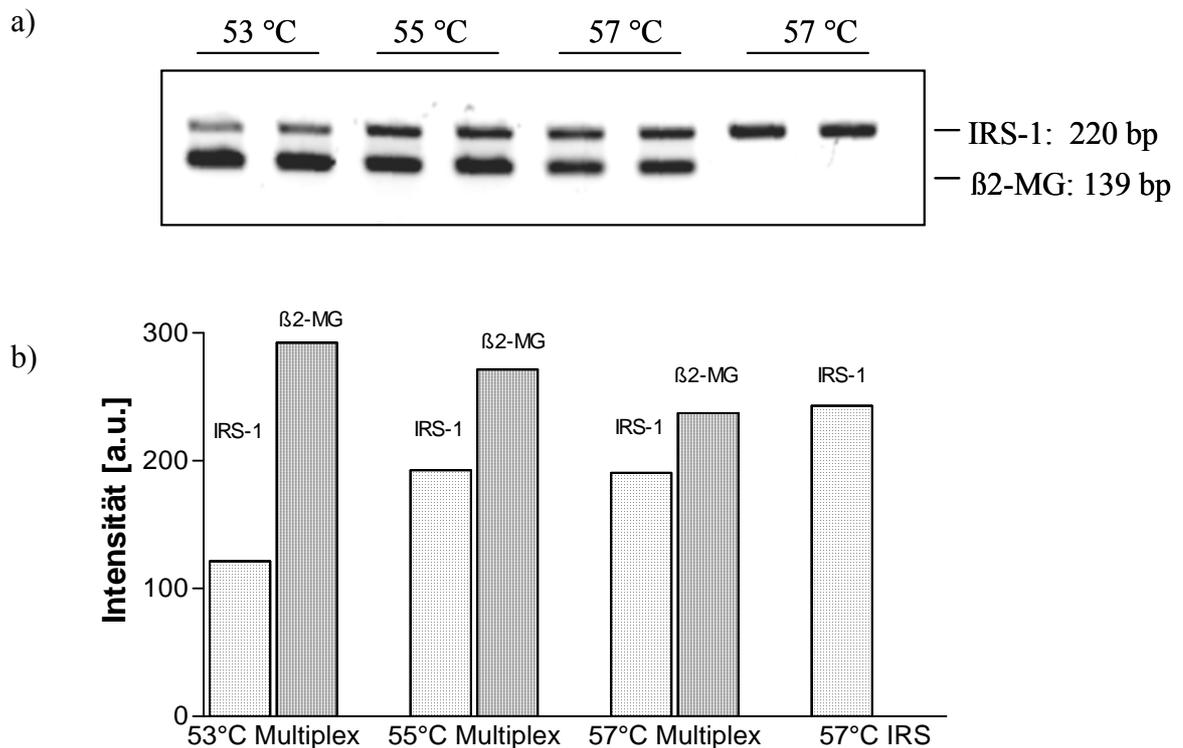
### 3.2.2. Etablierung einer Multiplex-PCR-Reaktion

Das Prinzip der Multiplex-PCR besteht darin, ein Haushalts-Gen, das in allen Geweben konstitutiv exprimiert wird und bei der Expression keinen großen Schwankungen unterliegt, als internen Standard zusammen mit dem gewünschten Gen-Produkt in einem Reaktionsgefäß zu amplifizieren. Man umgeht dabei die Kalibrierung über einen externen Standard und hat eine bessere Kontrolle über individuelle Einflüsse auf die Proben, wie z.B. den Temperaturgradienten im PCR-Gerät, da diese sich auf die Produkte beider Primer-Paare auswirken.

Es erwies sich als günstig, die IRS-1-Primer-Menge gegenüber der  $\beta 2$ -MG-Primer-Menge zu verdoppeln, um die Reaktion des weniger stark exprimierten IRS-1 in den ersten PCR-Zyklen kinetisch zu begünstigen. Die Ergebnisse sind hier nicht gezeigt.

### Optimierung der Annealing-Temperatur für die Multiplex-PCR

Es wurde eine Annealing-Temperatur gesucht, bei der beide Produkte optimale Reaktions-Ausbeuten zeigen. 100 ng cDNA aus 7 d differenzierten Myozyten pro Ansatz wurde für eine Multiplex-PCR mit 20 pmol pro Ansatz IRS-1-Primer- und 10 pmol pro Ansatz  $\beta$ 2-MG-Primer eingesetzt. Um die Beeinflussung von IRS-1 durch  $\beta$ 2-MG zu prüfen, wurde ein Ansatz nur mit IRS-1-Primern pipettiert. Das invers dargestellte, mit Ethidiumbromid gefärbte 2 %ige Agarose-Gel ist gezeigt in Abb. 14 a. Die Auswertung zeigt die Abb. 14 b.



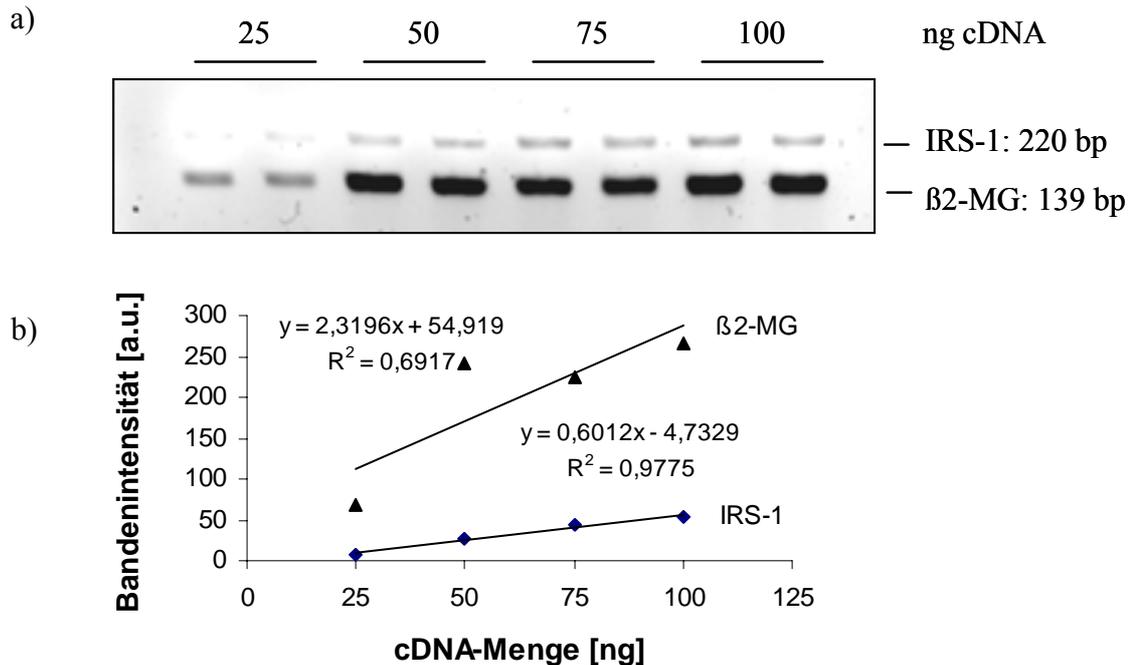
**Abb. 14: Optimierung der Annealing-Temperatur für einen Multiplex Ansatz**

Gezeigt ist eine Multiplex-PCR bei Annealing-Temperaturen von 53 °C - 57 °C. In den beiden rechten Spuren wurde nur IRS-1 amplifiziert, um die Konkurrenz der beiden Primer-Paare bei der Amplifikation zu untersuchen. Die PCR-Proben sind doppelt aufgetragen (a). Die densitometrische Auswertung in willkürlichen Einheiten (a.u.) zeigt b.

Die  $\beta$ 2-MG Ausbeute sinkt mit steigender Annealing-Temperatur, während sich die von IRS-1 dem Wert der Einzel-PCR angleicht. Dies liegt u.a. an den verschiedenen Annealing-Temperaturen der Primer sowie an deren gegenseitiger Beeinflussung. Da der Ausbeute-Verlust für IRS-1 zwischen 55 °C und 57 °C gering ist und  $\beta$ 2-MG bei 55 °C besser als bei 57 °C amplifiziert wird, wurde als optimierte Annealing-Temperatur 56 °C für weitere Experimente gewählt.

### Linearitätsprüfung für die Multiplex-PCR mit den evaluierten Parametern

Die Linearität der Multiplex-PCR wurde mit 25 - 100 ng cDNA je Probe von 7 d differenzierten Myotuben geprüft (Annealing-Temperatur 56 °C; 20 pmol pro Ansatz IRS-1-Primer; 10 pmol pro Ansatz  $\beta$ 2-MG-Primer; 28 Zyklen). Das invertiert dargestellte, mit Ethidiumbromid gefärbte Agarose-Gel mit den PCR-Produkten in Abb. 15 a zeigt ein repräsentatives Ergebnis, die Auswertung in Abb. 15 b dargestellt.



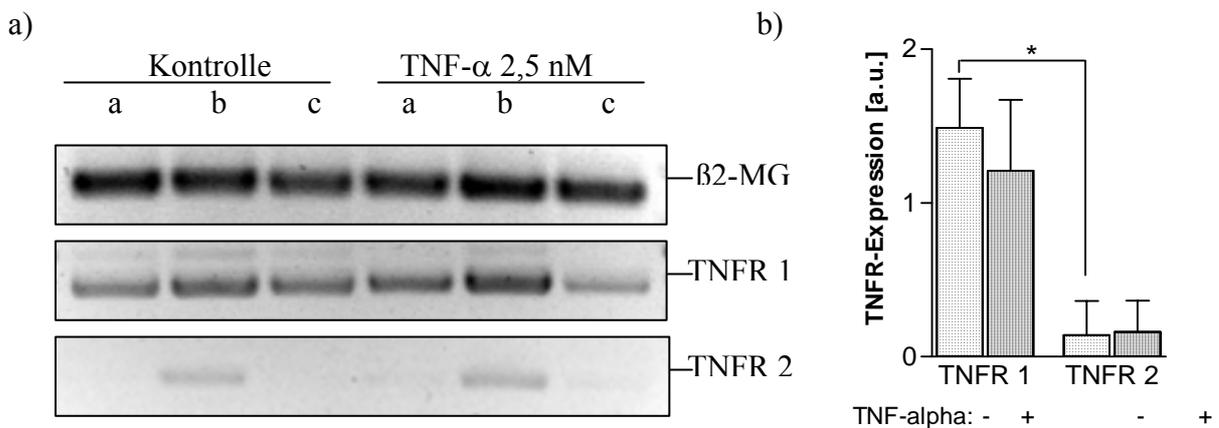
**Abb. 15: Die Amplifikation verschiedener cDNA-Mengen in einer Multiplex-PCR**

Die cDNA-Menge ist über den Spuren vermerkt, die vier Proben sind stets doppelt aufgetragen, die Amplifikation betrug 28 Zyklen (a). Die densitometrisch bestimmte, gemittelte Bandenintensität (in willkürlichen Einheiten = a.u.) ist gegen die eingesetzte cDNA-Menge in ng aufgetragen. IRS-1 ist mit  $\blacklozenge$ ,  $\beta$ 2-MG mit  $\blacktriangle$  markiert, die Regressionsgeraden wurden eingefügt und Geradengleichungen und Bestimmtheitsmaß angegeben (b).

IRS-1 wird nahezu linear vervielfältigt, bei  $\beta$ 2-MG zeigt sich ein Ausreisser bei 50 ng, die Kurve verläuft etwas steiler, was durch eine höhere Anfangskopienzahl bedingt sein dürfte. Bei 75 ng cDNA sind sowohl Beurteilbarkeit, als auch Amplifikationsverhalten optimal. Für alle weiteren IRS-1 /  $\beta$ 2-MG-PCR-Reaktionen wurden folgende Parameter gewählt: Initiale Denaturierung: 94 °C für 4 min, alle weiteren Schritte je 30 s: Denaturierung 94 °C, Annealing-Temperatur 56 °C, Elongation bei 72 °C, 28 Zyklen, Primer-Verhältnis 2 : 1 für IRS-1 /  $\beta$ 2-MG.

### 3.2.3. Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-Genexpression bei Myozyten

Die TNFR-Isoformen 1 und 2 kommen als lösliche oder als membranständige Form vor. Die lösliche Form ist bei Adipositas erhöht [Hotamisligil *et al.* 1997, Tsigos *et al.*]. Die mRNA-Expression in Skelettmuskelzellen wurde zunächst untersucht. Es wurde ausgeschlossen, dass sich durch die TNF- $\alpha$ -Behandlung der Myozyten die Expression des TNFR ändert, um spätere Untersuchungen mit TNF- $\alpha$  nicht falsch zu interpretieren. 7 d differenzierte Myotuben wurden für 48 h mit 2,5 nM TNF- $\alpha$  behandelt oder als Kontrolle kultiviert. Die Zytotoxizität von TNF- $\alpha$  in der verwendeten Konzentrationen war ausgeschlossen [Fleischer *et al.*]. Für TNFR1 und 2 wurde eine semiquantitative PCR etabliert, die jedoch als Multiplex-PCR nicht durchzuführen war. Deshalb erfolgten 3 PCR-Reaktionen mit derselben cDNA (85 ng / Ansatz) mit  $\beta$ 2-MG- und mit TNFR-Primern getrennt bei den für die Primer optimierten Bedingungen. Elektrophorese und Färbung erfolgten auf einem Gel (Abb. 16) Das Verfahren ist fehleranfälliger als die Multiplex-PCR, erlaubt aber Aussagen über größere Expressionsänderungen.



**Abb. 16: Expression der TNF-Rezeptor-Isoformen in Myozyten nach Behandlung mit TNF- $\alpha$**

Dargestellt sind 3 einzelne PCR-Experimente mit  $\beta$ 2-MG- und TNFR1- und -2-Primern an unbehandelten Myozyten und an für 48 h mit 2,5 nM TNF- $\alpha$  behandelten Myozyten (a). Für die 2 TNFR-Isoformen ist die Expression der Kontrolle und der mit TNF- $\alpha$  behandelten Proben als Mittelwert  $\pm$  SD in willkürlichen Einheiten (a.u.) gezeigt (b). Signifikante Unterschiede sind mit \* gekennzeichnet.

Die humanen Myozyten exprimieren fast nur die TNFR1-Isoform, die TNFR2 Form fast nicht (Abb. 16 a). Die TNFR1-Expression nach der Behandlung mit 2,5 nM TNF- $\alpha$  für 48 h nimmt um  $19\% \pm 30\%$  SD ab, das Ergebnis ist aufgrund der kleinen Stichprobe nicht signifikant. Es ist von einer konstanten Expression auszugehen. Für die geringe und daher mit einer hohen Schwankungsbreite behaftete TNFR2-Expression ist kein TNF- $\alpha$ -Einfluss nachzuweisen.

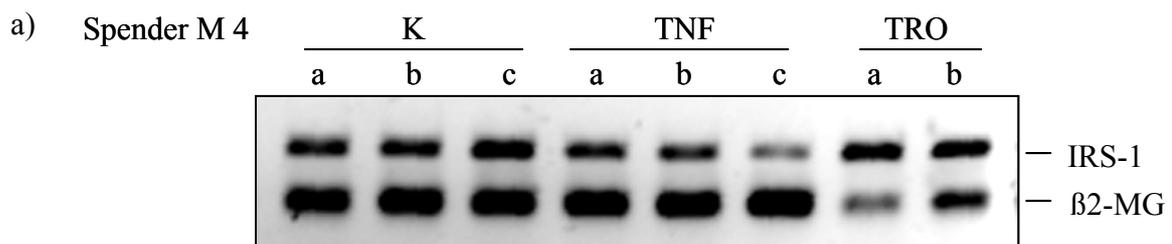
### 3.2.4. IRS-1-Expression nach Langzeit-Behandlung mit TNF- $\alpha$ oder Troglitazon

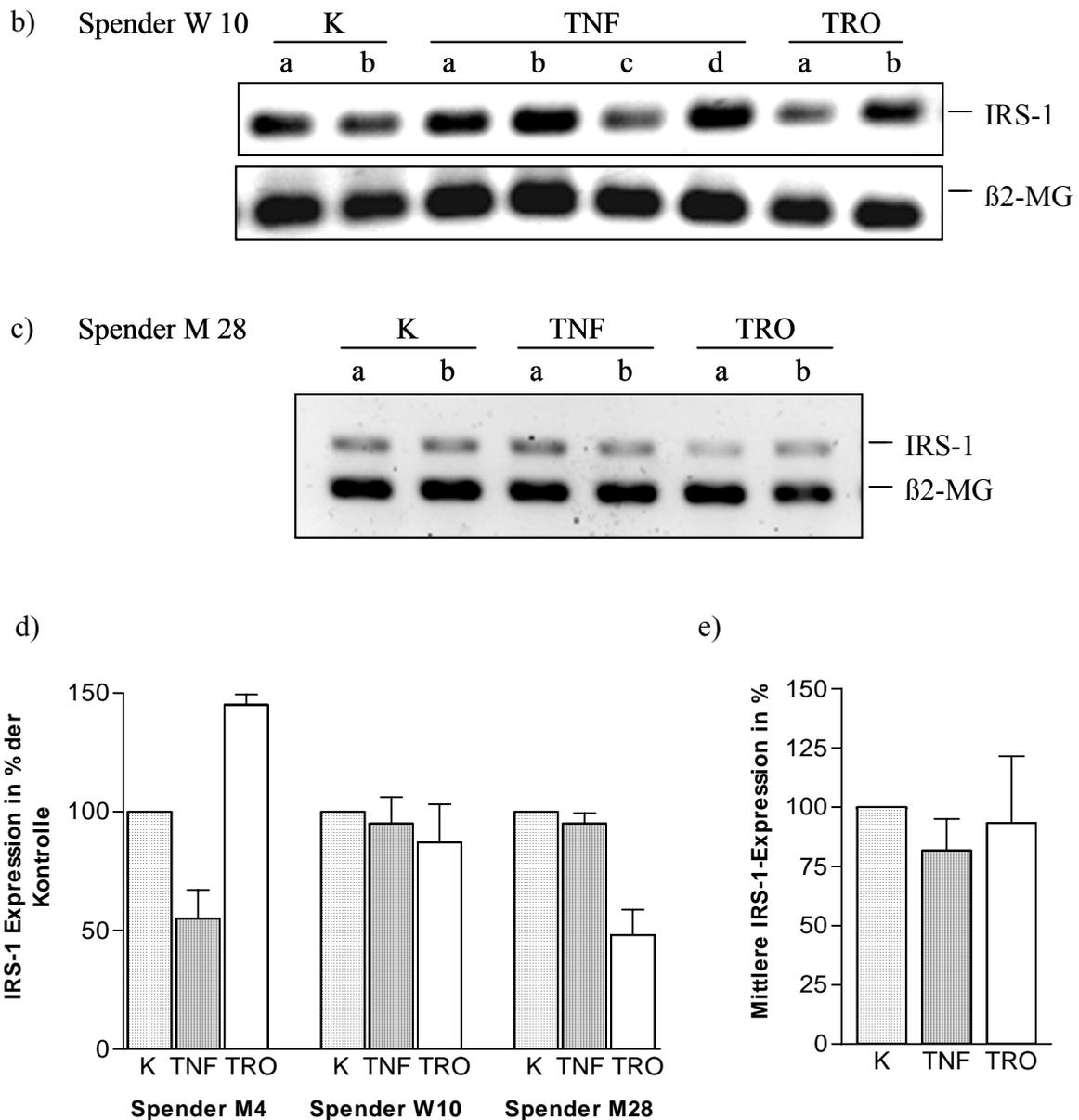
Der molekulare Mechanismus der Induktion einer Insulinresistenz durch eine parakrine Wirkung von TNF- $\alpha$  ist noch ungeklärt. TNF- $\alpha$ -Effekte auf Protein-Ebene sind bereits bekannt. Primärkulturen des humanen M. vastus lateralis wurden nach Kurzzeit (90 min) sowie -Langzeit-Exposition (24 h) gegenüber 5 ng/ml TNF- $\alpha$  untersucht. Die TNF- $\alpha$ -Behandlung bewirkte eine dosisabhängige Steigerung des insulinstimulierten Glukose-Transports bei gesunden und bei diabetischen Spenderzellen, die Glykogen-Synthase-Aktivität war reduziert, was als Mechanismus zur Kompensation der Insulin-Resistenz interpretiert wurde [Ciaraldi *et al.*]. Proteinexpression und Phosphorylierungs-Status von IRS-1 sowie AKT wurden nach Inkubation humaner Myozyten mit verschiedenen TNF- $\alpha$ -Konzentrationen untersucht [Dietze *et al.*]. Beide zeigten eine dosisabhängige Abnahme der Proteinexpression, die für IRS-1 stärker ausgeprägt war. Zusätzlich zeigte sich eine dosisabhängig verminderte Tyr-Phosphorylierung, die als Ausdruck eines gestörten Insulin-Signal-Wegs interpretiert wird [Dietze *et al.*].

Ob TNF- $\alpha$  auch die Genexpression von IRS-1 beeinflusst, soll hier überprüft werden.

Die Glitazone binden an den nukleären Transkriptionsfaktor PPAR- $\gamma$ . Möglicherweise beeinflussen sie die Expression von Genen der Insulin-Signalkaskade. Die unter TNF- $\alpha$  verminderte IRS-1-Tyrosin-Phosphorylierung ist unter Troglitazon-Zusatz reversibel [Dietze *et al.*]. Hier wurde der Einfluss von Troglitazon auf die IRS-1-Genexpression untersucht.

7 d differenzierte Myotuben von 3 verschiedenen Spendern wurden 48 h mit 2,5 nM TNF- $\alpha$  oder 5  $\mu$ M Troglitazon inkubiert, unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Etwa 75 ng cDNA jeder Probe wurden in der Multiplex-PCR 28 Zyklen amplifiziert und auf einem Gel aufgetrennt. Die Abb. 17 a-c zeigen repräsentative Ergebnisse der 3 Spender auf invers dargestellten Agarose-Gelen. Die Quantifizierung ist grafisch in Abb. 17 d - e dargestellt.





**Abb. 17: IRS-1-Genexpression bei 3 Spendern nach TNF- $\alpha$  und Troglitazon-Behandlung**

Die Behandlungs-Situation ist markiert durch K (Kontrolle), TNF (2,5 nM TNF- $\alpha$ ) und TRO (5  $\mu$ M Troglitazon) nach 48 h-Behandlung. Proben aus mehrfach bestimmten Behandlungs-Situationen von einem Spender (N = 2-4) sind mit den Buchstaben a bis d bezeichnet. Die Ergebnisse für drei Muskelzellspender sind in Abb. a, b und c gezeigt. Die IRS-1-Expression nach  $\beta$ 2-MG-Normierung ist in der Grafik einzeln aufgeschlüsselt (d) und als Mittel über alle 3 Spender dargestellt (e). Die Kontrolle K wurde als 100 % Genexpression bezeichnet und TNF und TRO darauf bezogen. In (d) wurde für jede Behandlungssituation der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet, in (e) die Mittelwerte aus (d) und der zugehörige SEM (\* bei Signifikanz).

