

Aus dem Deutschen Diabetes-Zentrum  
Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie  
Heinrich-Heine- Universität Düsseldorf  
Direktor: Prof. Dr. med. D. Müller-Wieland  
Betreuer: Prof. Dr. J.Eckel

**Etablierung und Charakterisierung einer  
Insulin-sensitiven Herzmuskelzelllinie**

**Dissertation**

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf  
vorgelegt von  
Jamila Bettina Pause  
2005

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

gez: Prof. Dr. med. dent. Raab  
Dekan

Referent: Prof. Dr. J. Eckel  
Korreferent: Prof. Dr. med. W. Däubener

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1. Definition, Prävalenz, Ätiologie, Diagnostik, Pathogenese, Spätfolgen und Therapie der Diabeteserkrankung	1
1.2. Molekulare Mechanismen der Insulinwirkung auf zellulärer/intrazellulärer Ebene	6
1.3. Periphere Insulinresistenz der Muskulatur als initiales Ereignis in der Pathogenese des Typ 2 Diabetes	12
1.4. Ziel dieser Arbeit	14
<b>2. Materialien.....</b>	<b>15</b>
2.1. Verbrauchsmaterial	15
2.2. Radioisotope	16
2.3. Insulin	16
2.4. Antikörper	16
2.5. Zellsysteme	17
2.6. Expressionsvektor	17
2.7. Kulturmedien	17
2.8. Molekularstandards	18
2.9. Chemikalien	18
<b>3. Methoden.....</b>	<b>20</b>
3.1. Kultivierung von H9c2-Zellen	20
3.2. Solubilisierung der Zellen	20
3.3. Transfektion	21
3.4. Proteinbestimmung	22
3.5. Gelelektrophorese	22
3.6. Transfer der Proteine auf Membranen	23
3.7. Färbetechnik nach Ponceau S	24

<b>3.8.</b> Detektion mit verstärkter Chemilumineszenz (ECL)	24
<b>3.9.</b> Strippen von Blotmembranen	25
<b>3.10.</b> Messung der Insulinbindung	25
<b>3.11.</b> Messung des 2-Desoxyglucose Transportes	26
<b>3.12.</b> Berechnung und Statistik	27
<b>4. Ergebnisse.....</b>	<b>28</b>
4.1. Transfektion der H9c2- Zellen mit dem cDNA für den humanen Insulinrezeptor	28
4.2. Überexpression der $\beta$ -Untereinheit des Insulinrezeptors und Insulinbindung in verschiedenen Subklonen aus H9c2-Zellen nach stabiler Transfektion	28
4.3. Untersuchung der Expresssion des Glukosetransporters-Isoform1 in