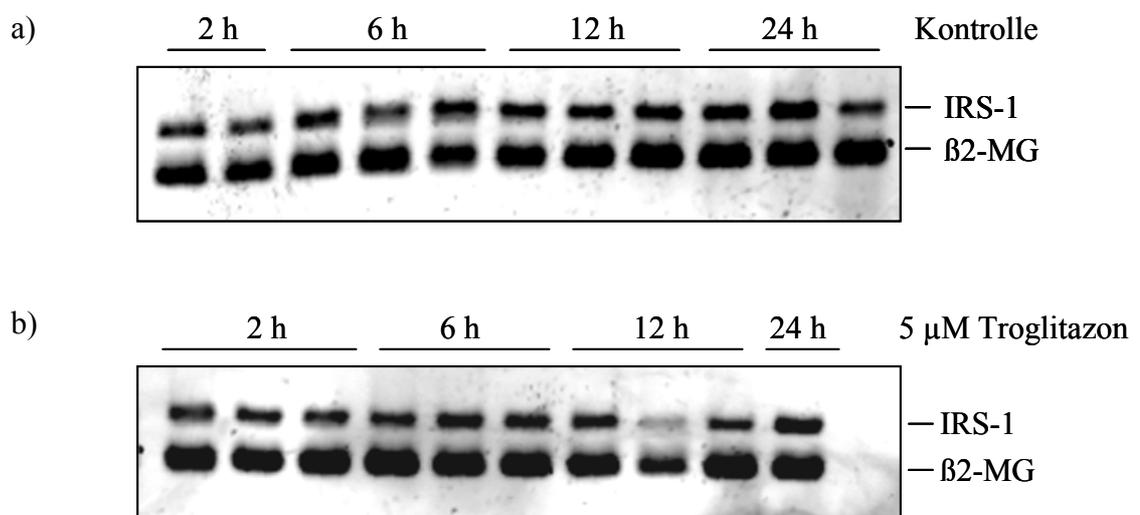
Die IRS-1-Genexpression beträgt nach der TNF- $\alpha$ -Behandlung im Mittel 81,7 %  $\pm$  13,3 % (SEM) der Kontrolle. Mit  $p = 0,3029$  ist das Ergebnis nicht signifikant. Die IRS-1-Genexpression schwankt nach der Behandlung mit Troglitazon um bis zu 52 % bei Spender M 28 (Abb. 17 d). Sie beträgt im Mittel 93,3 %  $\pm$  28,2 % (SEM) der Kontrolle und bleibt

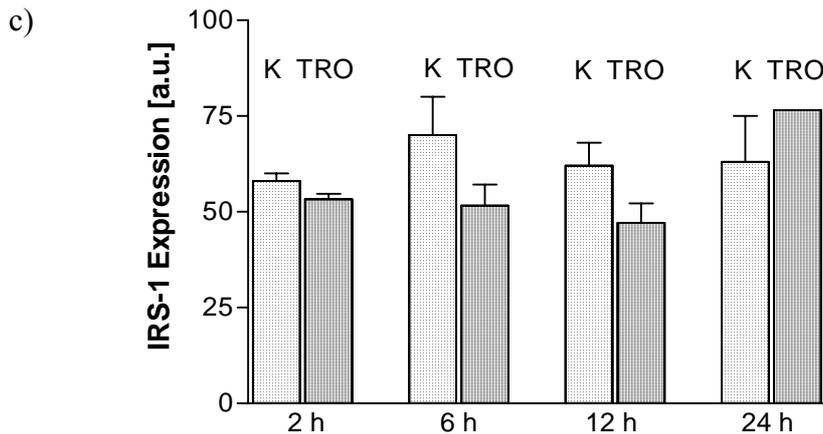
insgesamt mit  $p = 0,8350$  ohne Signifikanz (Abb. 17 e). Die Schwankungen können neben der individuellen Disposition der Spender durch die reverse Transkription bedingt sein, deren Effizienz Studien zufolge 30-90 % beträgt [Newton *et al.*]. Deshalb wurden Mehrfach-Bestimmungen zu jedem Experiment notwendig. Die starken Schwankungen insbesondere bei den mit Troglitazon behandelten Proben lassen aber auch an zeitabhängige Expressionsänderungen denken, weshalb zur Abklärung eine Zeitkinetik erstellt werden sollte.

Bei Spender M 4 war das Verhältnis IRS-1 zu  $\beta 2$ -MG bei den mit TRO behandelten Proben in mehreren PCR-Experiments mit der gleichen cDNA umgedreht. Da dies bei der starken Expression der Haushalts-Gene nicht zu erwarten ist, lag ein unsystematischer Fehler vor.

### 3.2.5. Zeitkinetik zur IRS-1-Genexpression bei Behandlung mit Troglitazon

Bei der Behandlung der Muskelzellen mit Troglitazon traten große Differenzen in der IRS-1-Genexpression zwischen den verschiedenen Spendern auf. Es wurde untersucht, ob kurz nach Beginn der Behandlung eine Expressionsänderung auftritt, die unterschiedliche Ergebnisse bei Spender M 4 und M 28 (Abb. 17 d) bewirkt haben könnte. Myozyten wurden 7 d ausdifferenziert, mit 5  $\mu$ M Troglitazon behandelt und parallel dazu Zellen als Kontrolle kultiviert. 2, 6, 12 und 24 h nach Beginn des Experiments wurden die Zellen geerntet und die cDNA hergestellt. Das Ergebnis der PCR mit etwa 75 ng cDNA zeigt Abb. 18 a - c.





**Abb. 18: Genexpression im Zeitverlauf bei Behandlung der Zellen mit Troglitazon**

Die Genexpression der Kontrolle (a) und der verschieden lange mit 5  $\mu$ M TRO behandelten Zellen (b) ist gezeigt. Die schwache Bande der 12 h mit TRO behandelten Probe wurde als Ausreißer betrachtet und nicht gewertet. Die grafische Darstellung in willkürlichen Einheiten (a.u.) nach Normierung auf  $\beta$ 2-MG zeigt Abb. c. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

\* steht für signifikante Unterschiede.

Die Kontrollen zeigten im Zeitverlauf keine Expressionsänderung, gleiches gilt für TRO behandelte Proben (Abb. 18). Dies wird durch die Null-Hypothese im one-tailed t-Test bestätigt. Die Anzahl der gewerteten Proben betrug  $N = 1$  für den TRO 12 h Wert bzw.  $N = 2-3$  zu den anderen Behandlungssituation. Durch die Behandlung mit Troglitazon wurde gegenüber der Kontrolle ebenfalls keine signifikante Expressionsänderung hervorgerufen.

### 3.3. Genexpressions-Analysen im Skelettmuskel mit einem cDNA-Array

Um Genexpressionsänderung im Skelettmuskel, die unter Einfluss des Fettgewebes auf den Muskel in der Kokultur oder durch  $\text{TNF-}\alpha$  entstehen zu identifizieren, wurde ein cDNA-Array etabliert. Damit kann eine größere Anzahl von Genen untersucht und quantifiziert werden als in der PCR. Ein Nylon-Array, basierend auf einer radioaktiven reversen Transkription, war mit cDNA von 25 doppelbestimmten Genen und dem 6-fach bestimmten Haushalts-Gen GAPDH beschichtet. Pro Experiment wurden Myozyten 48 h als Kontrolle (K), mit Adipozyten (Ko) oder mit 2,5 nM  $\text{TNF-}\alpha$  (TNF) inkubiert und untersucht. Die zwei mRNA-Proben wurden parallel mit radioaktiv markiertem  $^{33}\text{P-dCTP}$  oder  $^{32}\text{P-dCTP}$  revers transkribiert und die so markierte cDNA mit den Oligonukleotid-Sequenzen auf dem Array hybridisiert. Nicht gebundene cDNA wurde durch Waschschrte entfernt. Die Array-Membranen mit den Proben wurden auf einem Phosphoimager-Film exponiert und abschließend densitometrisch ausgewertet. Um unsystematische Fehler zu vermeiden, wurde

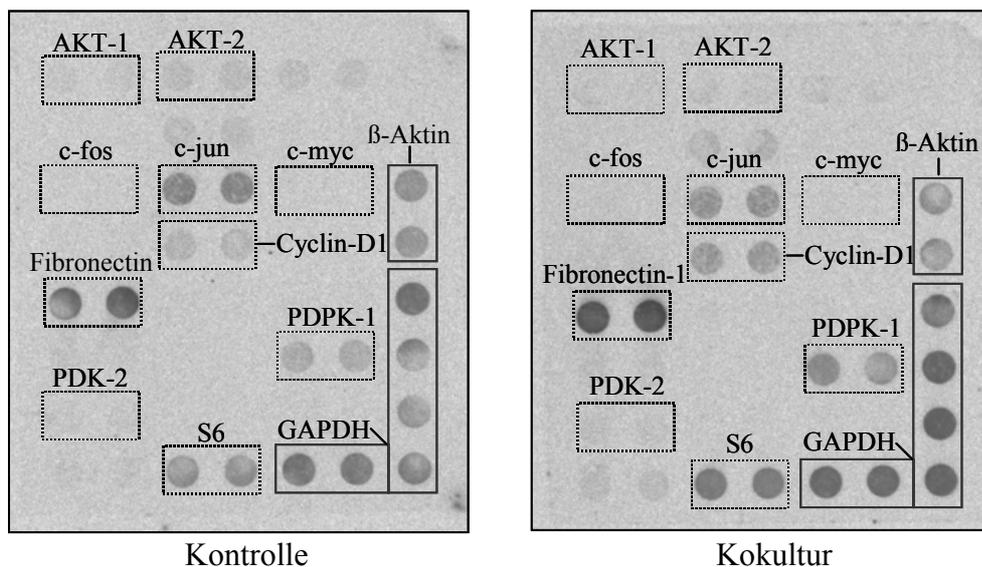
bei der Verwendung der Membranen im nächsten Experiment die Zuordnung der Membran zur Probe (behandelt oder unbehandelt) beibehalten. Fehler bei der Herstellung der Membran träten dann als systematischer Fehler in einer Array-Serie auf. Das Funktionieren des Phosphoimager-Films wurde durch Vertauschen der Membranen und Vergleich der Auswertungs-Ergebnisse einmalig getestet. Die Position der Membran auf dem Phosphoimager-Film wurde anschließend beibehalten.

### 3.3.1. $^{32}\text{P}$ und $^{33}\text{P}$ Markierung der cDNA-Proben

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sowie die Empfindlichkeit des Arrays wurde überprüft, indem Gesamt-RNA des gleichen Spenders W10 als Kontrolle und nach 48 h Kokultur mit Fettzellspender 1 (W10 / FS1) in einer reversen Transkription an zwei Zeitpunkten mit  $^{32}\text{P}$ - (Abb. 19) und mit  $^{33}\text{P}$ -dCTP (Abb. 20) radioaktiv markiert und die cDNA auf den Array gebracht wurde. Die Reproduzierbarkeit wurde

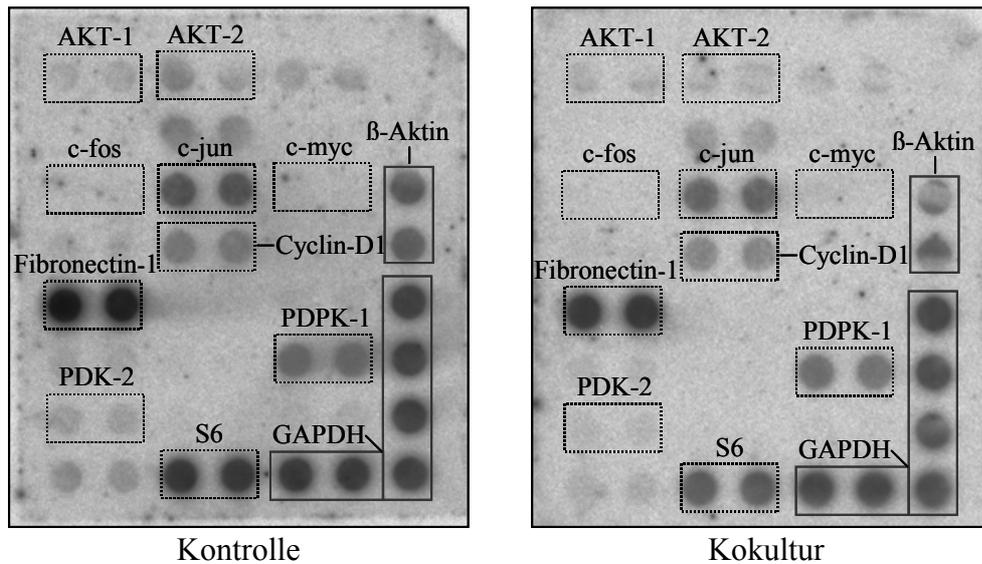
1. durch wiederholte Auswertung des gleichen Densitometer-Ausdrucks
2. durch Auswertung einer Membran nach verschiedenen Expositionsdauern und
3. durch Vergleich von  $^{33}\text{P}$ - und  $^{32}\text{P}$ -Markierung geprüft und quantifiziert.

Die Quantifizierung einiger stärker exprimierter Gene nach Normierung auf GAPDH zeigt Abb. 21.



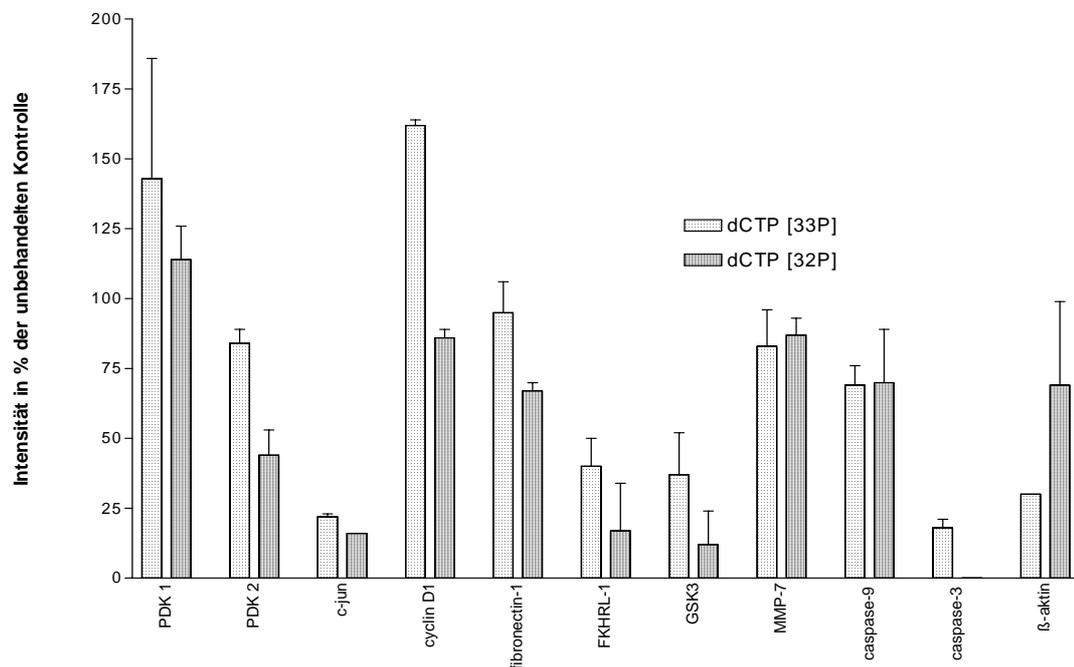
**Abb. 19:  $^{33}\text{P}$ -dCTP: Muskelzell-Spender W10 ohne und nach Kokultur mit Fettzell-Spender 1**

Als Kontrolle dienen Myozyten des Spenders W10, für die Kokultur wurden diese 48 h mit Adipozyten des Fettzell-Spenders 1 kultiviert. Die Gesamt-RNA wurde extrahiert, in einer reversen Transkription mit  $^{33}\text{P}$ -dCTP markiert, auf die Array-Membranen hybridisiert und diese auf einem Phosphoimager-Film exponiert.



**Abb. 20:**  $^{32}\text{P}$ -dCTP: Muskelzell-Spender W10 ohne und nach Kokultur mit Fettzell-Spender 1

Als Kontrolle dienen Myozyten des Spenders W10, für die Kokultur wurden diese 48 h mit Adipozyten des Fettzell-Spenders 1 kultiviert. Die Gesamt-RNA wurde extrahiert, in einer reversen Transkription mit  $^{32}\text{P}$ -dCTP markiert, auf die Array-Membranen hybridisiert und diese auf einem Phosphoimager-Film exponiert.



**Abb. 21:** Reproduzierbarkeit und Vergleich der  $^{33}\text{P}$ - und  $^{32}\text{P}$ -dCTP-Markierung der Arrays

In zwei Array-Experimenten mit der gleichen Gesamt-RNA eines Kokultur-Experiments wurde die Markierung einmal mit  $^{33}\text{P}$ - und einmal mit  $^{32}\text{P}$ -dCTP durchgeführt. Die gemittelten Intensitäten jedes doppeltbestimmten Gens wurden auf GAPDH bezogen. Die Intensität der Gene des Arrays mit der Kontroll-Probe wurde auf 100 % gesetzt, diese erscheinen nicht gesondert in der Grafik. Die Intensität der Genexpression aus dem Kokultur Experiment bei  $^{33}\text{P}$  und bei  $^{32}\text{P}$ -dCTP-Markierung wurde in Prozent auf die Kontrolle bezogen und in der Grafik mit den Mittelwertabweichungen dargestellt.

Für schwächer exprimierte Gene wie Caspase-3, FKHL-1 und GSK-3 wurde die Mittel-Abweichung der Doppelbestimmungen größer. Daher wurde die mittlere Intensität des Untergrundes bestimmt und für schwach exprimierte Gene mindestens die doppelte Intensität des Hintergrundes gefordert, um nach der Untergrund-Korrektur zuverlässige Aussagen zu machen. 10 Gene waren im Skelettmuskel so schwach exprimiert, dass sie im Bereich des Hintergrundes lagen. Diese wurden nicht ausgewertet. Wie Abb. 21 zeigt, ist die Reproduzierbarkeit des Arrays gegeben und insbesondere für stärker exprimierte Gene verlässlich. Wegen der höheren Intensität und damit der Möglichkeit noch einige der schwächeren Gene zu quantifizieren, wurde die Markierung weiter mit  $^{32}\text{P}$  durchgeführt. Es wurde festgestellt, dass die einmalige Auswertung eines Densitometer-Ausdruckes mit einer im Auswertungs-Programm des PC erstellten Maske genügt. Die Variation der Expositionsdauer um  $\pm 1-2$  Tage bringt bei einer Expositionsdauer von 3 - 4 Tagen keine relevanten zusätzlichen Informationen.

Für Cyclin-D1 fällt eine Intensitäts-Abnahme nach der Wiederverwertung auf, die nicht auswertungsbedingt ist. Denkbare Ursache ist ein Fehler bei der Herstellung des Arrays, z.B. bei der Fixation der Oligonukleotide, der sich bemerkbar macht.

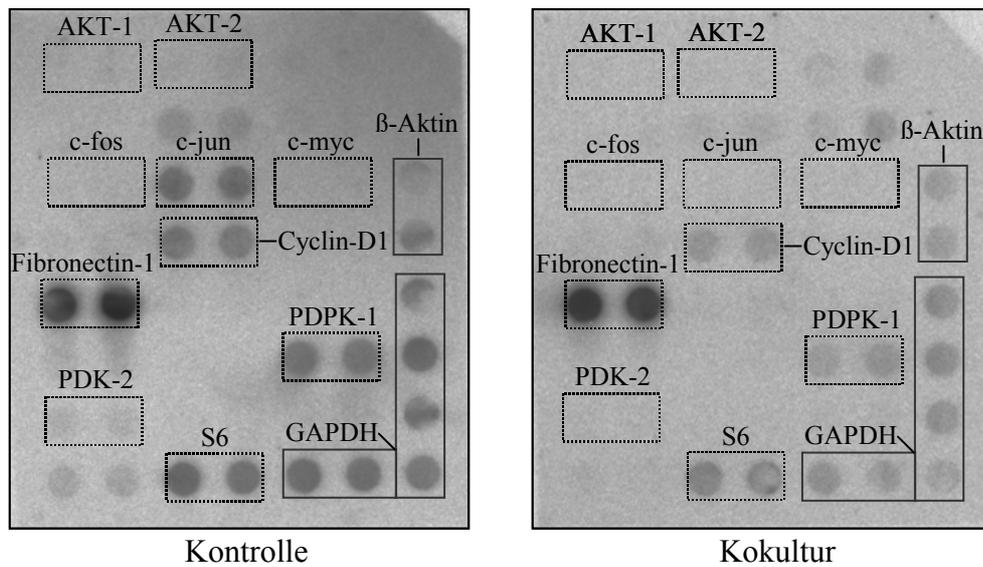
### **3.3.2. Die Effizienz der Reinigung**

Die Effizienz der Reinigung wurde getestet, indem der Array nach dem Reinigen auf einem Phosphorimager-Film ebenso lange wie die ehemaligen Proben exponiert und der Film densitometrisch ausgewertet wurde.

Die Restradioaktivität war dabei für die am stärksten exprimierten Gene auf unter 10% der Ausgangs-Aktivität abgesunken, für weniger stark exprimierte Gene war sie nicht mehr nachweisbar. Um Verfälschungen des nachfolgenden Experiments zu vermeiden, muss die Messung der Restradioaktivität unmittelbar vor Beginn des neuen Versuchs erfolgen. Die Exposition muss entsprechend der später für die Proben zu erwartenden Expositionszeit durchgeführt werden, die erhaltenen Werte dienen dann der Untergrundkorrektur.

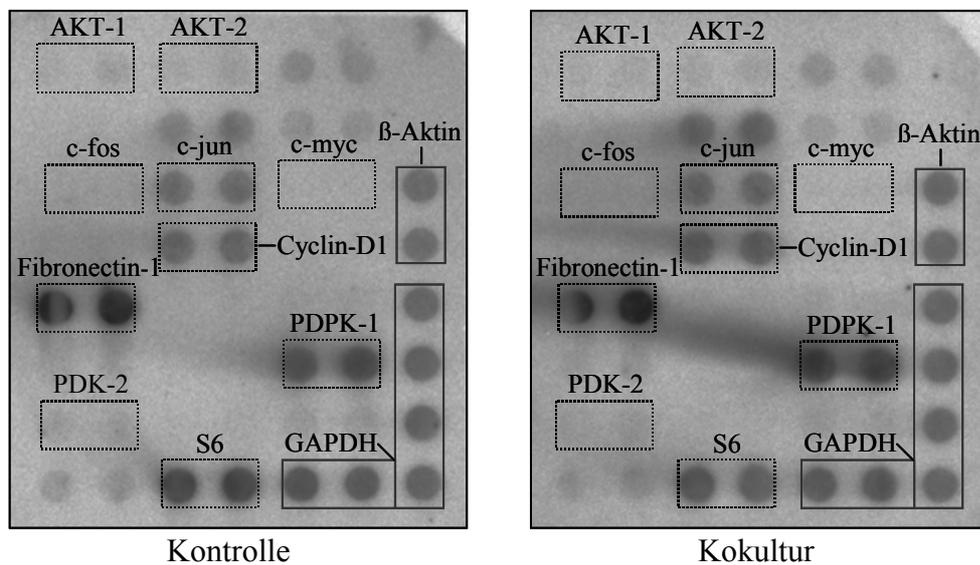
### **3.4. Der Einfluss der Kokultur auf die Genexpression in Skelettmuskelzellen**

Die Abb. 20 und 22 -24 zeigen Experimente mit Zellen von 3 Muskelzellspendern W10, M9, und M5 sowie nach Kokultur mit 4 Fettzellspendern (FS1 – 4) als: W10 (a): W10 / FS1, M9 / FS2, M5 / FS3 und W10 (b): W10 / FS4. Sie sind der Übersicht halber dargestellt, weil sich später folgende Auswertungen auf Ausschnitte der Array-Experimente beziehen.



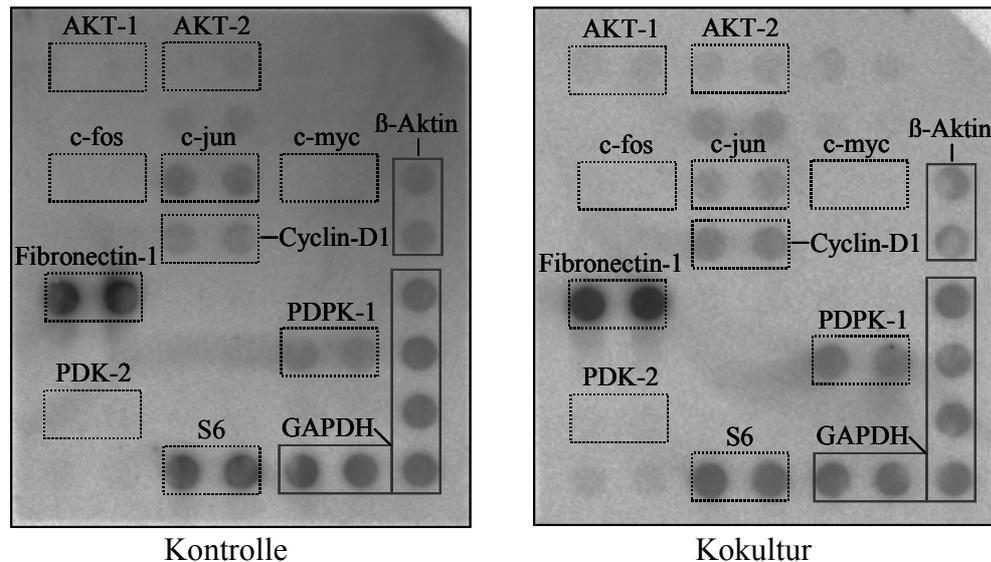
**Abb. 22: Muskelzell-Spender M9 ohne und nach Kokultur mit Fettzell-Spender 2:  $^{32}$  P-dCTP**

Als Kontrolle dienten Myozyten des Spenders M9, für die Kokultur wurden diese 48 h mit Adipozyten des Fettzell-Spenders 2 kultiviert. Die Gesamt-RNA wurde extrahiert, in einer reversen Transkription mit  $^{32}$ P-dCTP markiert, auf die Array-Membranen hybridisiert und diese auf einem Phosphoimager-Film exponiert.



**Abb. 23: Muskelzell-Spender M5 ohne und nach Kokultur mit Fettzell-Spender 3:  $^{32}$  P-dCTP**

Als Kontrolle dienten Myozyten des Spenders M5, für die Kokultur wurden diese 48 h mit Adipozyten des Fettzell-Spenders 3 kultiviert. Die Gesamt-RNA wurde extrahiert, in einer reversen Transkription mit  $^{32}$ P-dCTP markiert, auf die Array-Membranen hybridisiert und diese auf einem Phosphoimager-Film exponiert.

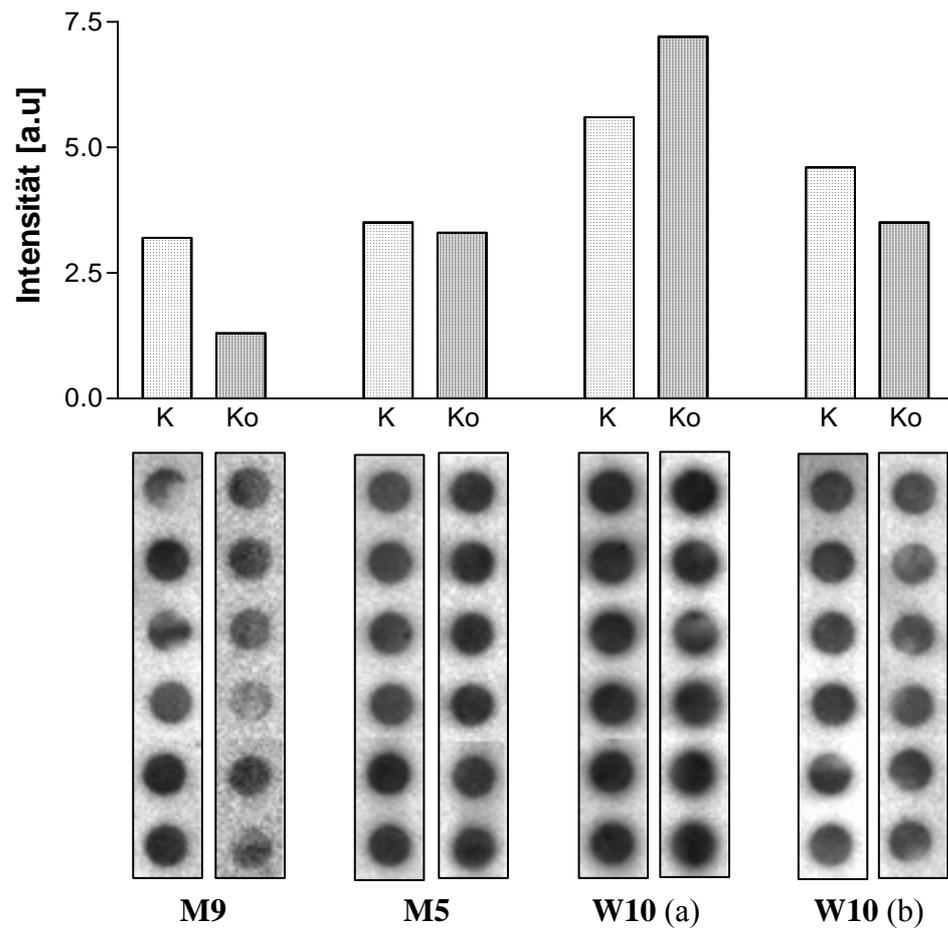


**Abb. 24: Muskelzell-Spender W10 ohne und nach Kokultur mit Fettzell-Spender 4:  $^{32}$ P-dCTP**

Als Kontrolle dienten Myozyten des Spenders W10, für die Kokultur wurden diese 48 h mit Adipozyten des Fettzell-Spenders 4 kultiviert. Die Gesamt-RNA wurde extrahiert, in einer reversen Transkription mit  $^{32}$ P-dCTP markiert, auf die Array-Membranen hybridisiert und diese auf einem Phosphoimager-Film exponiert.

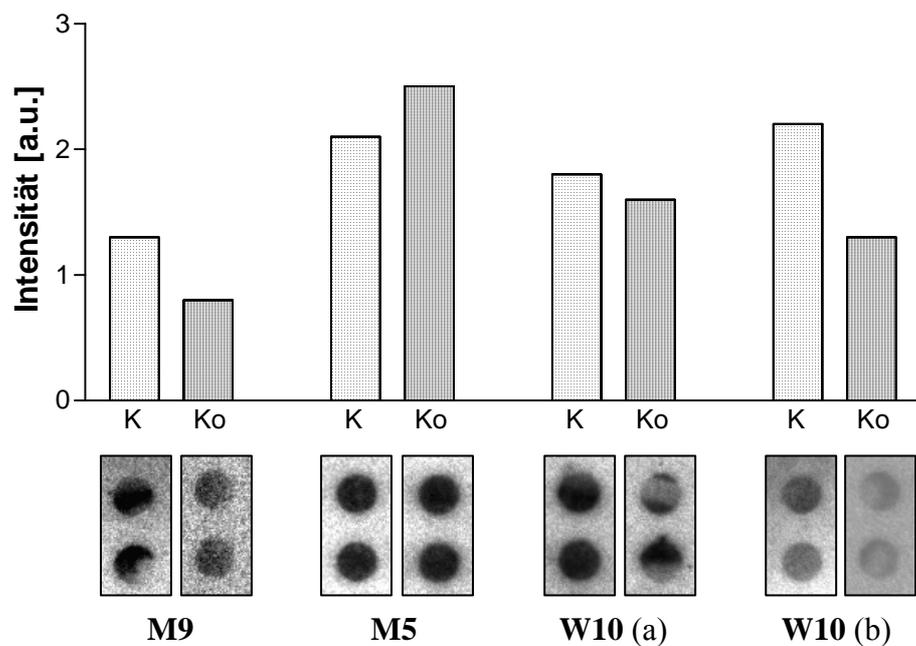
### 3.4.1. Die Genexpression der Haushalts-Gene in der Kokultur

Der Array enthielt zwei Haushalts-Gene:  $\beta$ -Aktin, ein im Muskel stark exprimiertes Protein, das Teil des kontraktiven Apparates ist und Glyzerinaldehyd-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), ein in der Glykolyse benötigtes,  $H_2$ -übertragendes Enzym. Haushalts-Gene sind konstitutiv exprimiert, d.h. sie werden nicht ein- und ausgeschaltet, sondern konstant transkribiert. Sie wurden bereits in der PCR als interner Standard genutzt und sollen Differenzen der beiden Arrays, die durch Herstellung und parallele Behandlung während des Experiments zustande kommen, ausgleichen.  $\beta$ -Aktin war doppelbestimmt auf jeder Membran vorhanden, GAPDH war 6-fach bestimmt. Um auszuschließen, dass sich die Expression der Haushaltsgene durch die Behandlung ändert, wurde die insgesamt auf dem Array abgeschiedene Radioaktivitätsmenge nach der Untergrundkorrektur quantifiziert und die Expressionsintensität der Haushaltsgene darauf bezogen. Die Expression von GAPDH bezogen auf die Gesamtradioaktivität auf dem Array zeigt Abb. 25. Die  $\beta$ -Aktin-Expression bezogen auf die Gesamtradioaktivität auf dem Array zeigt Abb. 26.



**Abb. 25: GAPDH-Expression in 4 Kokultur-Experimenten im cDNA-Array**

Gezeigt ist für 4 Kokultur-Experimente mit 3 Muskelzell-Spendern und 4 Fettzell-Spendern die nicht normierte GAPDH-Expression.



**Abb. 26:  $\beta$ -Aktin-Expression in 4 Kokultur-Experimenten im cDNA-Array**

Für 4 Experimente mit 3 Muskelzell-Spendern und 4 Fettzell-Spendern ist die densitometrisch ermittelte  $\beta$ -Aktin-Expression dargestellt.

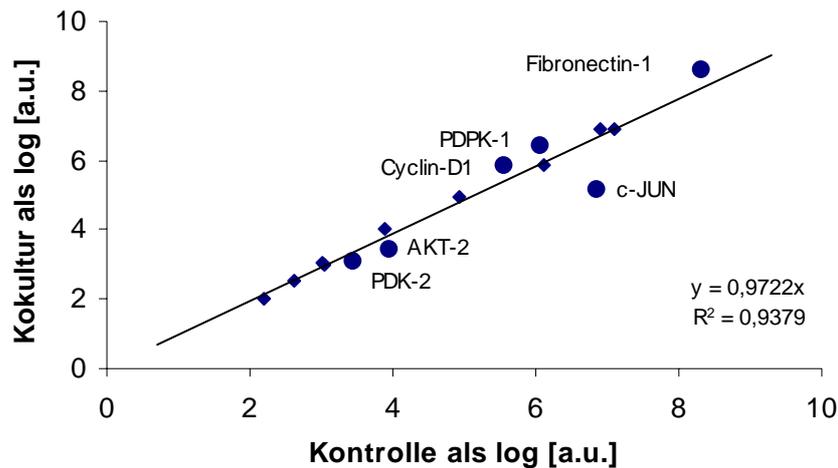
Die GAPDH-Expression in der Kokultur ist im Mittel über alle Spender auf  $85,16\% \pm 18,58\%$  (SEM) der Kontrolle vermindert. Das Ergebnis ist nicht signifikant ( $p=0,4827$ ). Es ergab sich ebenfalls keine signifikante Änderung der  $\beta$ -Aktin mRNA-Expression. Diese war in der Kokultur im Mittel über alle Spender auf  $82,3\% + 13,24\%$  (SEM) abgesunken ( $p=0,2737$ ). Die mittleren Werte für beide Haushalts-Gene sind somit gleich.

Bei Spender M9 variieren die Einzelaktivitäten der GAPDH-Spots auf einer Membran um 40 %. Theoretisch scheidet sich aus der Hybridisierungslösung auf allen Spots etwa gleich viel Radioaktivität ab, denn die Proben rotierten kontinuierlich und waren luftblasenfrei in der Hybridisierungslösung eingeschweißt. Ein unsystematischer Fehler wie z.B. Faltenbildung in der Folie würde zu unterschiedlichen lokalen Konzentrationen in der Hybridisierungslösung führen. In solchen Bereichen ist der Hintergrund mit verändert. Dies war z.B. für Fibronectin oder PDPK-1 in Abb. 23 der Fall. Fehler dieser Art wurden über die Untergrund-Korrektur eliminiert. Systematische Fehler sind am wahrscheinlichsten bei der Herstellung des Arrays entstanden und müssten sich durch eine Versuchsreihe ziehen. Da die pro Membran insgesamt auf den GAPDH-Feldern abgeschiedene Radioaktivitätsmenge jedoch vergleichbar ist, wird von einer zufälligen Verteilung der Radioaktivität auf die Spots ausgegangen.

Bei Spender M5 stieg die  $\beta$ -Aktin-Expression in der Kokultur im Gegensatz zu GAPDH. In beiden Fällen erfolgte für alle Gene zusätzlich eine Auswertung mit  $\beta$ -Aktin. Sie brachte jedoch im Gesamtergebnis keine Änderung. Da GAPDH häufiger auf der Membran vertreten ist, ist es weniger fehleranfällig, als das nur 2-fach vorhandene  $\beta$ -Aktin. Es wurde daher zur Normierung verwendet.

### **3.4.2. Identifikation von Genen mit überdurchschnittlicher Expressionsänderung**

Die doppeltlogarithmische Auftragung stellt Gene heraus, deren Expression sich zwischen Kontrolle und Kokultur unterscheidet. Dazu werden aus 4 Experimenten die normierten Intensitäten errechnet und gemittelt. Die Werte werden dann logarithmiert. Die logarithmierten Intensitäten der zwei experimentellen Bedingungen (Kontrolle, Kokultur) werden dann gegeneinander aufgetragen. Kommt es zu keiner generellen Expressionsänderung, so hat die Regressions-Gerade eine Steigung von eins. Gene mit einer überdurchschnittlichen Expressionsänderung liegen weit von der Regressionsgeraden entfernt. Für die Auftragung wurden 14 mittelstark bis stark exprimierte Gene, die sich gegenüber dem Hintergrund gut abgrenzen ließen, verwendet. Die doppeltlogarithmische Auftragung zeigt die Abb. 27, interessante Gene sind gesondert markiert.



**Abb. 27: Doppeltlogarithmische Auftragung d. Genexpression der Kokultur gegen die Kontrolle**

Die densitometrisch ermittelten Werte jedes Gens wurden auf GAPDH bezogen, logarithmiert, für alle 4 Spender gemittelt und für Kontrolle und Kokultur gegeneinander aufgetragen. Eine Regressionsgerade mit dem Schnittpunkt 0/0 wurde eingefügt. Weit von der Trendlinie entfernte Gene weisen evtl. relevante Expressionsänderungen auf. Sie sind mit • markiert, der Name des Gens ist neben dem Punkt aufgetragen.

Die Regressionsgerade hat eine Steigung von nahezu 1. Die Gen-Punkte sind überwiegend dicht um die Gerade verteilt. Es kam zu keiner globalen Expressionsänderung. Die in der Grafik herausgehobenen Gene mit einer größeren individuellen Expressionsänderung sind: PDK-2, AKT-2, Cyclin-D1, PDPK-1, c-jun und Fibronectin-1. Im folgenden wird für die diabetesrelevanten unter den genannten Genen noch einmal auf die einzelnen experimentellen Ergebnisse detaillierter eingegangen. Es werden Ausschnitte aus den Array-Experimenten gezeigt und eine Analyse der Expressionsänderungen vorgenommen.

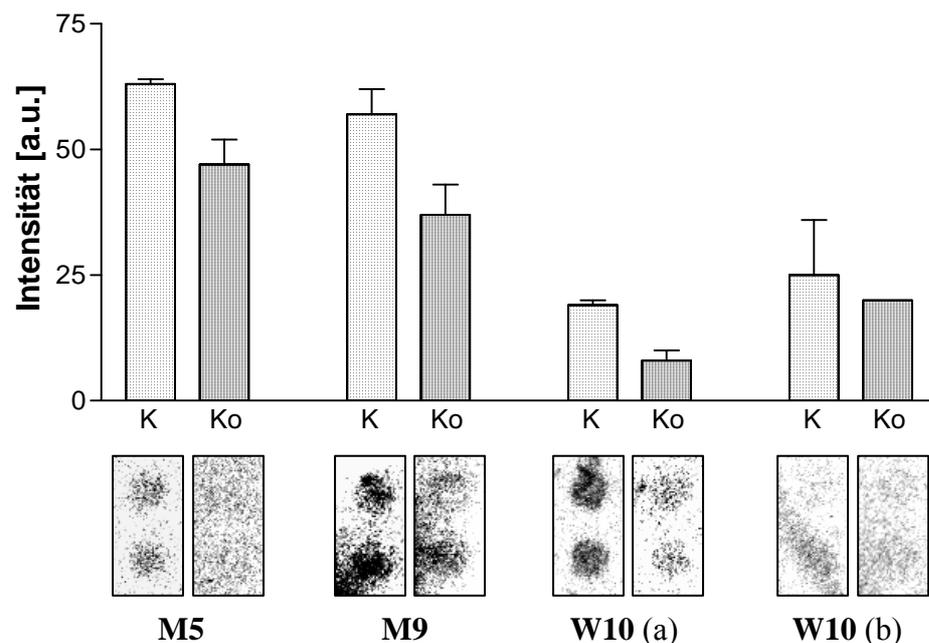
### 3.4.3. Die Genexpression der Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase-Isoform-2

Es sind 4 Isoformen der Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase (PDK 1-4) mit einem Gewebespezifischen Expressionsmuster bekannt [Bowker-Kinley *et al.*]. Sie werden durch Stoffwechselprodukte der Fettsäure-Oxidation und aus dem Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex (PDC) reguliert. Letzterer wird durch die PDK inaktiviert. Dabei unterscheidet man Langzeit- und Kurzzeit-Effekte bei der Regulation der PDK.

Kurzzeit-Effekte sind u.a. Änderungen der PDK-Enzymaktivität, die dazu dienen, kurzfristig auf geänderte Stoffwechselbedingungen zu reagieren und den PDC in seiner Aktivität entsprechend rasch anzupassen. Dies ist z.B. bei Abwechslung zwischen Ruhe und körperlicher Aktivität notwendig.

Langzeit-Effekte sind z.B. Änderungen der PDK-Genexpression. Die diabetische Stoffwechselsituation ist langfristig verändert. Sie ist durch einen Kohlenhydrat-Mangel und eine verstärkte Verstoffwechslung von Fett über die  $\beta$ -Oxidation gekennzeichnet, der PDC wird in seiner Aktivität gebremst. Zu den langfristigen Auswirkungen auf die PDK gibt es dabei nur wenige Studien. Bei diabetischen im Vergleich mit gefasteten Ratten ist eine Verschiebung des Phosphorylierungszustandes des PDC nachgewiesen. Nicht nur die Aktivität sondern auch die Expression der PDK-Isoformen war verändert [Hutson *et al.*; Kerbey *et al.*].

Bei Pima-Indianern korreliert die PDK-Expression mit der Insulin-Konzentration und dem Körperfett [Majer *et al.*]. Die Frage, ob das Fettgewebe die PDK-Expression direkt beeinflusst, soll in dieser Arbeit am Kokultur-Modell für die PDK-2-Expression untersucht werden. Muskelzellen von 3 nichtdiabetischen Spendern wurden mit Fettzellen von 4 nichtdiabetischen Spendern für 48 h inkubiert und untersucht. Das Ergebnis ist in Abb. 28 gezeigt.



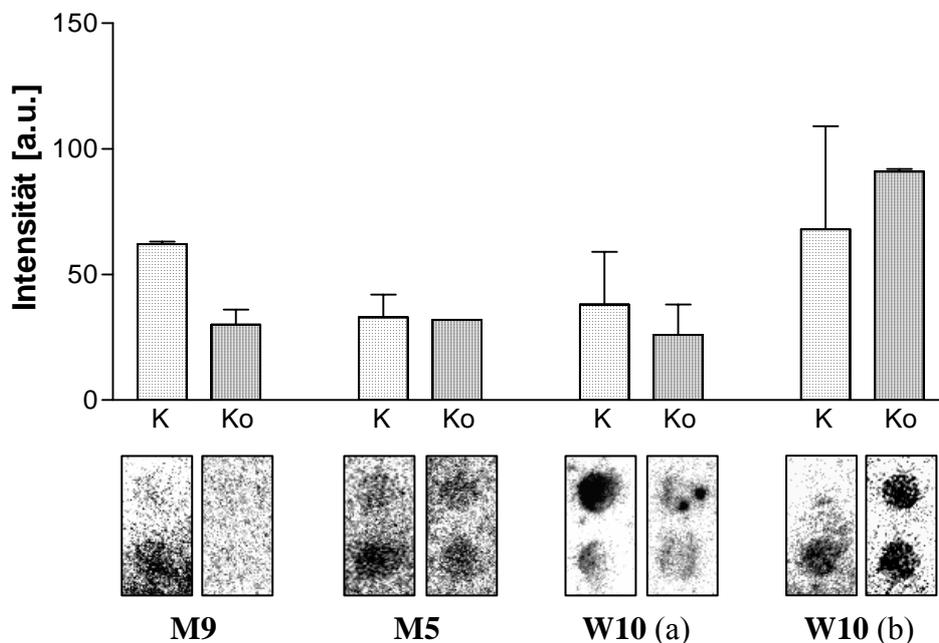
**Abb. 28: PDK-2-Expression in 4 Kokultur-Experimenten im cDNA-Array**

Die auf GAPDH bezogene Expressions-Intensität von Kontrolle (K) und Kokultur (Ko) wurde für 4 Experimente in willkürlichen Einheiten (a.u.) dargestellt. Darunter sind Ausschnitte der Arrays gezeigt.

Es zeigte sich in allen Experimenten übereinstimmend eine geringe, signifikante Expressionsabnahme in der Kokultur. Im Mittel ist die PDK-2-Expression in der Kokultur auf 65,4 % der Kontrolle abgesunken. Der Standardfehler (SEM) beträgt 8,37 %. Die Änderung ist signifikant, im t-Test ergab sich ein p-Wert von 0,0257.

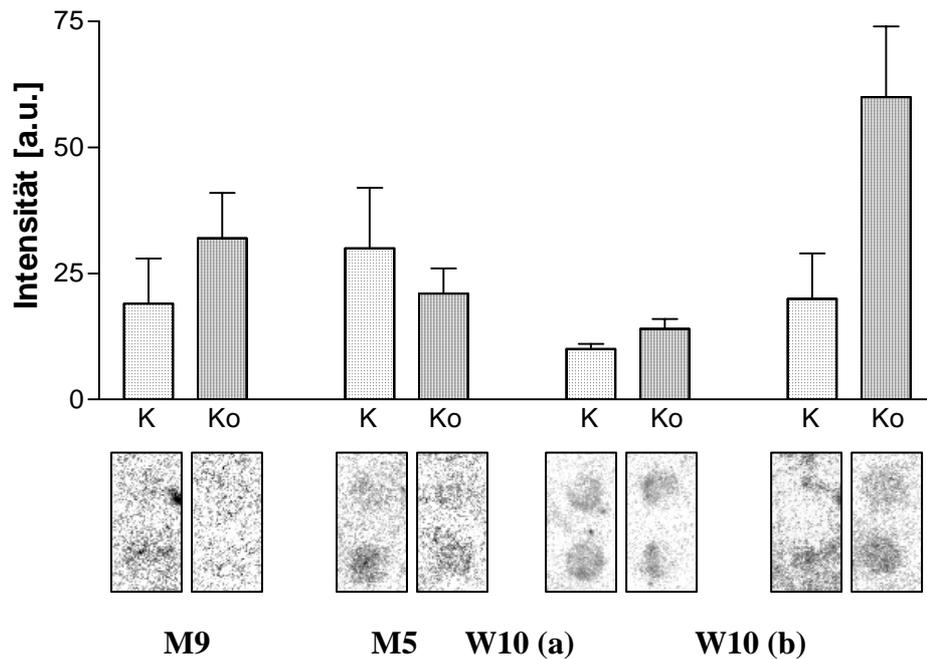
### 3.4.4. Die Genexpression von AKT-1 und AKT-2 in der Kokultur

Von der AKT / Protein-Kinase B existieren 3 Isoformen und deren Spleißvarianten. In dieser Arbeit wurden die Isoformen 1 und 2 untersucht. Die AKT kontrolliert Zellfunktionen wie Apoptose, Protein-Translation, den Glykogen-Metabolismus und die Glut4-Translokation. Sie wird als Folge eines Insulinstimulus aktiviert. Eine reduzierte AKT-Aktivität geht mit einem verringerten Glukose-Transport einher. Die Frage, wie groß der Einfluss der AKT auf die Insulinresistenz ist, ist noch nicht beantwortet. Auf einen Insulin-Stimulus erfolgt u.a. eine Tre<sup>308</sup>/Ser<sup>473</sup>-Phosphorylierung der AKT [Alessi *et al.* (f)], die unter Kokultur-Bedingungen vermindert ist. Die AKT-Protein-Expression ist dabei nicht verringert, was im Sinne einer Insulin-Resistenz interpretiert wird [Dietze *et al.*]. Hier soll untersucht werden in welchem Verhältnis AKT-1 und AKT-2 im Muskel zueinander stehen und ob durch die Kokultur eine Genexpressionsänderung induziert wird, die für ein geändertes Signalverhalten verantwortlich sein könnte. Die Expression in Experimenten mit 4 Spendern und die grafische Auswertung sind den Abb. 29 für die AKT-2 und Abb. 30 für die AKT-1 zu entnehmen. Die AKT-1 zeigt eine geringe Expression, die bei der Darstellung der experimentellen-Daten eine hohe Kontrastverstärkung nötig macht. Die Expression der beiden AKT-Isoformen im Vergleich zeigt Abb. 31.



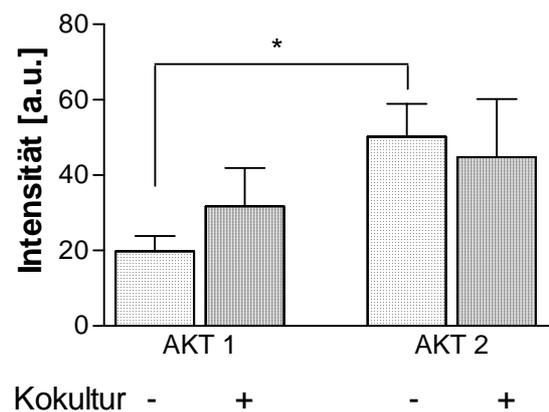
**Abb. 29: AKT-2-Expression in 4 Kokultur-Experimenten im cDNA-Array**

Die auf GAPDH bezogene Expressions-Intensität der Kontrolle (K) und der Kokultur (Ko) wurde für 4 Experimente in willkürlichen Einheiten (a.u.) dargestellt. Darunter sind Ausschnitte der Arrays gezeigt.



**Abb. 30: AKT-1-Genexpression in 4 Kokultur-Experimenten im cDNA-Array**

Die auf GAPDH bezogene Expressions-Intensität der Kontrolle (K) und der Kokultur (Ko) wurde für 4 Experimente in willkürlichen Einheiten (a.u.) dargestellt. Darunter sind Ausschnitte der Arrays gezeigt.



**Abb. 31: mRNA-Expression der Isoformen AKT-1 und AKT-2 im Vergleich**

Mittlere Expressions-Intensität und SEM für die 4 Kokultur-Experimente wurden für AKT-1 und -2 grafisch dargestellt. (\* bedeutet Signifikanz)

Die mRNA-Expression der AKT-Isoformen ist insgesamt recht schwach.

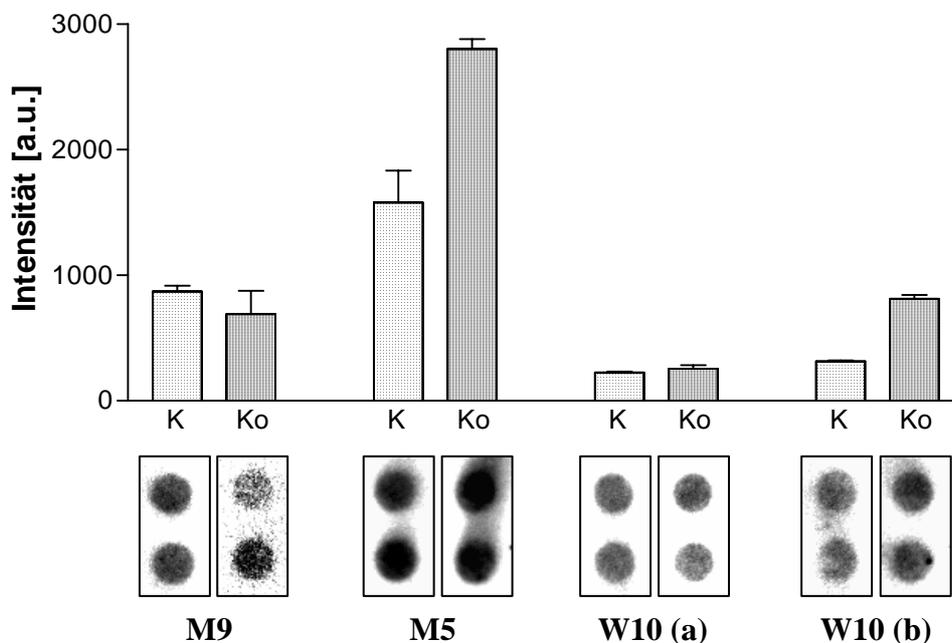
Die mittlere Expression der AKT-2 ist nach der Kokultur im Mittel auf  $86,90 \% \pm 18,54 \%$  (SEM) der Kontrollen abgesunken, jedoch nicht signifikant verändert ( $p = 0,5308$ ).

Die mittlere AKT-1-Expression in der Kokultur beträgt  $169,6 \% \pm 48,13 \%$  (SEM) der Kontrolle. Die Differenz ist nicht signifikant ( $p = 0,2440$ ). Wieder zeigt sich ein Einfluss der verschiedenen Fettzellspender. Bei W10 (a) (FS1) steigt die AKT-1-Expression nach der Kokultur auf  $140 \% \pm 20 \%$ , bei W10 (b) (FS4) auf  $300 \% \pm 70 \%$  des Ausgangs-Wertes.

Im direkten Vergleich der Isoformen beträgt in unbehandelten Myozyten die Expression der AKT-1  $39,36 \%$  von der der AKT-2, das Ergebnis ist signifikant mit  $p = 0,019$ .

### 3.4.5. Die Genexpression der Phosphoinositide-dependent-kinase-1

Die Funktion der PDPK-1 auf Proteinebene ist gut untersucht, auf genomischer Ebene kaum. PDPK-1-Gen-Defekte sind nicht Ursache des NIDDM [Hansen *et al.*]. Bei Keratinozyten wird die Regulation der PDPK-1-Transkription über den PPAR- $\beta$  vermittelt. Eine Steigerung der PDPK-1-Expression erhöhte dort die AKT-1-Aktivität [Di-Poi *et al.*]. PDPK-1 phosphoryliert nach einem Insulin-Stimulus die AKT an Thr<sup>308</sup> [Alessi *et al.* (c), (f), Wick *et al.*], was deren Autophosphorylierung an Ser<sup>473</sup> bewirkt [Toker *et al.* 2000]. Die AKT-Ser<sup>473</sup>-Phosphorylierung ist unter Kokultur-Bedingungen vermindert, die AKT-Protein-Expression ist unverändert [Dietze *et al.*]. Die Ursache könnte eine veränderte PDPK-1-Genexpression sein, die eine verminderte AKT-Aktivierung bewirkt. Dies soll hier in der Kokultur analysiert werden. Die Ergebnisse zeigt Abb. 32.



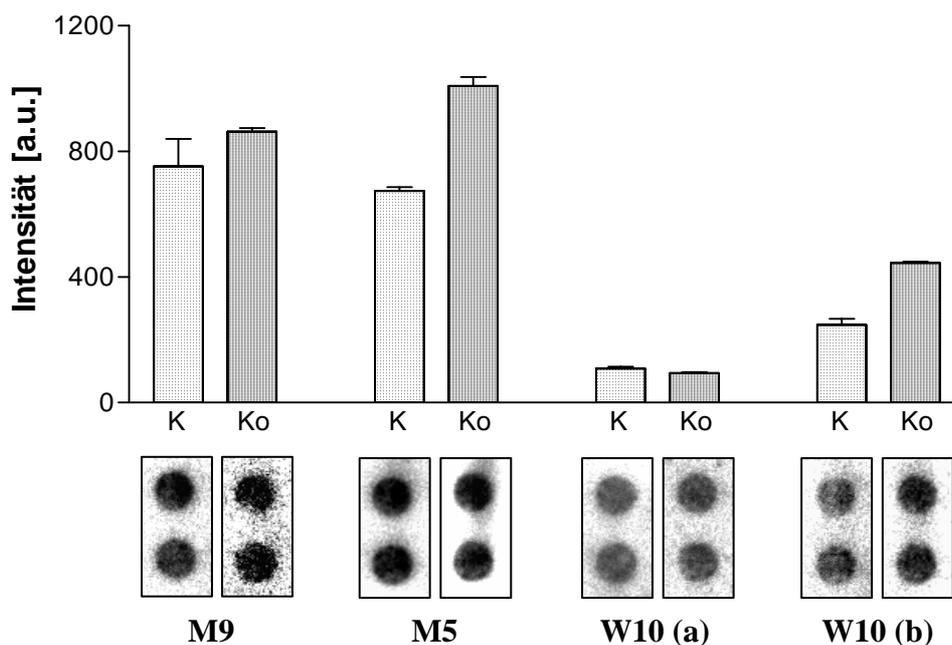
**Abb. 32: PDPK-1-Expression in 4 Kokultur-Experimenten im cDNA-Array**

Die auf GAPDH bezogene Expressions-Intensität der Kontrolle (K) und der Kokultur (Ko) wurde für 4 Experimente in willkürlichen Einheiten (a.u.) dargestellt. Darunter sind Ausschnitte der Arrays gezeigt.

Die PDPK-1-Expression ist unter Kokultur-Bedingungen mit im Mittel  $157,63 \pm 39,52$  % (SEM) gegenüber der Kontrolle nicht signifikant verändert ( $p = 0,2943$ ) (Abb. 32). Für Muskelzell-Spender M9 fiel die Expression in der Kokultur auf  $79,4 \pm 21$  % der Kontrolle. Für Muskelzell-Spender M5 stieg sie in der Kokultur auf  $177 \pm 5$  %. Der Einfluss zweier Fettzellspender auf einen Muskelzellspender wird erneut deutlich. Bei W10 (a) erhöhte sich nach der Kokultur mit Fettzell-Spender 1 die PDPK-1-Expression auf  $114 \pm 11,5$  %; nach der Kokultur mit Fettzell-Spender 4 betrug bei W10 (b) die Expression  $259 \pm 9,5$  %.

### 3.4.6. Die Genexpression von Cyclin-D1 in der Kokultur

Cycline kontrollieren Zell-Zyklus, Proliferation und Differenzierung [Nigg *et al.*, Motokura *et al.* 1993, Skapek *et al.*, Zhang *et al.*]. Die Stimulation mit Wachstumsfaktoren bewirkt einen partiellen Wiedereintritt differenzierter C2C2-Myotuben in den Zell-Zyklus [Tiainen *et al.*]. Dies geht u.a. mit einer gesteigerten Cyclin-D1-mRNA-Expression einher [Jahn]. Auch Insulin beeinflusst die Cyclin-D1-Proteinexpression. Involviert ist u.a. der PI3K / p70S6-Kinase-Weg, die Cyclin-D1-mRNA-Menge wird durch PI3K-Inhibitoren verringert [Conejo *et al.*, Dufourny *et al.*]. Der Zusammenhang von NIDDM, mitogener Signaltransduktion und der Cyclin-Beteiligung ist kaum untersucht. Bei Hyperglykämie wird bei STZD-Mäusen und *in vitro* verstärkt Cyclin-D1-Protein in Nierentubulus-Zellen exprimiert [Feliars *et al.*]. TZD inhibieren in A10-Aortenmuskelzellen die Cyclin-D1-Proteinexpression nach mitogenen Stimuli und hemmen so möglicherweise deren Proliferation bei Artherosklerose [Hupfeld *et al.*]. Untersucht wird in der Kokultur, ob Fettgewebe durch Modifikation der Insulin-Signalkaskade die Cyclin-D1-Genexpression im differenzierten Skelettmuskel moduliert (Abb. 33).



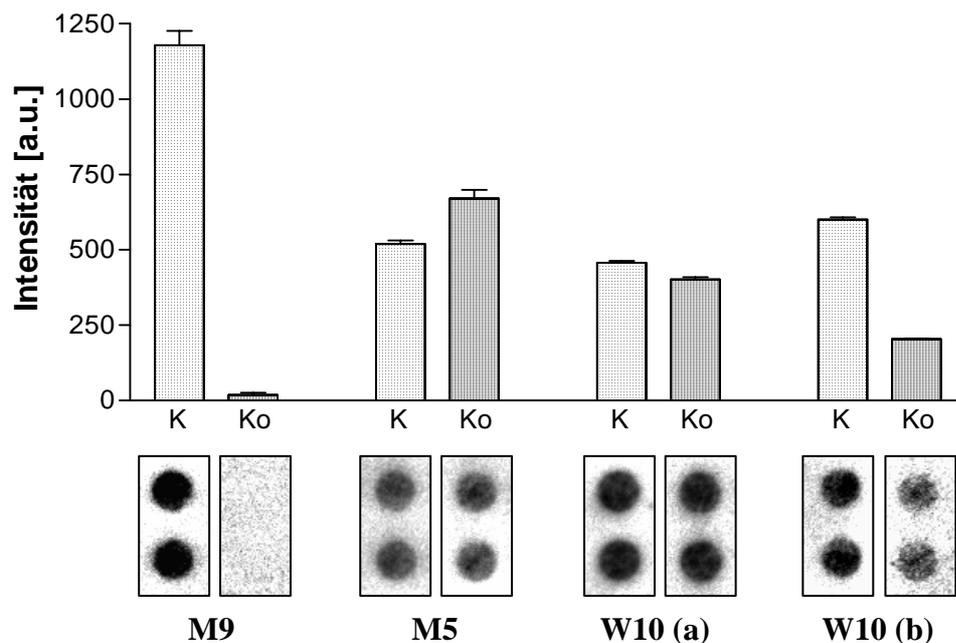
**Abb. 33: Cyclin-D1-Expression in 4 Kokultur-Experimenten im cDNA-Array**

Die auf GAPDH bezogene Expressions-Intensität der Kontrolle (K) und der Kokultur (Ko) wurde für 4 Experimente in willkürlichen Einheiten (a.u.) dargestellt. Darunter sind Ausschnitte der Arrays gezeigt.

Für Cyclin-D1 ist die Genexpression in der Kokultur im Mittel auf  $132,90\% \pm 20,31\%$  (SEM) gestiegen. Die Änderung ist nicht signifikant ( $p$ -Wert = 0,2037). Dies liegt vor allem an Spender W10 / FS1, der eine insgesamt niedrige Expression von Cyclin-D1 zeigt und bei dem als einziger eine geringe Expressionsabnahme auf  $87\% \pm 2\%$  zu verzeichnen ist.

### 3.4.7. Die Genexpression von c-jun, c-fos und c-myc in der Kokultur

Die Transkriptionsfaktoren c-jun, c-myc und c-fos sind an der Weiterleitung von Wachstums- und Differenzierungsreizen beteiligt. Stimuli wie Serumentzug, Insulin, Hyperglykämie [Bandyopadhyay *et al.*] und auch TNF- $\alpha$  [Clerk *et al.*] führen schließlich zu einer verstärkten Phosphorylierung von c-jun [Levrresse *et al.*]. C-jun und c-fos aktivieren als AP-1-Komplex die Transkription. Anders als für c-jun sind c-fos- und c-myc-Expression und -Phosphorylierung stark insulinreagibel und gewebsabhängig [Thompson *et al.*, Olson *et al.*, Kim SJ *et al.*]. Die c-jun-Genexpression nach Insulinstimuli in vivo an Fett- und Muskelgewebe der Ratte [Olson *et al.*] oder im Skelettmuskel insulinresponsiver und -nichtresponsiver Probanden [Thompson *et al.*] wurde über maximal 24 h untersucht. Da TNF- $\alpha$  im Myokard eine Aktivierung von c-jun bewirkt [Clerk *et al.*], wurde hier nach Effekten der Kokultur auf die mRNA-Expression von c-jun, c-fos und c-myc gesucht. Abb. 34 zeigt nur das Ergebnis für c-jun, c-fos und c-myc waren so schwach exprimiert, dass keine Auswertung möglich war.



**Abb. 34: c-jun-Genexpression in 4 Kokultur-Experimenten im cDNA-Array**

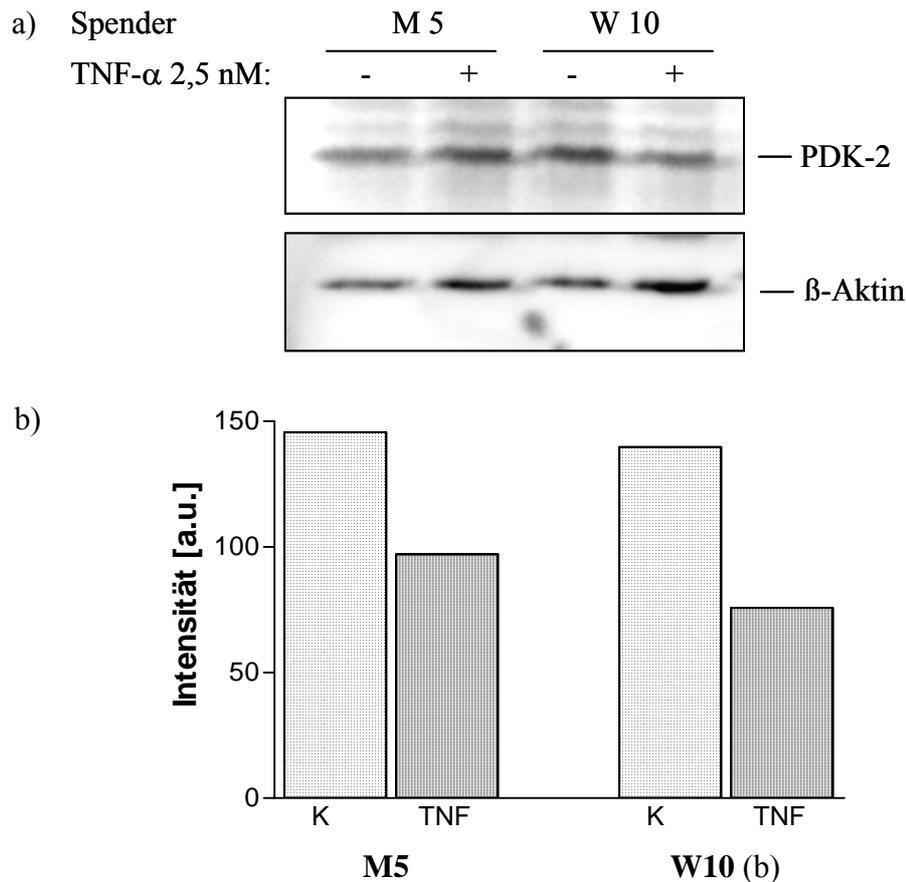
Die auf GAPDH bezogene Expressions-Intensität der Kontrolle (K) und der Kokultur (Ko) wurde für 4 Experimente in willkürlichen Einheiten (a.u.) dargestellt. Darunter sind Ausschnitte der Arrays gezeigt.

Die c-jun-Expression in der Kokultur ist im Mittel auf 63,2 % abgesunken, der Standardfehler (SEM) beträgt 28,33 %. Der Wert ist nicht signifikant ( $p = 0,2947$ ). Es fällt auf, daß die basale c-jun-mRNA-Expression von M9 etwa doppelt so hoch liegt wie die der anderen Spender obwohl die GAPDH-Intensität im Vergleich mit anderen Membran eher gering war (d.h. dies ist kein Normierungsartefakt!) und nimmt in der Kokultur dann auf fast Null ab.



### 3.6. Proteinexpression der mit TNF- $\alpha$ behandelten Skelettmuskelzellen

Die PDK-2-Proteinexpression wurde an Zellen von 2 Muskelzell-Spendern nach Behandlung der Proben mit TNF- $\alpha$  für 48 h untersucht. Western-Blots mit Protein-Lysaten von M5 und W10 wurden mit PDK-2-Antikörper detektiert und wie bereits für die Kokultur Experimente beschrieben mit  $\beta$ -Aktin redetektiert. Ein repräsentatives Ergebnis für die mit TNF- $\alpha$  behandelten Proben sowie die zugehörigen Quantifizierungen zeigt Abb. 36.



**Abb. 36: Western-Blot mit PDK-2 Antikörper an mit TNF- $\alpha$  behandelten Myozyten**

Im Western-Blot wurden je 20  $\mu$ g Protein eingesetzt, mit einem polyklonalen PDK-2-Antikörper detektiert und mit  $\beta$ -Aktin redetektiert (a). Die densitometrisch ermittelte PDK-2-Protein-Menge wurde auf die  $\beta$ -Aktin-Menge normiert und ist für Kontrolle (K) und die mit TNF- $\alpha$  Proben (TNF) für 2 Muskelzell-Spender in willkürlichen Einheiten (a.u.) aufgetragen (b) (\* steht bei Signifikanz).

Die zu Normierung benutzten  $\beta$ -Aktin-Mengen von Kontrolle und TNF- $\alpha$  behandelter Probe lagen vergleichbar hoch. Es zeigte sich im Western-Blot für die zwei Spender M5 und W10 eine Abnahme der Proteinexpression von PDK-2 auf  $61,47\% \pm 5,10\%$  (SEM) in der TNF- $\alpha$  behandelten Probe. Das Ergebnis ist im gepaarten t-Test aufgrund der zu kleinen Stichprobe nicht signifikant ( $p=0,0839$ ).

## 4. Diskussion der Ergebnisse

Ein Zusammenhang zwischen Adipositas und Insulinresistenz ist lange bekannt. Beim Menschen ist die Produktion von TNF- $\alpha$  neben Makrophagen in Adipozyten und Myozyten nachgewiesen [Sagizadeh *et al.*]. Im Gewebe adipöser Menschen wird TNF- $\alpha$  überexprimiert [Hotamisligil *et al.* 1995]. Das Ausmaß der Insulinresistenz und das Fettverteilungsmuster korrelieren mit dem TNF- $\alpha$ -Plasma-Spiegel [Nilsson *et al.*, Tsigos *et al.*]. Die molekularen Mechanismen der TNF- $\alpha$ -induzierten Insulinresistenz werden derzeit unter anderem im Skelettmuskel untersucht, der als insulinabhängiges Gewebe von einer Insulinresistenz direkt betroffen ist. Da Einflüsse von TNF- $\alpha$  auf die Differenzierung von Skelettmuskelzellen nachgewiesen sind [Halse *et al.*] und weil in vivo adulte Myozyten vorliegen, wurden in dieser Arbeit differenzierte Myotuben verwendet. Mittels der semiquantitativen RT-PCR-Methode wurden Genexpressionsanalysen durchgeführt.

### 4.1. Myozyten exprimieren unabhängig von der TNF- $\alpha$ -Konzentration nur TNFR-1

Da bei Adipositas erhöhte TNF-Plasma-Spiegel vorliegen [Sagizadeh *et al.*] und da dort der lösliche Anteil an TNFR-Isoformen erhöht ist [Tsigos *et al.*] wurde die TNFR-Expression überprüft, um in späteren Experimenten durch die TNF- $\alpha$ -Behandlung Verfälschungen zu vermeiden. Weiter ist unbekannt, welche Isoform bei humanen Myotuben dominiert.

Die Myotuben wurden für 48 h mit 2,5 nM TNF- $\alpha$  behandelt. Mit und ohne TNF- $\alpha$  Stimulation wurden die TNFR-1 und -2-mRNA-Mengen mittels semiquantitativer PCR bestimmt. Es zeigte sich, dass die unbehandelten humanen Myozyten fast nur den TNFR1 exprimieren. Die TNF- $\alpha$ -Einwirkung bewirkte keine Expressionsänderung. Auch für den schwach exprimierten TNFR2 konnte kein TNF- $\alpha$ -Einfluss festgestellt werden (Abb. 16).

Da die TNFR-Isoformen aufgrund ihrer unterschiedlichen intramembranären Domänen verschiedene Signalwege aktivieren [Vandenabeele *et al.*] und trotz einer ähnlichen extramembranären Domäne eine unterschiedliche Affinität zu TNF- $\alpha$  aufweisen [Tartaglia *et al.* 1991], legt das Überwiegen der TNFR1-Isoform nahe, dass in Myozyten das TNF- $\alpha$ -Signal wie in anderen Zellen [Peraldi *et al.*, Chen *et al.*] überwiegend über den TNFR1 vermittelt wird. In humanen Adipozyten wird die TNF- $\alpha$ -induzierte Modifikation der Insulinsensitivität überwiegend über die TNFR1-Isoform mediiert [Liu LS *et al.* (b)]. Die TNFR2-Isoform scheint dort jedoch bei geringen TNF- $\alpha$ -Konzentrationen auch am Signaling beteiligt zu sein.

#### 4.2. TNF- $\alpha$ und Troglitazon beeinflussen die IRS-1-Genexpression nicht

Die Interaktionen zwischen TNF- $\alpha$  und dem Insulin-Signalweg sind noch weitgehend unklar. TNF- $\alpha$  aktiviert über den TNFR1 nukleäre Transkriptionsfaktoren. Dies sind hauptsächlich Nuclear Factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) und c-jun [Chen *et al.*]. Auswirkungen auf die Expression weiterer Gene sind bei Adipozyten bereits beschrieben. Man unterscheidet dabei kurzfristige und langfristige Effekte. Beispielsweise nahm die mRNA-Menge des GLUT4 sowie der Lipoprotein-Lipase 2 h nach TNF- $\alpha$ -Behandlung ab [Hauner *et al.*]. Langzeit-Effekte nach 24 h TNF- $\alpha$ -Behandlung sind bei 3T3-L1-Adipozyten unter anderem für die Expression des IR, von IRS-1 und der AKT in Studien mit Oligonukleotid-Arrays nachgewiesen [Ruan *et al.*]. TNF- $\alpha$  hat in Adipozyten eine verringerte Tyrosin-Phosphorylierung von IRS-1 zur Folge [Liu, LS *et al.* (b)]. Dietze *et al.* konnten dies auch bei Myotuben zeigen. Weiter fand sich eine reduzierte IRS-1 Protein-Menge nach einer 48 h TNF- $\alpha$ -Behandlung, die bei gleichzeitigem Zusatz von Troglitazon reversibel war [Dietze *et al.*]. Daher wurde in dieser Arbeit untersucht, ob es zu diesem Zeitpunkt zu einer Änderung der Genexpression von IRS-1 kam oder ob es sich um posttranskriptionale Modifikationen handelt.

Dazu wurde eine Multiplex-PCR mit IRS-1 und dem konstitutiv exprimierten Gen  $\beta$ 2-Microglobulin etabliert, so dass die IRS-1-Expression bezogen auf  $\beta$ 2-MG als internen Standard verglichen werden konnte. Die untersuchten Zellen stammten von 3 nicht-diabetischen Skelettmuskelzell-Spendern und wurden 48 h mit 2,5 nM TNF- $\alpha$  oder mit 5  $\mu$ M Troglitazon behandelt. Im Mittel über alle 3 Spender zeigte sich gegenüber der Kontrolle keine signifikante Expressionsänderung weder nach TNF- $\alpha$ - noch nach Troglitazon-Exposition (Abb. 17). Dabei wurden Zellen von 2 der untersuchten Spender von Dietze zur Untersuchung der Proteinexpression ebenfalls verwendet (M28 und W10). Bezüglich der Genexpression zeigen die Spenderzellen eine große individuelle Variabilität. Spender M4 zeigte unter TNF- $\alpha$ -Einfluss eine fast 50 %ige Reduktion der IRS-1-Expression und eine fast 50 %ige Expressionssteigerung nach Zusatz von Troglitazon. Dies stimmt mit den von Dietze *et al.* [2002] beschriebenen Ergebnissen überein. Unter Zusatz von TNF- $\alpha$  erfolgte eine Abnahme der IRS-1-Protein-Menge um etwa 40 % gegenüber der Kontrolle, die durch Zusatz von Troglitazon reversibel war. Für Spender M28 fand sich jedoch unter Troglitazon eine Expressionsabnahme, während für TNF- $\alpha$  keine Expressionsänderung erfolgte. Die von Dietze *et al.* [2002] in der Proteinexpression beobachteten Änderungen könnten (wenn nicht durch eine Genexpressionsänderung verursacht) z.B. durch eine Wirkung von TNF- $\alpha$  auf den ribosomalen Apparat zustande kommen.

Aufgrund starker Differenzen der IRS-1-Expression nach Troglitazon-Behandlung zwischen Spender M28 und Spender M4 wurde für Troglitazon eine Zeitkinetik über 2, 6, 12 und 24 h erstellt (Abb. 18). Dabei sollte nach kurzfristigen Expressionsänderungen gesucht werden, die die Differenzen zwischen den Spendern erklären. Sie könnten eine individuelle Reaktion auf das Medikament darstellen, das bei in vivo-Applikation auch nur kurzfristig hohe Wirkkonzentrationen erreicht. Es zeigte sich jedoch insgesamt keine signifikante Änderung gegenüber den Kontrollen. Da keine relevanten Genexpressionsänderungen auftraten, wurde auf eine gemeinsame Stimulation mit TNF- $\alpha$  und Troglitazon verzichtet.

Damit scheint die von Dietze *et al.*[2002] beschriebene Wirkung von TNF- $\alpha$  bzw. Troglitazon auf IRS-1 ausschließlich auf posttranskriptionalen Veränderungen und Veränderungen insbesondere auf der Proteinebene zu beruhen.

### **4.3. Etablierung eines radioaktiven cDNA-Arrays zur Genexpressions-Analyse**

Mit Hilfe der Array-Technologie kann eine größere Anzahl von Genen in kurzer Zeit untersucht werden. Ein kommerziell erhältlicher Nylon-DNA-Array mit 26 Genen, basierend auf einer radioaktiven reversen Transkription, wurde etabliert. Die Reproduzierbarkeit der mit dem Array erzielten Ergebnisse wurde überprüft. Grundsätzlich ist problematisch, dass die zu analysierenden Gene nur zweifach aufgetragen sind, da bei mittelstark und schwach exprimierten Genen Intensitätsschwankungen bis zu 50 % auftraten, was die Aussagekraft erheblich einschränkt. Für stärker exprimierte Gene war die Reproduzierbarkeit jedoch gegeben (Abb. 21). Die Spezifität des Arrays bei Markierung mit  $^{32}\text{P}$  gegenüber  $^{33}\text{P}$  war nicht wesentlich geringer. Wegen der höheren Sensitivität und der Möglichkeit, damit einige der schwächer exprimierten Gene zu quantifizieren, wurde mit  $^{32}\text{P}$ -Nukleotiden markiert.

### **4.4. Ergebnisdiskussion zu einzelnen Genen des Arrays**

#### **4.4.1. Die Expression der Haushalts-Gene bleibt in der Kokultur unverändert**

Die Expression der Haushalts-Gene wurde in allen Kokultur-Experimenten untersucht.

Ein Vergleich ergab für GAPDH und  $\beta$ -Aktin jeweils bis 18 %ige, jedoch nicht signifikante Expressionsabnahme und damit für beide Gene vergleichbare Ergebnisse (Abb. 25, Abb. 26). Die Normierung auf nur eines der Gene war damit gerechtfertigt. Aktin wurde aufgrund der geringeren Häufigkeit auf dem Array als fehleranfälliger betrachtet und daher nicht als Bezug genutzt. Im Verlauf der Kokultur-Experimente tauchten Inhomogenitäten zwischen Spots des

mehrfach aufgetragenen GAPDH-Gens auf. Dies konnte weder auf einen systematischen Fehler zurückgeführt werden, da das Problem im nächsten Experiment mit der Membran nicht erneut auftrat, noch konnte ein unsystematischer Fehler gefunden werden. Die Gesamt-Radioaktivität aller GAPDH-Spots zwischen den beiden Membranen unterschied sich nicht, daher wurde von einer variablen Verteilung der Radioaktivität auf die Spots ausgegangen. Auch die Auswertung über  $\beta$ -Aktin ergab keine neuen Aspekte.

Zentrale Fragestellung dieser Arbeit war der Einfluss des Fettgewebes bzw. der von Fett sezernierten, parakrin agierenden Faktoren auf die Transkription von Genen im Skelettmuskel. Es wurde untersucht, ob in der Kokultur bzw. durch das Adipokin TNF- $\alpha$  die muskuläre Insulinsensitivität beeinflusst bzw. eine Insulin-Resistenz erzeugt wird [Dietze *et al.*, Koistinen *et al.*].

Die doppelt logarithmische Auftragung der Expressions-Intensität der Gene von Kontrollen und Kokultur-Proben (Abb. 27) ließ den Schluss zu, dass die Adipozyten in der Kokultur keine generelle Expressionsänderung in den Muskelzellen bewirkten, wohingegen die mRNA-Transkription einzelner Gene beeinflusst wird.

#### **4.4.2. Die Kokultur senkt die mRNA-aber nicht die Protein-Expression der PDK-2**

Die PDK1-4 inhibieren den Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex. Bisher ist bekannt, dass die Gesamt-Enzym-Aktivität der PDK-Isoformen bei Stoffwechsel-Zuständen, die mit einem erhöhten Fettsäureumsatz und einem erniedrigten Kohlenhydratumsatz einhergehen, anstieg. Beispiele sind Diabetes, Fasten und einseitige, fettreiche Ernährung [Peters *et al.* (a), (b); Wu *et al.*]. Aufgrund der unterschiedlichen Gewebeverteilung der PDK-Isoformen und der Bevorzugung unterschiedlicher Substrate wurde bereits auf eine gewebespezifische Regulation der PDK geschlossen [Gudi *et al.*, Bowker-Kinley *et al.*]. Obwohl die PDK-2 ubiquitär exprimiert wird und im Muskel die höchsten Konzentrationen von allen Isoformen erreicht (Northern-Blot), besitzt sie z.B. im Gegensatz zur PDK-3 eine niedrige Enzym-Aktivität [Bowker-Kinley *et al.*].

Die PDK-2-mRNA-Expression war in der Kokultur bei 3 Spendern in 4 Experimenten signifikant auf  $68 \% \pm 14 \%$  herunterreguliert (Abb. 28). Im Western-Blot zeigte sich jedoch keine Änderung der Proteinexpression (Abb. 35).

Die PDK-2-Proteinkonzentration im Muskel wurde in der Literatur für verschiedene Experimente einheitlich als unverändert beschrieben.

Während einer 24-stündigen [Peters *et al.* 2001 (a)] oder 48-stündigen [Wu *et al.*] Fastenperiode bei Ratten sowie bei einer einseitigen fettreichen Diät über mehrere Tage bei Menschen [Peters *et al.* 2001 (b)] blieb die Protein-Expression der PDK-2 unverändert.

Auch in Kardiomyozyten STZ-diabetischer Ratten wurde eine unveränderte PDK-1- und -2-Proteinmenge gefunden, die durch eine Insulin-Therapie nicht beeinflusst wurde [Wu *et al.*].

Die PDK-4-Proteinmenge hingegen stieg während des Fastens und bei Diabetes an und war durch Fütterung bzw. unter einer Insulin-Behandlung reversibel. Auch während der fettreichen Diät stieg die PDK-4-Protein-Expression gegenüber den bilanziert ernährten Kontroll-Probanden nach einem Tag maximal an und blieb erhöht [Peters *et al.* (a)].

Bei *in vivo* Analysen der mRNA-Expression der PDK-2- gibt es in der Literatur Divergenzen. Bei überwiegend fetthaltiger Kost blieb die PDK-2-mRNA-Expression im humanen Skelettmuskel über 3 Tage unverändert [Peters *et al.* (a)].

Auch am Herzmuskel gefasteter oder diabetischer Ratten wurde für PDK-1 und -2 keine Genexpressionsänderung nachgewiesen. Nur PDK-4 zeigte eine stark erhöhte mRNA-Expression, die durch Fütterung bzw. Insulin-Behandlung reversibel war [Wu *et al.*].

Bei gefütterten versus 24 h gefasteten Ratten ergab sich je nach Muskelfaser-Typ eine maximal 2-fach erhöhte PDK-2-mRNA-Expression und eine unveränderte PDK-1-mRNA-Menge. Die PDK-4-mRNA war nach dem Fasten im Gegensatz zur erhöhten Proteinexpression nur leicht erhöht [Peters *et al.* (b)].

Im Skelettmuskel übergewichtiger, nichtdiabetischer Pima-Indianer korrelierten erhöhte PDK-2- und PDK-4-mRNA-Mengen mit dem Nüchtern-Insulin-Spiegel und dem Körperfett. Eine inverse Korrelation bestand zwischen PDK-2 und -4-mRNA-Spiegeln und der insulinvermittelten Glukoseaufnahme-Rate, Insulin bewirkte eine Abnahme der PDK-2- und -4-mRNA-Menge [Majer *et al.*]. Die Gruppe geht von einer unzureichenden Abnahme der PDK-2- und -4-mRNA bei Insulinresistenz aus. Die verminderte Glukoseaufnahme könnte zur erhöhten  $\beta$ -Oxidation und zu erhöhten Fettsäure-Konzentrationen im Blut führen [Majer *et al.*]. Umgekehrt könnten auch zu hohe Triglyzerid-Spiegel eine erhöhte  $\beta$ -Oxidation erzwingen, die dann eine veränderte PDK-Regulation bedingt und somit den PDK herunterreguliert.

Die hier gefundene Konstellation mit erniedrigter PDK-2-mRNA nach der Kokultur im Sinne einer Insulinresistenz zu erklären, erscheint nach Kenntnis der Literatur eher absurd. Die Proteinmenge bleibt jedoch unverändert. Als Interpretation könnte man z.B. eine veränderte

mRNA-Halbwertszeit annehmen. Dies müsste jedoch weiter untersucht werden, da zur PDK-2-mRNA-Stabilität noch keine Literaturangaben existieren.

Im Zusammenhang mit Diabetes sind jedoch Beispiele bekannt. So waren in Pankreasinseln durch Einwirkung freier Fettsäuren reduzierte Präproinsulin-mRNA-Spiegel nachweisbar, während peripher eine erhöhte Insulin-Konzentration bestand. Dies war bedingt durch eine verlängerte mRNA-Halbwertszeit des Präproinsulins [Ritz-Laser *et al.*]. Es ließ sich auch für Insulin selbst eine verkürzende Wirkung auf die Halbwertszeit der mRNA einiger P450-Leberenzyme nachweisen, deren Protein-Expression bei experimentell induziertem Diabetes verringert war [De Waziers *et al.*].

Hier wird die Hypothese vertreten, dass im Kokultur-Modell die Zellen während der Kulturzeit im Komplet-Medium nicht auf eine vermehrte Verstoffwechslung von Fettsäuren über die  $\beta$ -Oxidation angewiesen sind. Bei den Adipozyten normgewichtiger Spender dürfte auch ein normales Fettsäure-Sekretions-Muster bestehen. Damit ist zumindest eine Steigerung der PDK-2-Expression nicht zu erwarten. Obwohl durch die Kokultur ein Effekt auf die PDK-2-Genexpression gezeigt wurde, scheint es unwahrscheinlich, dass das Fettgewebe einen Einfluss auf die Insulin-Sensitivität über eine Expressionsänderung der PDK-2 ausübt, da die Protein-Menge nicht beeinflusst wurde. Im Hinblick auf die Literatur ist es auch möglich, dass unter Einfluss des Fettgewebes Expressions-Änderungen anderer PDK-Isoformen auftreten oder die Aktivität beeinflusst wird, was Gegenstand weiterer Untersuchungen wäre.

Bei der Behandlung der Skelettmuskelzellen mit 2,5 nM TNF- $\alpha$  (= 42,5 pg/ml) über 48 h zeigte sich im Western-Blot bei 2 Spendern für die TNF- $\alpha$ -Probe eine nicht signifikante Abnahme der PDK-2-Proteinexpression um  $\frac{1}{3}$  (Abb. 36).

Da die Erhebungen nur an zwei Spendern (M5, W10) durchgeführt wurden, müssten die Ergebnisse an einer größeren Population verifiziert werden, um verlässliche Aussagen bzgl. der Signifikanz zu treffen. Die zwischen Kokultur und TNF- $\alpha$ -Proben möglicherweise divergierenden Ergebnisse könnten durch unterschiedliche Wirkmechanismen bedingt sein. Dies könnte bedeuten, dass TNF- $\alpha$  in der Kokultur keinen großen Einfluss hat. Es gibt bereits Hinweise, dass das unter Kokultur-Bedingungen *in vitro* vom Fettgewebe sezernierte TNF- $\alpha$  nicht ausreicht, um eine Expressionsänderung hervorzurufen. Mit einem TNF- $\alpha$ -ELISA ließ sich im Medium der Kokulturen trotz einer Aufkonzentration um den Faktor 10 kein TNF- $\alpha$  nachweisen, wobei die Nachweisgrenze bei 0,2 pM (= 3,4 pg/ml) TNF- $\alpha$  lag [Dietze *et al.*].

Ein Vergleich mit in vivo Studien ist schwierig. In der Literatur werden die physiologischen Konzentrationen des TNF- $\alpha$  im Körper sehr unterschiedlich angegeben. Nilsson *et al.* fanden für 20 gesunde, ältere Männer Plasma-Konzentrationen von 3,3 pg/ml (= 0,194 pmol/l) und bei 20 schwer insulinresistenten Patienten Konzentrationen von 4,9 pg/ml (= 0,288 pmol/l). Die TNF- $\alpha$ -Spiegel korrelierten mit dem BMI und den Triglyzerid-Serum-Konzentrationen.

Katsuki *et al.* verwendeten den TNF- $\alpha$ -ELISA der gleichen Firma, geben aber eine andere Nachweis-Empfindlichkeit an. Sie beschreiben bei übergewichtigen NIDDM-Patienten TNF- $\alpha$ -Serum-Spiegel von 1,89 pmol/l (= 32,13 pg/ml), ein 10-fach höherer Wert. Bei schlanken NIDDM-Patienten geben sie Werte um 0,8 pmol/l (= 13,6 pg/ml) an. Diese waren gegenüber einer gesunden Kontroll-Gruppe kaum erhöht.

Pincelli *et al.* verwendeten einen ELISA eines anderen Herstellers. Sie geben TNF- $\alpha$ -Serum-Level bei gesunden Kontrollen von 55,3 pg/ml (= 3,25 pmol/l) und bei adipösen Patienten von 42,2 pg/ml (= 2,48 pmol/l) an.

#### **4.4.3. Die Expression der PDPK-1 ist abhängig vom Gewebe des Fettzellspenders**

Die PDPK-1 ist eine Proteinkinase u.a. der AKT, für deren Aktivierung sie durch Phosphorylierung an Thr<sup>308</sup> sorgt [Alessi *et al.* (c)]. Dies führt dann zur Autophosphorylierung der AKT an Ser<sup>473</sup> [Toker *et al.* 2000]. PDPK-1 wird von der PI3-Kinase aktiviert und vermittelt u.a. neben dem GLUT4 vermittelten Glukosetransport [Alessi *et al.*, Bandyopadhyay *et al.* 2000 u.a.] auch mitogene Signale von Insulin an die p70S6Kinase [Alessi *et al.* (d)].

Es zeigte sich im Array, dass das PDPK-1-Gen im Gegensatz zum Gen der AKT (die von PDPK-1 reguliert wird) ein stark exprimiertes Gen ist. Die Änderung der mRNA-Expression der PDPK-1 unterlag nach der Kokultur extremen Schwankungen. Hier traten für den gleichen Muskelzellspender (W10 (b)) in Kombination mit zwei verschiedenen Fettzell-Spendern die stärksten Expressionsänderungen auf. Dies waren eine Abnahme der Expression in der Kokultur um  $\frac{1}{4}$  und eine 2,5-fache Expressionszunahme (Abb. 32). Dies zeigt besonders den Einfluss der Spenderadipozyten. Die mit Zellen von W10 kokultivierten Brustfettzellen stammten von zwei Spendern mit einem BMI von 23 kg/m<sup>2</sup>. Eine aufgrund von Adipositas vorbestehende Insulinresistenz ist somit unwahrscheinlich, dennoch scheinen die Adipozyten eine unterschiedlich starke Induktion der PDPK-1-Expression zu bewirken.

Diese Ergebnisse lassen sich nicht im Sinne der generellen Induktion einer Insulinresistenz interpretieren. Von Dietze *et al.* [2002] wurde in der Kokultur eine Abnahme der AKT-Ser-Phosphorylierung nach einem Insulin-Stimulus bei unveränderter AKT-Expression gefunden.

Ursache dafür könnte z.B. eine Änderung der PDK-1 Aktivität oder deren verminderte Expression sein, was zu einer verminderten AKT-Aktivierung führen würde. Eine Zunahme der PDK-1-mRNA-Expression wie sie hier überwiegend gefunden wurde, müsste als kompensatorisch gesteigerte Expression interpretiert werden (eine bestehende Insulinresistenz in der Kokultur [Dietze *et al.*] vorausgesetzt). Dietze *et al.* beschrieben auch eine unter TNF- $\alpha$ -Einwirkung verminderte insulinstimulierte AKT-Ser-Phosphorylierung.

Ein Literaturvergleich ist schwierig. Zur Induktion einer Insulinresistenz oder zur Insulinresponsivität auf mRNA-Ebene liegen keine Studien vor. Auf der Proteinebene ist der regulatorische Einfluss der PDK-1 auf die AKT sowie die Wirkung auf das Aktin-Zytoskelett nach einem Insulinstimulus besser untersucht [u.a. Dong *et al.* 2000, Alessi *et al.* (e), Badhyopadhyay *et al.*].

Northern- und Western-Blot-Analysen zur Gewebsverteilung wurden bisher nur an der Maus gemacht [Dong *et al.* 1999]. Antisense-Experimente zur Ausschaltung der PDK-1 in Glioblastoma Zellen zeigten eine verminderte Zell-Proliferation und eine erhöhte Apoptoserate [Flynn *et al.*].

Interessanterweise führt bei Keratinozyten die über den PPAR- $\beta$  medierte, verstärkte Transkription der PDK-1 zu einer Aktivierung der AKT-1 auf Proteinebene [Di-Poi *et al.*]. Primäre Keratinozyten von PPAR- $\beta$  knock-out-Mäusen zeigen eine verminderte PDK-1 Gen- und Protein-Expression und zeigten auf TNF- $\alpha$  Stimulation vermehrt Apoptose [Di-Poi *et al.*].

Um weitere Aussagen machen zu können, müsste die PDK-1-Proteinexpression untersucht werden sowie eine Korrelation der Proteinmenge mit der PDK-1-Aktivität und der AKT-Phosphorylierung hergestellt werden.

#### **4.4.4. Die Expression von AKT-2 ist im Muskel etwa doppelt so stark wie AKT-1**

Die AKT kontrolliert in der Zelle eine Vielzahl von Funktionen. Es gibt Hinweise, dass eine reduzierte AKT-Aktivität mit einem verringerten Glukose-Transport einhergeht, bzw. dass nach AKT-Überexpression in Adipozyten die Glukosetransport-Aktivität und die GLUT4-Translokation zur Plasmamembran steigen [Kohn *et al.*].

Im Array zeigte sich, dass im Skelettmuskel die AKT-2 etwa doppelt so stark exprimiert ist wie die AKT-1, das Verhältnis beträgt 70:30 (

Abb. 31). Dies ist im Einklang mit von Jones an anderen humanen Zell-Linien gefundenen Ergebnissen [Jones *et al.*].

Ogleich in der Kokultur (Abb. 29, Abb. 30) über 48 h tendenziell eine Expressionsänderung zu verzeichnen war, veränderte sich weder die Expression von AKT-1 noch von AKT-2 signifikant. Dies ergänzt die Ergebnisse von Dietze *et al* [2002], die die AKT-Proteinexpression nach 48 h-Kokultur unverändert fanden. (Eine signifikante Reduktion zeigte sich unter Kokultur-Bedingungen nur im Phosphorylierungsstatus der AKT, diese war auch durch TNF- $\alpha$  zu induzieren).

In der Literatur ist für die AKT in primären Adipozyten gesunder und diabetischer Patienten weder auf mRNA- noch auf Protein-Ebene ein Expressionsunterschied beschrieben. Eine Insulin-Stimulation bewirkte nur Aktivitätsänderungen gemessen an der Phosphorylierung [Carvalho *et al.*]. Die *in vivo* Untersuchung der Insulin-Stimulierbarkeit der Isoformen zeigte sich im Muskel der Ratte eine höhere AKT-1 als AKT-2 Aktivierung, in Adipozyten war dies genau umgekehrt [Walker *et al.*]. In Ratten-L6-Myoblasten *in vitro* jedoch war hauptsächlich die AKT-3 aktiviert, AKT-1 und -2 waren kaum aktiviert [Walker *et al.*].

Kim, YB *et al.* [1999] fanden darüber hinaus *in vivo* am Muskel diabetischer Patienten sogar gleiche basale Aktivitäten der AKT-Isoformen und gleiche AKT-Antworten auf einen Insulin-Stimulus wie bei Gesunden.

Insgesamt ist es unwahrscheinlich, dass die Adipozyten eine Langzeit-Wirkung auf die Genexpression der AKT-Isoformen im humanen Skelettmuskel haben, die kontroversen *in vivo* und *in vitro* Ergebnisse an Rattenzellen unterstreichen die Bedeutung eines humanen Zellkultur-Systems, das möglichst nah an den *in vivo* Bedingungen ist und hier eine unveränderte Expression der AKT-1 und -2 durch die Behandlungen zeigte.

#### **4.4.5. Die Expression von Cyclin-D1 bleibt unbeeinflusst von der sekretorischen Aktivität der Adipozyten**

Die Cycline kontrollieren Wachstum und Differenzierung der Zellen im Zellzyklus. Eine erhöhte Cyclin-D1-Expression bei Diabetes ist u.a. bei der Atherosklerose bedeutsam, wo es zu einer Proliferation glatter Muskelzellen kommt. TZD reduzieren *in vivo* die Cyclin-D1-Protein-Menge und hemmen so die Proliferation glatter Muskelzellen [Hupfeld *et al.*]. Es besteht auch eine Assoziation zwischen Hypertrophie der Mesangien bei diabetische Nephropathie und erhöhter Cyclin-D1-Protein-Menge [Feliers *et al.*] Durch Zusatz von Serum oder Wachstumsfaktoren konnte in differenzierten C2C12-Myozyten ein Wiederanstieg der Cyclin-D1-Expression induziert werden, der den mRNA-Spiegeln in proliferierenden Myoblasten entsprach [Jahn *et al.*]. Ähnliche Ergebnisse fanden sich auch für andere Skelettmuskelzellen [Tiainen *et al.*].

Die basale Expression von Cyclin-D1 war im Vergleich mit den übrigen auf dem Array vorhandenen Genen bereits recht stark. Die Kokultur führte zu einem nichtsignifikanten Anstieg der Cyclin-D1-mRNA-Menge auf  $135 \% \pm 32,9 \%$ . Die maximal aufgetretene Expressionsänderung betrug  $+ 80\%$ . Wieder fand sich für W10 in Kombination mit 2 verschiedenen Fettzellspendern einmal eine Expressionsabnahme und einmal eine Expressionszunahme in der Kokultur (Abb. 33).

Zur Cyclin-D1-RNA- oder -Protein-Expression bei Insulinresistenz wurden, von den o.g. abgesehen, keine weiteren Studien gefunden, was die Interpretation der Ergebnisse erschwert. In der Literatur ist für C2C12-Myoblasten eine Abnahme der Cyclin-D1-mRNA-Menge nach Beginn der Differenzierung durch Serum-Entzug innerhalb von 42 h bis an die Detektionsgrenze beschrieben, wobei bis 12 h nach Differenzierungsbeginn zunächst eine Zunahme zu verzeichnen war [Jahn *et al.*].

Auch die in dieser Arbeit verwendeten humanen Zellen wurden durch Serum-Deprivation differenziert und erhielten vor Beginn der Experimente serumfreies Medium, das außer Insulin keine weiteren Wachstumsfaktoren enthielt. Dies ließe eine minimale Expression erwarten falls die Muskelzelllinien ähnlich reagieren. Möglicherweise reicht aber der permanente Insulin-Zusatz aus, um die Cyclin-D1-Expression zu gewährleisten. Zur Kinetik der Cyclin-Expression könnten weitere Studien am humanen Skelettmuskel erfolgen, die einen Beitrag zur Diskussion um die terminale Differenzierung der Myozyten leisten würden. Die Modulation der Cyclin-D1-Expression durch sekretorische Aktivität der Adipozyten erscheint mit den hier gefundenen Ergebnissen jedoch unwahrscheinlich.

#### **4.4.6. Die Expression von c-jun, c-myc und c-fos bleibt unverändert**

C-Jun, c-myc und c-fos sind Transkriptionsfaktoren, die gewebsabhängig auf mitogene Stimuli reagieren. C-fos und c-myc sind dabei stärker insulinreagibel [Wang PH *et al.*, Thompson *et al.*, Olson *et al.*, Kim SJ *et al.*]. In vitro Studien mit hohen Glukosekonzentrationen zeigten einen veränderten Phosphorylierungszustand von c-jun [Franklin *et al.*]. Weiter ist bekannt, dass c-jun u.a. in Kardiomyozyten durch TNF- $\alpha$  aktiviert wird [Clerk *et al.*, Chen *et al.*]. Die Aktivierung von c-jun führt zur Induktion seiner eigenen mRNA-Transkription [Angel *et al.*].

Hier zeigte c-jun im Vergleich mit anderen Genen des Arrays eine starke Expression während c-fos und c-myc von den Myozyten kaum messbar exprimiert wurden. In der Kokultur sank die c-jun-Expression auf 47 % der Kontrolle ab, das Ergebnis erreichte jedoch aufgrund der geringen Stichprobengröße keine Signifikanz (Abb. 34). Es müssten weitere Studien an einer

größeren Population durchgeführt werden, um eine Abnahme der c-jun-Expression nachzuweisen. In der Literatur werden analoge Ergebnisse beschrieben.

Kardiomyozyten gesunder und STZ-diabetischer Ratten weisen ähnliche basale c-jun-mRNA-Spiegel im Northern Blot auf. 30 Minuten nach einem Insulin-Bolus kam es zu einem statistisch nicht relevanten Anstieg der mRNA-Spiegel [Wang PH *et al.*].

Im Skelettmuskel insulinresistenter Probanden fanden sich niedrigere basale c-jun-Spiegel als bei Gesunden. Die Expression war kurzfristig nicht Insulin-reagibel [Thompson *et al.*].

Unter anderen experimentellen Bedingungen fand sich nach einer Insulin-Stimulation ein geringer, kurzfristiger und innerhalb von Stunden reversibler c-jun-mRNA-Anstieg im Herzmuskel sowie in weißem Fettgewebe gesunder und diabetischer Ratten [Olson *et al.*].

Die gegenüber c-myc und c-fos starke mRNA-Expression von c-jun könnte durch die experimentellen Faktoren mitbedingt sein. Im Northern-Blot mit Kardiomyozyten zeigte sich für c-fos zwar ebenfalls eine niedrigere basale mRNA-Menge als für c-jun, jedoch schien der Unterschied nicht so ausgeprägt zu sein, wie hier gefunden [Wang PH *et al.*].

An PC12-Zellen wurde gezeigt, dass Serum-Entzug (ein Entzug des Wachstumsreizes) zur Stimulation von JNK führt [Levrresse *et al.*], die wie beschrieben die Transkriptions-Aktivität von c-jun steigern. Da in dieser Arbeit 24 h vor Beginn der Experimente serumfreies Medium eingesetzt wurde, u.a. um eine unspezifische Bindung z.B. von TNF- $\alpha$  an Plasma-Proteine zu vermeiden, könnte dies zu einer verstärkten Expression von c-jun geführt haben.

Bei TNF- $\alpha$ -stimulierten Ratten-Kardiomyozyten erhöhte sich die JNK-Aktivität, die Phosphorylierung von c-jun war gesteigert. Die Protein-Menge war nur wenig erhöht, die mRNA wurde nicht untersucht [Clerk *et al.*].

Da in dieser Arbeit keine Änderung der c-jun, c-fos oder c-myc-mRNA-Expression gefunden wurde, lässt dies spekulieren, dass Adipozyten ihre mit der Insulinresistenz einhergehenden Veränderungen in Wachstum und Differenzierung nicht über die c-jun-Genexpression ausüben.

## 5. Zusammenfassung

Diabetesrisiko und Maß der Insulinresistenz korrelieren u.a. mit dem BMI. Fettgewebe sezerniert Adipokine, deren Muster bei Diabetes verändert ist, z.B. Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- $\alpha$ ). Der Einfluss des Fettgewebes auf die Insulinsensitivität des Muskels, der „Crosstalk“, wurde hier an einem in unserer Arbeitsgruppe etablierten humanen „Kokultur“-Modell untersucht. Primäre Myoblasten von 3 Spendern bzw. aus weiblichem Brustfett isolierte Präadipozyten von 4 Spendern (BMI 23 - 26 kg/m<sup>2</sup>) wurden in vitro ausdifferenziert und 48 Stunden kokultiviert. So induzierte Änderungen der mRNA-Expression von 26 Genen u.a. der muskulären Insulin-Signalkaskade wurden mit einem radioaktiven cDNA-Array analysiert. In einer semiquantitativen Multiplex-RT-PCR wurde der Einfluss von TNF- $\alpha$  und dem Thiazolidindion Troglitazon auf die Expression von IRS-1 (Insulin-Rezeptor-Substrat-1) und des TNF-Rezeptors getestet. Der Skelettmuskel exprimiert überwiegend mRNA der TNF-Rezeptor-Isoform 1, deren Menge sich durch die TNF- $\alpha$ -Behandlung nicht ändert. Die IRS-1-Expression war nach TNF- $\alpha$ - oder Troglitazon-Applikation unverändert. Eine Zeitkinetik über 48 Stunden zeigte keinen Troglitazon-Einfluss. Die im Modell von Dietze *et al.* [2002] durch TNF- $\alpha$  bzw. Troglitazon induzierte Änderung der IRS-1-Proteinexpression beruht demnach nicht auf einer Genexpressionsänderung. Für Pyruvate-Dehydrogenase-Kinase-2 (PDK-2) wurde eine mRNA-Abnahme ohne ein Korrelat auf der Proteinebene gefunden. Eine TNF- $\alpha$ -Behandlung, dessen apoptotische Wirkung auf die Zellen durch Fluoreszenzfärbungen ausgeschlossen wurde, ergab bei 2 Spendern eine geringe, auf Transkriptionsebene nicht reproduzierbare Abnahme der Proteinmenge. Vielleicht ist die Wirkung der Adipozyten auf die PDK-2 der Myotuben nicht TNF- $\alpha$ -vermittelt. An der PDK-1 ließ sich der individuelle Einfluss zweier Fettzellspender auf die Genexpression eines Muskelzellspenders zeigen. Die AKT-2-mRNA wurde doppelt so stark exprimiert, wie AKT-1-mRNA, durch die Kokultur bzw. TNF- $\alpha$  wurden keine Änderungen erzeugt. Dies ergänzt die auf Proteinebene angestellten Untersuchungen von Dietze *et al.* Die Induktion der Vergleich starken Cyclin-D1-Transkription durch Insulin-Zusatz im Medium kann unter den gewählten Bedingungen nicht ausgeschlossen werden, in der Kokultur ergaben sich aber keine Veränderungen. Auch für c-jun, c-myc und c-fos traten keine Genexpressionsänderungen auf. Insgesamt lassen die hier an Skelettmuskelzellen angestellten Untersuchungen zur Induktion der Insulinresistenz im Muskel durch Adipozyten und das Zytokin TNF- $\alpha$  schließen, dass die Transkription der untersuchten Gene nicht nennenswert beeinflusst wird so dass sich die Auswirkungen eher auf die Proteinebene beschränken dürften.

## 6. Anhang

### 6.1. Literaturverzeichnis

Abe H, Yamada N, Kamata K, Kuwaki T, Shimada M, Osuga J, Shioniri F, Yahagi N, Kadowaki T, Tamemoto H, Ishibashi S, Yazaki Y, Makuushi M. Hypertension, hypertriglyceridemia and impaired endothelium-dependent vascular relaxation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *J. Clin. Invest.* 1998; **101** (8): 1784-1788.

Accili D, Drago J, Lee EJ, Johnson MD, Cool MH, Salvatore P, Asico LD, Jose PA, Taylor SI, Westphal H. Early neonatal death in mice homozygous for a null allele of the insulin receptor gene. *Nat. Genet.* 1996; **12** (1): 106-109.

Alessi DR (a), Deak M, Casamayor A, Caudwell FB, Morrice N, Norman DG, Gaffney P, Reese CB, MacDougall CN, Harbison D, Ashworth A, Bownes M. 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1): structural and functional homology with the *Drosophila* DSTPK61 kinase. *Curr. Biol.* 1998; **7** (10): 776-789.

Alessi DR (b), Downes CP. The role of PI 3-kinase in insulin action. *Biochim. Biophys. Acta* 1998; **1436** (1-2): 151-64.

Alessi DR (c), James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PRJ, Reese CB, Cohen P. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B-alpha. *Curr. Biol.* 1997; **7** (4): 261-269.

Alessi DR (d), Kozlowski MT, Weng QP, Morrice N, Avruch J. 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) phosphorylates and activates the p70S6 kinase in vivo and vitro. *Curr. Biol.* 1998; **8** (2): 69-81.

Alessi DR (e). Colworth Medal lecture. Discovery of PDK1, one of the missing links in insulin signal transduction. *Biochem. Soc. Trans.* 2001; **29**: 1-14.

Alessi DR (f) Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, Hemmings BA. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.* 1996; **15**: 6541–6551.

Anai M, Ono H, Funaki M, Fukushima Y, Inukai K, Ogikara T, Sakoda H, Onishi Y, Yazaki Y. Different subcellular distribution and regulation of expression of insulin receptor substrate-(IRS)-3 from those of IRS-1 and IRS-2. *J. Biol. Chem.* 1998; **273**: 29686-29692.

Andjelkovic M, Alessi DR, Meier R, Fernandez A, Lamb NJC, Frech M, Cron P, Cohen P, Lucocq JM, Hemmings BA. Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J. Biol. Chem.* 1997; **272** (50): 31515-31524.

Angel P, Hattori K, Smeal T, Karin M. The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1. *Cell* 1988; **55** (5): 875-885.

Antonetti DA, Algenstaedt P, Kahn CR. Insulin receptor substrate-1 binds two novel splice variants of the regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in muscle and brain. *Mol. Cell. Biol.* 1996 ; **16** (5): 2195-2203.

Araki E, Sun XJ, Haag BL 3<sup>rd</sup>, Chuang LM, Yang-Feng TL, White MF, Kahn CR. Human skeletal muscle IRS-1: Characterization of the cDNA, gene and chromosomal localization. *Diabetes* 1993; **42** (7): 1041-1049.

Araki E, Lipes MA, Patti ME, Bruning JC, Haag BL 3<sup>rd</sup>, Johnson RS, Kahn CR. Alternative pathways of insulin signaling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature* 1994; **372** (6502): 186-190.

Arner P. Differences in lipolysis between human subcutaneous and omental adipose tissues. *Ann. Med.* 1995; **27** (4): 435-8.

Avignon A, Yamada K, Zhou X, Spencer B, Cardona O, Saba-Siddique S, Galloway L, Standaert MI, Farese RV. Chronic activation of protein kinase C in soleus muscle and other tissues of insulin-resistant type II diabetic Goto-Kakizaki (GK), obese/aged and obese/Zucker rats. A mechanism for inhibiting glycogen synthesis. *Diabetes* 1996; **45** (10): 1396-1404.

Bandyopadhyay G, Standaert ML, Galloway L, Moscat J, Farese RV. Evidence for involvement of protein kinase C (PKC)- $\alpha$  and non-involvement of diacylglycerol sensitive PKC's in insulin-stimulated glucose transport in L6 myotubes. *Endocrinology* 1997; **138** (11): 4721–4731.

Bandyopadhyay G, Sajan MP, Kanoh Y, Standaert ML, Burke TR, Quon MJ, Reed BC, Dikic I, Noel LE, Newgard CB, Farese R. Glucose activates mitogen-activated protein kinase (extracellular signal-regulated kinase) through proline-rich tyrosine kinase-2 and the Glut1 glucose transporter. *J. Biol. Chem.* 2000; **275** (52): 40817–40826.

Bandyopadhyay G, Standaert ML, Sajan MP, Karnitz LM, Kong L, Quon MJ, Farese RV. Dependence of insulin-stimulated glucose transporter 4 translocation on 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 and its target threonine-410 in the activation loop of protein kinase C- $\alpha$ . *Mol. Endocrinol.* 1999; **19** (10): 1766-1772.

Barroso I, Gurnell M, Crowley VE, Agostini M, Schwabe JW, Soos MA *et al.* Dominant negative mutations in human PPAR $\gamma$  are associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. *Nature* 1999; **402** (23): 880-883.

Beamer BA, Yen CJ, Andersen RM, Muller D, Elaki D, Cheskin LJ, Andres R, Roth J, Shuldiner AR, Akanuma Y, Kadowaki T. Association of the Pro12Ala variant in the peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  gene with obesity in two Caucasian-populations *Diabetes* 1998; **47** (11): 1806-1808.

Berger, Michael: Diabetes mellitus . 1995: Urban & Schwarzenberg München

Bohmann D, Bos TJ, Admon A, Nishimura T, Vogt PK, Tjian R. Human proto-oncogene c-Jun encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1. *Science* 1987; **238** (4832): 1386-1392.

Bolinder J, Kager L, Ostman J, Arner P. Differences at the receptor and postreceptor levels between human omental and subcutaneous adipose tissue in the action of insulin on lipolysis. *Diabetes* 1983; **32** (2):117-23.

Borkman M, Storlien LH, Pan DA, Jenkins AB, Chisholm DJ, Campbell LV. The relation between insulin sensitivity and the fatty acid composition of the skeletal-muscle phospholipids. *N. Engl. J. Med.* 1993; **328** (4): 238-244.

Bowker-Kinley MM, Davis WI, Wu P, Harris RA, Popov M. Evidence for existence of tissue-specific regulation of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex. *Biochem. J.* 1998; **329** (1): 191-196.

Bujalska IJ, Kumar S, Stewart PM. Does central obesity reflect "Cushing's disease of the omentum"? *The Lancet* 1997; **349** (9060): 1210-1213.

Burn TC, Connors TD, van Raay TJ, Dackowski WR, Millholland JM, Klinger KW, Landes GM. Generation of a transcriptional map for a 700 kb region surrounding the polycystid kidney disease type 1 (PKD1) and tuberous sclerosis type 2 (TSC2) disease genes on human chromosome 16p13.3. *Genome Res.* 1996; **6** (6): 525-537.

Cai D, Dhe-Paganon S, Melendez PA, Lee J, Shoelson SE. Two new substrates in insulin signaling, IRS5/DOK4 and IRS6/DOK5. *J. Biol. Chem.* 2003; **278** (28): 25323-25330.

Calera MR, Martinez C, Liu H, Jack AK, Birnbaum MJ, Pilch PF. Insulin increases the association of Akt-2 with Glut-4 containing vesicles. *J. Biol. Chem.* 1998; **273** (13): 7201-7204.

Carvalho E, Eliasson B, Weslau C, Smith U. Impaired phosphorylation and insulin-stimulated translocation to the plasma membrane of protein kinase B/Akt in adipocytes from type II diabetic subjects. *Diabetologia* 2000; **43** (9): 1107-15.

Chang HW, Aoki M, Fruman D, Auger KR, Bellacosa A, Tsichlis PN, Cantley LC, Roberts TM, Vogt PK. Transformation of chicken cells by the gene encoding the catalytic subunit of PI 3-kinase. *Science* 1997; **276** (5320): 1848-1850.

Cheatham B, Vlahos CJ, Cheatham L, Wang L, Blenis J, Kahn CR. Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70S6kinase, DNA synthesis and glucose transporter translocation. *Mol. Cell Biol.* 1994; **14** (7): 4902-4911.

Chen G, Goeddel DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 2002; **296** (5573): 1634-1635.

Chiu R, Boyle WJ, Meek J, Smeal T, Hunter T, Karin M. The c-Fos protein interacts with c-Jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. *Cell* 1988; **54** (4): 541-552.

Ciaraldi TP, Carter L, Mudaliar S, Kern PA, Henry RR. Effects of tumor necrosis factor-alpha on glucose metabolism in cultured human muscle cells from nondiabetic and type 2 diabetic subjects. *Endocrinology* 1998; **139** (12): 4793-800.

Cichy SB, Uddin S, Danilkovich A, Guo S, Kippel A, Unterman TG. Protein kinase B/Akt mediates effects of insulin on hepatic insulin-like growth factor-binding protein-1 gene expression through a conserved insulin response sequence *J. Biol. Chem.* 1998; **273** (11): 6482-6487.

Clerk A, Harrison JG, Long CS, Sugden PH. Pro-inflammatory cytokines stimulate mitogen-activated protein kinase subfamilies, increase phosphorylation of c-Jun and ATF2 and upregulate c-Jun protein in neonatal rat ventricular myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1999; **31** (12): 2087-2099.

Coffer PJ, Jin J, Woodgett JR. Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Biochem. J.* 1998; **335** (1): 1-13.

Cohen P. The Croonian lecture 1998. Identification of a protein kinase cascade of major importance in insulin signal transduction. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 1999; **354** (1382): 485-495.

Conejo R, Lorenzo M. Insulin signaling leading to proliferation, survival, and membrane ruffling in C2C12 myoblasts. *J. Cell Physiol.* 2001; **187** (1): 96-108.

Colditz GA, Willet WC, Stampfer MJ, Manson GE, Hennekens CH, Arky RA, Speizer FE. Weight as a risk factor for clinical diabetes in women. *Am. J. Epidemiol.* 1990; **132** (3): 501-513.

Considine RV, Nyce Mr, Allen LE, Morales LM, Triester LS, Serrano J, Collberg J, Lanza Jacoby S, Caro JF. Protein kinase C is increased in the liver of humans and rats with non-insulin-dependant diabetes mellitus: an alteration not due to hyperglycemia. *J. Clin. Invest.* 1995; **95** (6): 2938-2944.

Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 1997; **91** (2): 231-241.

Davis RJ. Transcriptional regulation by MAP-kinases. *Mol. Reprod. Dev.* 1995; **42** (4): 459-467.

Deeb SS, Fajas L, Nemoto M, Pihlajamaki J, Mykkanen L, Kuusisto J, Laakso M, Fujimoto W, Auwerx J. A Pro12Ala substitution in PPARgamma2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nature Genet.* 1998; **20** (3): 284-287.

De Fronzo RA. Lilly lecture 1987: The triumvirate: Beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. *Diabetes* 1988; **37** (6): 667-687.

Despres JP. Abdominal obesity as important component of insulin-resistance syndrome. *Nutrition* 1993; **9** (5): 452-459.

Di-Poi ND, Tan NS, Michalik L, Wahli W, Desvergne B. Antiapoptotic role of PPAR beta in keratinocytes via transcriptional control of the Akt1 signaling pathway. *Molecular Cell* 2002; **10** (4): 721-733.

Dietze D, Koenen M, Roehrig K, Horikoshi H, Hauner H, Eckel J. Induction of insulin resistance in human skeletal muscle cells by coculture with human adipocytes. *Diabetes* 2002; **51** (8): 2369-2376.

Dong LQ, Landa LR, Wick JM, Zhu L, Mukai H, Ono Y, Liu F. Phosphorylation of protein kinase N by phosphoinositide-dependent protein kinase-1 mediates insulin signals to the actin cytoskeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000; **97** (10): 5089-5094.

Dong LQ, Zhang RB, Langlais P, He H, Clark M, Zhu L, Liu F. Primary structure, tissue distribution, and expression of mouse phosphoinositide-dependent protein kinase-1, a protein kinase that phosphorylates and activates protein kinase C-zeta. *J. Biol. Chem.* 1999; **274** (12): 8117-8122.

Ducluzeau PH, Fletcher LM, Vidal H, Laville M, Tavare JM. Molecular mechanisms of insulin-stimulated glucose uptake in adipocytes. *Diabetes Metab.* 2002; **28** (2): 85-92.

Dufourny B, van Teeffelen HA, Hamelers ICH, Sussenbach JS, Steenbergh PH. Stabilization of cyclin D1 mRNA via the phosphatidylinositol-3-kinase pathway in MCF-7 human breast cancer cells. *J. Endocrinol.* 2000; **166** (2): 329-338.

Ebina Y, Ellis L, Jarnagin K, Edery M, Graf L, Clauser E, Ou JH, Masiarz F, Kahn YW, Goldfine ID, Roth RA, Rutter WJ. The human insulin receptor cDNA: The structural basis for hormone-activated transmembrane signaling. *Cell* 1985; **40** (4): 747-758.

Febbraio M, Abumrad NA, Hajjar DP, Sharma K, Cheng W, Pearce SF, Silverstein RL. A null mutation in murine CD 36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism. *J. Biol. Chem.* 1999; **274** (27): 19055-19062.

Feliers D, Frank MA, Riley DJ. Activation of cyclin D1-Cdk4 and Cdk4-directed phosphorylation of RB protein in diabetic mesangial hypertrophy. *Diabetes* 2002; **51** (11): 3290-3299.

Foretz M, Guichard C, Ferre P, Foufelle F. Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999; **96** (22): 12737-42.

Fiordaliso F, Leri A, Cesselli D, Limana F, Safai B, Nadal-Ginard B, Anversa P, Kajstura J.

Hyperglycemia activates p53 and p53-regulated genes leading to myocyte cell death. *Diabetes* 2001; **50** (10): 2363-2375.

Franke T. A difficult Akt to follow. *Neural notes* 1999; **5** (2) : 3-7.

Franklin CC, Sanchez V, Wagner F, Woodgett JR, Kraft AS. Phorbol ester-induced amino-terminal phosphorylation of human JUN but not JUN-B regulates transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; **89** (15): 7247-7251.

Friedman JM. Leptin, leptin receptors and the control of body weight. *Europ. J. Med. Res.* 1997; **2**: 7-13.

Fruman DA, Cantley LC, Carpenter CL. Structural organization and alternative splicing of the murine phosphoinositide 3-kinase p85 alpha gene. *Genomics* 1996; **37** (1): 113-121.

Fruman D, Mauvais-Jarvis F, Pollard DA, Yballe CM, Brazil D, Bronson RT, Kahn CR, Cantley LC. Hyperglycemia, liver necrosis and perinatal death in mice lacking all isoforms of phosphoinositide 3-kinase p85 alpha. *Nature Genet.* 2000; **26** (3): 379-382.

Gavrilova O, Marcus-Samuels B, Graham D, Kim JK, Shulman GI, Castle AL, Vinson C, Eckhaus M, Reitman ML. Surgical implantaion of adipose tissue reverses diabetes in lipoatrophic mice. *J. Clin. Invest.* 2000; **105** (3): 271-278.

Giovannone B, Scaldaferrri ML, Federici M Porzio O, Lauro D, Fusco A, Sbraccia P, Borboni P, Lauro R, Sesti G. Insulin receptor substrate (IRS) transduction system: distinct and overlapping signaling potential. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 2000 ;**16** (6): 434-441.

Goalstone ML, Natarajan R, Standley PR, Walsh MF, Leitner JW, Carel K, Scotts S, Nadler J, Sowers JR, Draznin B. Insulin potentiates platelet-derived growth factor action in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology* 1998; **139** (10): 4067-4072.

Goodpaster BH, Thaete FL, Kelley DE. Thigh adipose tissue distribution is associated with insulin resistance in obesity and in type 2 diabetes mellitus. *Am. J. Clin. Nutr.* 2000; **71** (4): 885-892.

Greene MW, Sakaue H, Wang L, Alessi DR, Roth RA. Modulation of Insulin-stimulated Degradation of Human Insulin Receptor Substrate-1 by Serine 312 Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 2003; **278** (10): 8199–8211.

Gudi R, Bowker-Kinley M, Kedishvilli NY, Zhao Y, Popov K. Diversity of the pyruvate dehydrogenase kinase gene family in humans. *J. Biol. Chem.* 1995; **270** (48): 28989-28994.

Güssow Detlef, Rein Rita, Ginjaar I, Hochstenbach F , Seemann G, Kottman A, Ploegh HL. The human  $\beta$ 2- microglobuline gene: Primary structure and definition of the transcriptional unit. *J. Immunol.* 1987, **139** (9): 3132-38.

Halaas JL, Gajiwalu KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 1995; **269** (5223): 543-546.

Halle M, Berg A, Northoff H, Keul J. Importance of TNF-alpha and leptin in obesity and insulin resistance: a hypothesis on the impact of physical exercise. *Exerc. Immunol. Rev.* 1998; **4**: 77-94.

Halse R, Pearson SL, MacCormack JG, Yeaman SJ, Taylor R. Effects of tumor necrosis factor- $\alpha$  on insulin action in cultured human muscle cells. *Diabetes* 2001; **50** (5): 1102-1109.

Hamann A, Benecke H, Le Marchand-Brustel Y, Susulic VS, Lowell BB, Flier JS. Characterization of insulin resistance and NIDDM in transgenic mice with reduced brown fat. *Diabetes* 1995; **44** (11): 1266- 1273.

Hamann A, Flier JS, Lowell BB. Decreased brown fat markedly enhances susceptibility to diet-induced obesity, diabetes and hyperlipidemia. *Endocrinology* 1996; **137** (1): 21-29.

Hansen L, Fjordvang H, Rasmussen SK, Vestergaard H, Echwald SM, Hansen T, Alessi D, Shenolikar S, Saltiel AR, Barbetti F, Pedersen O. Mutational analysis of the coding regions of the genes encoding protein kinase B- $\alpha$  and - $\beta$ , phosphoinositide-dependent-protein kinase-1,

phosphatase targeting to glycogen, protein phosphatase inhibitor-1 and glycogenin. *Diabetes* 1999; **48** (2): 403-407.

Hattori K, Angel P, Le Beau MM, Karin M. Structure and chromosomal localization of the functional intronless human JUN protooncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988; **85** (23): 9148-9152.

Hauer H, Petruschke T, Russ M, Rohrig K, Eckel J. Effects of tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) on glucose transport and lipid metabolism of newly differentiated human fat cells in cell culture. *Diabetologia* 1995; **38** (7): 764-771.

Himsworth HP *et al.* Diabetes mellitus: its differentiation into insulin sensitive and insulin insensitive types. *The Lancet* 1936; **1**: 117-121.

Ho FM, Liu SH, Liao CS, Huang PJ, Lin-Shiau SY. High glucose-induced apoptosis in human endothelial cells is mediated by sequential activation of c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase and caspase-3. *Circulation* 2000; **101** (22): 2618-2624.

Hotamisligil GS, Arner P, Atkinson RL, Spiegelman BM. Differential regulation of the p80 tumor necrosis factor receptor in human obesity and insulin resistance. *Diabetes* 1997; **46** (3): 451-455.

Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 1995; **95** (5): 2409-2415.

Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- $\alpha$ - and obesity-induced insulin resistance. *Science* 1996; **271** (5249): 665-668.

Hotamisligil GS, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes* 1994; **43** (11): 1271-1278.

Hribal ML, Federici M, Porzio O, Lauro D, Borboni P, Accili D, Lauro R, Sesti G. The Gly → Arg<sup>972</sup> amino acid polymorphism in IRS-1 affects glucose metabolism in skeletal muscle cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2000; **85(5)**: 2004-2013.

Huang B, Wu P, Bowker-Kinley MM, Harris RA. Regulation of pyruvate dehydrogenase kinase expression by peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  ligands, glucocorticoids, and Insulin. *Diabetes* 2002; **51 (2)**: 276-283.

Hupfeld CJ, Weiss RH. TZDs inhibit vascular smooth muscle cell growth independently of the cyclin kinase inhibitors p21 and p27. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2001; **281 (2)**: E207-E216.

Hutson NJ, Kerbey AL, Randle PJ, Sugden PH. Conversion of inactive (phosphorylated) pyruvate dehydrogenase complex into active complex by the phosphate reaction in heart mitochondria is inhibited by alloxan-diabetets or starvation in the rat. *Biochem. J.* 1978; **173 (2)**: 669-680.

Ibrahimi A, Bonen A, Blinn WD, Ahjri T, Li X, Zhong K, Cameron R, Abumrad NA. Muscle-specific overexpression of FAT/CD36 enhances fatty acid oxidation by contracting muscle, reduces plasma triglycerides and fatty acids and increases plasma glucose and insulin. *J. Biol. Chem.* 1999; **274 (38)**: 26761-26766.

Inaba T, Matsushime H, Valentine M, Roussel MF, Sherr CJ, Look AT. Genomic organization, chromosomal localization, and independent expression of human cyclin D genes. *Genomics* 1992; **13 (3)**: 565-574.

Inoue G, Cheatham B, Emkey R, Kahn CR. Dynamics of insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes. Differential compartmentalization and trafficking of insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS- 2. *J. Biol. Chem.* 1998; **273 (19)**: 11548-11555.

Ishizuka T, Miura A, Kajita K, Yamada K, Wada H, Itaya S, Kanoh Y, Ishizawa M, Kimura M, Yasuda K. Alterations in insulin-induced postreceptor signaling in adipocytes of the Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rat strain. *J. Endocrinol.* 1998; **156 (1)**: 1-13.

Jahn L, Sadoshima J, Izumo S. Cyclins and cyclin-dependent kinases are differentially regulated during terminal differentiation of C2C12 muscle cells. *Exp. Cell. Res.* 1994; **212** (2): 297-307.

Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK and p38 protein kinases. *Science* 2002; **298** (5600): 1911-1912.

Johnson JA, Fried SK, Pi-Sunyer FX, Albu JB. Impaired insulin action in subcutaneous adipocytes from women with visceral obesity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2001; **280** (1): E40-49.

Jones PF, Jakubowicz T, Hemmings BA. Molecular cloning of a second form of rac protein kinase. *Cell Regul.* 1991; **2** (12): 1001-9.

Joshi RL, Lamothe B, Cordonnier N, Mesbah K, Monthieux E, Jami J, Buccini D. Targeted disruption of the insulin receptor gene in the mouse results in neonatal lethality. *EMBO J.* 1996; **15** (7): 1542-1547.

JNK pathway: connections map (Nov 2002) bei Science's STKE online unter <http://stke.sciencemag.org/cgi/cm/stkecm> ; CMP\_10958 (Registrierung erforderlich)

Kadowaki T. Insights into insulin resistance and type 2 diabetes from knockout mouse models. *J. Clin. Invest.* 2000; **106** (4): 459-465.

Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 2000; **106** (4): 473-481.

Kahn CR, White MF. The insulin receptor and the molecular mechanisms of insulin action. *J. Clin. Invest.* 1988; **82** (4): 1151-1156.

Kamel A, Norgren S, Ehren H, Hildingsson U, Marcus C. Antilipolytic effect of insulin and insulin receptor messenger RNA expression in adipocytes of infants, children, and adults. *Pediatr. Res.* 1997; **41**(4,1): 563-567.

Katsuki A, Sumida Y, Murashima S, Murata K, Takarada Y, Ito K, Fuji M, Tsuchikashi K, Goto H, Nakatani K, Yano Y. Serum levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  are increased in obese patients with non insulin dependant diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 1998; **83** (3): 859-862.

Kerbey AL, Randle PJ. Pyruvate dehydrogenase kinase/activator in rat heart mitochondria, assay, effect of starvation and effect of protein synthesis-inhibitors of starvation. *Biochem. J.* 1982; **206** (1): 103-111.

Kerouz NJ, Horsch D, Pons S, Kahn CR. Differential regulation of insulin receptor substrates 1 and -2 (IRS-1 and IRS-2) and phosphatidylinositol 3-kinase isoforms in liver and muscle of the obese diabetic ob/ob mouse. *J. Clin. Invest.* 1997; **100** (12): 3164-3172.

Kessler A, Uphuis I, Ouwens DM, Till M, Eckel J. Diversification of cardiac insulin signalling involves the p85 alpha/beta subunits of phosphatidylinositol 3-kinase. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2001; **280** (1): E65-E74.

Kim JB, Sarraf P, Wright M, Yao KM, Mueller E, Solanes G, Lowell BB, Spiegelman B. Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1. *J. Clin. Invest.* 1998; **101** (1): 1-9.

Kim SJ, Kahn RC. Insulin stimulates phosphorylation of c-Jun, c-Fos and Fos-regulated proteins in cultured adipocytes. *J. Biol. Chem.* 1994; **269** (16): 11887-11892.

Kim YB, Nikoulina SE, Ciaraldi TP, Henry RR, Kahn BB. Normal insulin-dependent activation of Akt/protein kinase B, with diminished activation of phosphoinositide 3-kinase, in muscle in type 2 diabetes. *J. Clin. Invest.* 1999; **104** (6): 733-41.

Kitamura T, Ogawa W, Sakaue H, Hino Y, Kuroda S, Takata M, Matsumoto MM, Konishi J, Kikkawa U, Kasuga M. Requirement for activation of the serine-threonine kinase AKT (Proteinkinase B) in insulin stimulation of protein synthesis but not of the glucose transport. *Mol. Cell. Biol.* 1998; **18** (7): 6971-6982.

Klemm DJ, Leitner JW, Watson P, Nesterova A, Reusch JE, Goalstone ML, Draznin B. Insulin-induced adipocyte differentiation. Activation of CREB rescues adipogenesis from the arrest caused by inhibition of prenylation. *J. Biol. Chem.* 2001; **276** (30): 28430-5.

Kohn AD, Summers SA, Birnbaum MJ, Roth R. Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr Kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J. Biol. Chem.* 1996; **271** (49): 31372-31378.

Koistinen HA, Bastard JP, Dusserre E, Ebeling P, Zegari N, Andreelli F, Jardel C, Donner M, Meyer L, Moulin P, Hainque B, Riu Jp, Laville M, Koivisto VA, Vidal H. Subcutaneous adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha is not associated with whole body insulin resistance in obese nondiabetic or in type-2 diabetic subjects. *Eur. J. Clin. Invest.* 2000; **30** (4): 302-310.

Krook A, O'Rahilly S. Mutant insulin receptors in syndromes of insulin resistance. *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.* 1996; **10** (1): 97-122.

Law RE, Meehan WP, Xi XP, Graf K, Wuthrich DA, Coates W, Faxon D, Hsueh WA. Troglitazone inhibits vascular smooth muscle cell growth and intima hyperplasia. *J. Clin. Invest.* 1996; **98** (8): 1897-1905.

Lechleitner M, Koch T, Herold M, Dzien A, Hoppichler F. Tumor necrosis factor-alpha plasma level in patients with type 1 diabetes mellitus and its association with glycemic control and cardiovascular risk factors. *J. Int. Med.* 2000; **248** (1): 67-76.

Lehmann JM, Moore LB, Smith-Olivier TA, Wilkison WO, Wilson TM, Kliewer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxysome Proliferator-activated receptor gamma (PPAR- $\gamma$ ). *J. Biol. Chem.* 1995; **270** (22): 12953-12956.

Levrresse V, Butterfield L, Zentrich E, Heasley LE. Akt negatively regulates the c-Jun N-terminal kinase pathway in PC12 cells. *J. Neurosci. Res.* 2000; **62** (6): 799-808.

Lin TA, Lawrence Jr JC. Control of PHAS-I phosphorylation in 3T3-L1 adipocytes: Effects of inhibiting protein phosphatases and the p70S6 kinase signaling pathway. *Diabetologia* 1997; **40** (2): S18-S24.

Liu LS (a), Tanaka H, Ishii S, Eckel J. The new antidiabetic drug MCC-555 acutely sensitizes insulin signaling in isolated cardiomyocytes. *Endocrinology* 1998; **139** (11):4531-4539.

Liu LS (b), Spelleken M, Rohrig K, Hauner H, Eckel J. Tumor necrosis factor- $\alpha$  acutely inhibits insulin signaling in human adipocytes: implication of the p80 tumor necrosis factor receptor. *Diabetes* 1998; **47** (4): 515-522.

Liu W, Schoenkerman, Lowe WL Jr. Activation of members of the mitogene activated protein kinase family by glucose in endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 2000; **279** (4): E782–E790.

Looker HC, Knowler WC, Hanson RL. Changes in BMI and weight before and after the development of type 2 diabetes. *Diabetes care* 2001; **24** (11): 1917-1922.

Lucibello FC, Neuberg M, Hunter JB, Jenuwein T, Schuermann M, Wallich R, Stein B, Schonthal A, Herrlich P, Muller R. Transactivation of gene expression by Fos protein: involvement of a binding site for the transcription factor API. *Oncogene* 1988; **3**:43-51.

Lucibello FC, Lowag C, Neuberg M, Muller R. Transrepression of the mouse c-Fos promoter: a novel mechanism of Fos-mediated trans-regulation. *Cell* 1989; **59** (6): 999-1007.

Mackay DJ, Hall A. Rho GTPases. *J. Biol. Chem.* 1998; **273** (33): 20685-20688.

Martin BC, Warram JH, Krolewski AS, Bergman RN, Soeldner JS, Kahn CR. Role of glucose and insulin resistance in development of type II diabetes mellitus: results of a 25-year follow up study. *Lancet* 1992; **340** (8825): 925-929.

Majer M, Popov KM, Harris RA, Bogardus C, Prochazka M. Insulin downregulates pyruvate dehydrogenase kinase (PDK) mRNA: potential mechanism contributing to increased lipid oxidation in insulin-resistant subjects. *Mol. Genet. Metab.* 1998; **65** (2): 181-186.

Meyer MM, Levin K, Grimmsmann T, Perwitz N, Eirich A, Beck-Nielsen H, Klein HH. Troglitazone treatment increases protein kinase B phosphorylation in skeletal muscle of normoglycemic subjects at risk for the development of type 2 diabetes. *Diabetes* 2002; **51 (9)**: 2691-2697.

Myers MG Jr, BAdcker JM, Sun XJ, Shoelson S, Hu P, Schlessinger J, Yoakim M, Schaffhausen B, White MF. IRS-1 activates phosphatidylinositol-3' kinase by association with src homology 2 domains of p85. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; **89 (21)**: 10350-10354.

Miyazaki Y, Mahankali A, Matsuda M, Mahankali S, Hardies J, Cusi K, Mandarino LJ, De Fronzo R. Effect of Pioglitazone on abdominal fat distribution and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002; **87 (6)**: 2784-2791.

Mohamed-Ali V, Pinkney JH, Coppack SW. Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 1998; **22 (12)**: 1145-1158.

Morino K, Maegawa H, Fujita T, Takahara N, Egawa K, Kashiwagi A, Kikkawa R. Insulin-induced c-jun N-terminal kinase activation is negatively regulated by protein kinase C delta. *Endocrinology* 2001; **142 (6)**: 2669-2676.

Motokura T, Bloom T, Kim HG, Juppner H, Rudermann JV, Kronenberg HM, Arnold A. A novel cyclin encoded by a bell-linked candidate oncogene. *Nature* 1991; **350 (6318)**: 512-515.

Motokura T, Arnold A. Cyclin D and oncogenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1993; **3 (1)**: 5-10.

Nauck M. Diabetologie. Antidiabetische Kombinationstherapie. *Der Internist* 2001; **42 Suppl. 1**: 20-27

Nephew KP, Tang M, Khan SA. Estrogen differentially affects c-Jun expression in uterine tissue compartments. *Endocrinology* 1994; **134 (4)**: 1827-1834.

Newton CR, Graham A. PCR, Serie "Fokus" des Spektrum Verlages, Heidelberg, Berlin Oxford, 2. Auflage 1994

Nigg EA. Targets of cyclin-dependent protein kinases. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 1993; **5** (2): 187-193

Nilsson J, Jovinge S, Niemann A, Reneland R, Lithell H. Relation between plasma tumor necrosis factor- $\alpha$  and insulin sensitivity in elderly men with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1998; **18** (8): 1199-1202.

Okada T, Kawano Y, Sakakibara T, Hazeki O, Ui M. Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin-induced glucose transport and antilipolysis in rat adipocytes. Studies with a selective inhibitor wortmannin. *J. Biol.Chem.* 1994; **269** (5): 3568-3573.

Olefsky JM. Treatment of insulin resistance with peroxysome proliferator-activated receptor- $\gamma$  agonists. *J. Clin. Invest.* 2000; **106** (4): 467-472.

Olson AL, Pessin JE. Regulation of c-fos expression in adipose and muscle tissue of diabetic rats. *Endocrinology* 1994; **134** (1): 271-276.

Otsu M, Hiles I, Gout I, Fry MJ, Ruiz-Larrea F, Panayotu G, Thompson A, Dhand R, Hsuan J, Totty N, Smith AD, Morgan SJ, Courtneige SA, Parker PJ, Waterfield MD. Characterization of two 85 kDa proteins that associate with receptor tyrosine kinases, middle-T/pp60<sup>c-src</sup> complexes and PI3-kinase. *Cell* 1991; **65** (1): 91-104.

Ozanne SE, Wang CL, Coleman N, Smith GD. Altered muscle insulin sensitivity in the male offspring of protein-malnourished rats. *Am. J. Physiol.* 1996; **271** (6,1): E1128-1134.

Paradis S, Ruvkun G. *Caenorhabditis elegans* Akt/PKB transduces insulin receptor-like signals from AGE-1 PI-3 kinase to the DAF-16 transcription factor. *Genes Dev.* 1998; **12** (16): 2488-2498.

Peraldi P, Hotamisligil GS, Buurman WA, White MF, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor (TNF)-alpha inhibits insulin signaling through stimulation of the p55 TNF receptor and activation of sphingomyelinase. *J. Biol. Chem.* 1996; **271** (22): 13018-13022.

Perseghin G, Ghosh S, Gerow K, Shulman GI. Metabolic defects in lean nondiabetic offspring of NIDDM parents. A cross sectional study. *Diabetes* 1997; **46** (6):1001–1009.

Peters SJ (a), Harris RA, Wu P, Pehleman TL, Heigenhauser GJ, Spriet LL. Human skeletal muscle PDH kinase activity and isoform expression during a 3-day high-fat/low-carbohydrate diet. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2001; **281** (6): E 1151-E1158.

Peters SJ (b), Harris RA, Heigenhauser GJ, Spriet LL. Muscle fiber type comparison of PDH kinase activity and isoform expression in fed and fasted rats. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 2001; **280** (3): R661-R668.

Peterson RT, Schreiber SL. Kinase phosphorylation: Keeping it all in the family. *Curr. Biol.* 1999; **9** (14): R521-R524.

Pons S, Asano T, Glasheen E, Miralpeix M, Zhang X, Fisher TL, Myers MG Jr., Sun Xj, White MF. The structure and function of p55 PIK reveal a new regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol. Cell. Biol.* 1995; **15** (8): 4453-4465.

Qi C, Pekala PH. Tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance in adipocytes. *P.S.E.B.M.* 2000; **223** (2): 128-135.

Rahmsdorf HJ. Jun: transcription factor and oncoprotein. *J. Mol. Med.* 1996; **74** (12): 725-47.

Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease (syndrome X): an expanded definition. *Annu. Rev. Med.* 1993; **44**: 121-131.

Reaven GM. Pathophysiology of insulin resistance in human disease. *Physiol. Rev.* 1995; **75** (3): 473-486.

Rodbell M. Localization of lipoprotein lipase in fat cells in rat adipose tissue. *J. Biol. Chem.* 1964; **239**: 733-735.

Rondinone CM, Wang L, Lonroth P, Weslau C, Pierce JH, Smith U. Insulin-receptor substrate (IRS)1 is reduced and IRS-2 is the main docking protein for phosphatidylinositol-3-kinase in adipocytes from subjects with non insulin dependent diabetes mellitus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; **94 (8)**: 4171-4175.

Rosen OM. After insulin binds. *Science* 1987; **237 (4821)**: 1452-1458.

Rosenberg CL, Motokura T, Kronenberg HM, Arnold A. Coding sequence of the overexpressed transcript of the putative oncogene PRAD1/cyclin D1 in two primary human tumors. *Oncogene* 1993; **8 (2)**: 519-21.

Rothman DL, Magnusson I, Cline G, Gerard D, Kahn CR, Shulman RG, Shulman GI. Decreased muscle glucose transport/phosphorylation is an early defect in the pathogenesis of non-insulin dependent diabetes mellitus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995; **92 (4)**: 983-987.

Ruan H, Hacoheh N, Golub TR, Van Parijs L, Lodish HF. Tumor necrosis factor-alpha suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes: nuclear factor-kappaB activation by TNF-alpha is obligatory. *Diabetes* 2002; **51 (5)**: 1319-1336.

Saghizadeh M, Ong JM, Garvey WT, Henry RR, Kern PA. The expression of TNF- $\alpha$  by human muscle. *J. Clin. Invest.* 1996; **97 (4)**: 1111-1116.

Sassone-Corsi P, Sisson JC, Verma IM. Transcriptional autoregulation of the proto-oncogene fos. *Nature* 1988; **334 (6180)**: 314-319.

Scaldefferri ML, Federici M *et al.* Insulin receptor substrate (IRS) transduction system: distinct and overlapping signalling potential. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 2000; **16 (6)**: 434-441.

Scheid MP, Marignani PA, Woodgett JR. Multiple phosphoinositide 3-kinase-dependent steps in activation of protein kinase B. *Mol. Cell Biol.* 2002; **22** (17): 6247-60.

Schonthal A, Herrlich P, Rahmsdorf HJ, Ponta H. Requirement for fos gene expression in the transcriptional activation of collagenase by other oncogenes and phorbol esters. *Cell* 1988; **54** (3): 325-3342.

Shepherd PR, Nave BT, Siddle K. Insulin stimulation of glycogen synthesis and glycogen synthase activity is blocked by wortmannin and rapamycin in 3T3-L1-adipocytes: evidence for the involvement of phosphoinositide 3-kinase and p70 ribosomal protein-S6 kinase. *Biochem. J.* 1995; **305** (1): 25-28.

Shepherd PR, Reaves BJ, Davidson HW. Phosphoinositide 3-kinase and membrane traffic. *Trends Cell Biol.* 1996; **6** (3): 92-97.

Shepherd PR, Withers DJ, Siddle K. Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem. J.* 1998; **333** (3): 471-490.

Shimizu Y, Shimazu T. Effects of wortmannin on increased glucose transport by insulin or norepinephrine in primary culture of brown adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994; **202** (2): 660-665.

Shimomura I, Hammer RE, Ikemoto S, Brown MS, Goldstein JL. Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy. *Nature* 1999; **401** (6748): 73-76.

Shimomura I, Bashmakov Y, Ikemoto S, Horton JD, Brown MS, Goldstein JL. Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999; **96** (24): 13656-13661.

Skapek SX, Rhee J, Spicer DB, Lassar AB. Inhibition of myogenic differentiation in proliferating myoblasts by cyclin D1-dependent kinase. *Science* 1995; **267** (5200): 1022-1024.

Smith PJ, Wise LS, Berkowitz R, Wan C, Rubin CS. Insulin-like growth factor-I is an essential regulator of the differentiation of 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 1988; **263** (19): 9402-9408.

Smith U. Impaired ('diabetic') insulin signaling and action occur in fat cells long before glucose intolerance - is insulin resistance initiated in the adipose tissue? *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 2002; **26** (7): 897-904.

Stace PB, Fatania HR, Jackson A, Kerbey AL, Randle PJ. Cyclic AMP and free fatty acids in the longer-term regulation of pyruvate dehydrogenase kinase in rat soleus muscle. *Biochem. Biophys. Acta* 1992; **1135** (2): 201-206.

Standaert ML, Kanoh Y, Sjan MP, Bandyopadhyay G, Farese RV. Cbl, IRS-1, and IRS-2 mediate effects of rosiglitazone on PI3K, PKC-lambda, and glucose transport in 3T3/L1 adipocytes. *Endocrinology* 2002; **143** (5): 1705-1716.

Stephens L, Anderson K, Stokoe D, Erdjument-Bromage H, Painter GF, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, MacCormick F, Tempst P, Coadwell J, Hawkins PT. Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5- triphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science* 1998; **279** (5351): 710-714.

Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 2001; **409** (6818): 307-312.

Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden PA, Cahill DA, Goldstein BJ, White MF. Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* 1991; **352** (6330): 73-77.

Sutherland C, O'Brien RM, Granner DK. Phosphatidylinositol 3-kinase, but not p70/p85 ribosomal S6 protein kinase, is required for the regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) gene expression by insulin. Dissociation of signaling pathways for insulin and phorbol ester regulation of PEPCK gene expression. *J. Biol. Chem.* 1995; **270** (26): 15501-15506.

Tamemoto H, Kadowaki T, Tobe K, Yagi T, Sakura H, Hayakawa T, Terauchi Y, Ueki K, Kaburagi Y, Satoh S. Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate 1. *Nature* 1994; **372 (6502)**: 182-186.

Tartaglia LA (a), Pennica P, Goeddel D. Ligand passing: The 75 kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55 kDa-TNF receptor. *J. Biol. Chem.* 1993; **268 (25)**: 18542-18548.

Tartaglia LA (b), Rothe M, Hu YF, Goeddel DV. Tumor necrosis factor's cytotoxic activity is signaled by the p55 TNF receptor. *Cell* 1993; **73 (2)**: 213-216.

Tartaglia LA, Weber RF, Figari IS, Reynolds C, Palladino MAJ, Goeddel DV. The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991; **88 (20)**: 9292-9296.

Taylor SI, Arioglu E. Syndromes associated with insulin resistance & acanthosis nigricans. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* 1998; **9 (2-4)**: 419-439.

Terauchi Y, Tsuji Y, Satoh S, Minoura H, Murakami K, Okuno A, Inukai K, Asano T, Kaburagi Y, Ueki K, Nakajima H, Hanafusa T, Matsukawa Y, Sekihara H, Yin Y, Barrett JC, Oda H, Ishikawa T, Akanuma Y, Komuro I, Suzuki M, Yamamura K, Kodama T, Suzuki H, Kadowaki T. Increased insulin sensitivity and hypoglycaemia in mice lacking the p85 subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Nature Genet.* 1999; **21 (2)**: 230-235.

Thompson DB, de Gregorio M, Sommercorn J. Insulin regulation of multiple ribonucleic acid species in human skeletal muscle in insulin-sensitive and insulin-resistant subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1996; **81 (2)**: 519-523.

Toker A, Cantley LC. Signaling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature* 1997; **387 (6634)**: 673-676.

Toker A, Newton AC. Akt/Protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site. *J. Biol. Chem.* 2000; **275 (12)**: 8271-8274.

Tiainen M, Pajalunga D, Ferrantelli F, Soddu S, Salvatori G, Sacchi A, Crescenzi M. Terminally differentiated skeletal myotubes are not confined to G0 but can enter G1 upon growth factor stimulation. *Cell. Growth Differ.* 1996; **7 (8)**: 1039-50.

Tsigos C, Kyrou I, Economidou C, Tsapogas P, Kantzos N, Mantas P, Katsilambros N. Elevated circulating tumor necrosis factor alpha receptor 1 and 2 (TNFR1, TNFR2) concentrations in human obesity. *Int. J. Obes.* 1998; **21**: 9ff.

Ukkola O. Resistin - a mediator of obesity-associated insulin resistance or an innocent bystander? *Eur. J. Endocrinol.* 2002; **147 (5)**: 571-4.

Ullrich A, Bell JR, Chen EY, Herrera R, Petruzelli LM, Dull TJ, Gray A, Coussens L, Liao YC, Tsubokawa M, Mason A, Seeburg PH, Grunfeld C, Rosen OM, Ramachandran J. Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature (London)* 1985; **313 (6005)**: 756-761.

Vaag A, Henriksen JE, Beck-Nielsen H: Decreased activation of glycogen synthase in skeletal muscles in young nonobese Caucasian first-degree relatives of patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* 1992; **89 (3)**: 782-788.

Vandenabeele P, Declercq W, Beyaert R, Fiers W. Two tumor necrosis factor receptors: structure and function. *Trends Cell Biol.* 1995; **5 (10)**: 392-399.

Vescovo G, Ambrosio GB, Dalla Libera L. Apoptosis and change in contractile protein pattern in the skeletal muscle in heart failure. *Acta Physiol. Scand.* 2001; **171 (3)**: 305-310.

Walker KS, Deak M, Paterson A, Hudson K, Cohen P, Alessi DR. Activation of protein kinase B beta and gamma isoforms by insulin in vivo and by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 in vitro: comparison with protein kinase B alpha. *Biochem. J.* 1998; **331 (1)**: 299-308.

Wang LM, Myers MG Jr, Sun XJ, Aaronson SA, White MF, Pierce JH. IRS-1: essential for insulin and IL-4 stimulated mitogenesis in haematopoietic cells. *Science* 1993; **261 (5128)**: 1591-1594.

Wang PH, Almahfouz A, Giorgino F, Mc Cowen KC, Smith RJ. In vivo insulin signaling in the myocardium of streptozotocin-diabetic rats: opposite effects of diabetes on insulin stimulation of glycogen synthase and c-fos. *Endocrinology* 1999; **140** (3): 1141-1150.

Warram JH, Martin BC, Krolewski AS, Soeldner JS, Kahn CR. Slow glucose removal rate and hyperinsulinemia precede the development of type II diabetes in the offspring of diabetic parents. *Ann. Intern. Med.* 1990; **113** (12): 909-915.

Withers DJ, Guierrez J, Towery H, Burkes DJ, Ren JM, Previs S, Zhang Y, Bernal D, Pons S, Shulman GI, Bonner-Weir S, White MF. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 1998; **391** (6670): 329-339.

White MF, Maron R, Kahn CR. Insulin rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of a  $M_r$ -185,000 protein in intact cells. *Nature (London)* 1985; **318** (6042): 183-186.

White MF. The insulin signalling system and the IRS proteins. *Diabetologia* 1997; **40** (2): 2-17.

White MF. IRS proteins a common path to diabetes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2002; **283** (3): E 413-E422.

Wick MJ, Dong LQ, Riojas RA, Ramos FJ, Liu F. Mechanism of phosphorylation of protein kinase B/Akt by a constitutively active 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1. *J. Biol. Chem.* 2000; **275** (51): 40400-40406.

Wu P, Sato J, Zhao Y, Jaskiewicz J, Popov KM, Harris RA. Starvation and diabetes increase the amount of pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme 4 in rat heart. *Biochem. J.* 1998; **329** (1): 197-201.

Wymann MP, Pirola L. Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim. Biophys. Acta* 1998; **1436** (1-2): 127-150.

Xu H, Sethi JK, Hotamisligil GS. Transmembrane tumor necrosis factor (TNF)-alpha inhibits adipocyte differentiation by selectively activating TNF receptor 1. *J. Biol. Chem.* 1999; **274** (37):26287-95.

Yalow RS, Berson SA. Plasma insulin concentrations in nondiabetic and early diabetic subjects. *Diabetes* 1960; **4**: 254-260.

Zhang JM, Wie Q, Zhao X, Paterson BM. Coupling of the cell cycle and myogenesis through the cyclin D1-dependent interaction of MyoD with cdk4. *The EMBO Journal* 1999; **18** (4): 926–933.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; **372** (6505): 425-432.

Ziegler SF, Bird TA, Schneringer JA, Schooley KA, Baum PR. Molecular cloning and characterisation of a novel receptor protein tyrosine kinase from human placenta. *Oncogene* 1993; **8** (3): 663-670.

## 6.2. Alphabetisches Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AKT	Synonym: Protein-Kinase B
$\beta$ 2-MG	$\beta$ 2-Mikroglobulin (Muskel-Protein, Haushalts-Gen)
BMI	Body-Mass-Index: Gewicht/Körpergröße <sup>2</sup> [kg/m <sup>2</sup> ]
BZ	Blutzucker [mg/dl]
c-jun	Transkriptionsfaktor, Protoonkogen
c-fos	Transkriptionsfaktor, Protoonkogen
c-myc	Transkriptionsfaktor, Protoonkogen
db/db-Maus	db für „diabetic“, Mausmodell, das diabetisch wird
ERK	extracellular signal regulated-Kinase
FFA	Free fatty acids, freie Fettsäuren
GAPDH	Glycerin-Aldehyd-Phosphat-Dehydrogenase (Haushalts-Gen)
GLUT1-7	Glukose-Transporter-Isoformen 1-7
Grb-2	Growth receptor binding protein-2
GSK-3	Glykogen-Synthase-Kinase-3
GTPase	Guanosin-triphosphat hydrolysierendes Enzym
HLA	Human leukocyte antigen a.d. Zelloberfläche
IDDM	Insulin dependent diabetes mellitus
IR	Insulin-Rezeptor
IRS	Insulin-Rezeptor-Substrat
JNK 1-3	Januskinase 1-3, c-jun N-terminal kinase
MAPK	mitogen-activated protein kinase, reguliert durch MAPKK
MAPKKK	mitogen-activated protein kinase kinase kinase reguliert MAPKK
MODY	Maturity onset diabetes of the young
NIDDM	Non insulin dependent diabetes mellitus
ob/ob-Maus	ob für „obese“, Mausmodell, das übergewichtig wird
oGTT	oraler Glukose-Toleranz-Test
PDC	Pyruvate-dehydrogenase-complex
PDK-2	Pyruvate-dehydrogenase-kinase-2
PDPK-1	Phosphoinositol-dependent protein-kinase-1
PH	Plextrin-homologe Domäne (im IRS)
PI3K	Phosphatidyl-inositol-3-kinase
PK A/B/C	Protein kinase A/B/C
P38 MAPK $\alpha$ - $\delta$	Isoformen, gehören zur Familie der MAPK
PPAR- $\gamma$	Peroxisome proliferator activated receptor gamma
PTB	Phosphotyrosin-bindender Bereich (im IRS)
PtdIns(3,4)P <sub>2</sub> / -(3,4,5)P <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-3,4-bi- bzw. -3,4,5-triphosphat
SH2	src2 Homologie-2-Domäne von Proteinen (interagiert mit IRS)
TG	Triglyzeride
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
TNFR1,2 (60/80)	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-1 (60-) / -2 (80 kDa-Isoform)
TRO	Troglitazon
TZD	Thiazolidindione, Stoffklasse, Antidiabetika (z.B. TRO)

### 6.3. Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand von 09/2003 – 03/2002 in der Abteilung Klinische Biochemie und Pathobiochemie (Arbeitsgruppe Molekulare Kardiologie) unter der Anleitung von Prof. Dr. J. Eckel und wurde verfasst am Deutschen Diabetes-Forschungsinstitut an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Ich danke Prof. Dr. J. Eckel für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe.

Die Offenheit neuen Methoden und Arbeitstechniken gegenüber gab mir die Möglichkeit, meine Arbeit methodisch sehr selbständig zu gestalten und meine Gedanken und Ideen einbringen zu können. Dies habe ich sehr genossen. Auch die fast ständige Bereitschaft zu interessanten Diskussion hat mir Freude bereitet.

Ich danke meinen Mitdoktoranden für lustige Stunden bei der gemeinsamen Arbeit und bei privaten Anlässen sowie auch den festangestellten Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für ihre Unterstützung und für das gute Arbeitsklima.

Besonders danke ich Fr. Dipl. Biol. D. Dietze und Fr. M. Koenen für die Einarbeitung in das Zellkultursystem, bzw. für die Nachzucht der Zellen und Fr. W. Paßlack für ihr offenes Ohr.

Ich danke insbesondere Hr. Dr. A. Vogel, der mir mit Ruhe und Nachsicht zur Seite stand.

Ich danke meinen Freunden für ihre Treue, für gelegentliche Motivation und für ihre Geduld bei Klagen und Jammereien sowie für gemeinsame schöne Stunden.

Ich danke meinen Eltern, die mir die Möglichkeit gaben, eine solche Arbeit einmal anfertigen zu können.

## 7. Lebenslauf

01.08.1974	Geboren in Marburg a.d. Lahn
08/1980 - 07/1984	Katholische Grundschule Mettmann
08/1984 - 06/1993	Konrad-Heresbach-Gymnasium Mettmann Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
02/1991-08/1991	Aufenthalt in einer Gastfamilie in Neuseeland/Papakura Besuch der dortigen High School
10/1993 - 04/1999	Chemie-Studium an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf; Abschluss als Diplom-Chemikerin Biochemische Diplomarbeit für die Fa. Henkel KGaA an der Hautklinik und dem Biologisch-Medizinischen-Forschungszentrum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
04/1994	Beginn des Medizin-Studiums an der Universität Düsseldorf
03/1999	Ärztliche Vorprüfung
03/2000	1. Ärztliche Prüfung
03/2002	2. Ärztliche Prüfung
05/2003	3. Ärztliche Prüfung
08/2003 -dato	ÄIP am Evangelischen und Johanniter Klinikum Duisburg, Oberhausen, Dinslaken GmbH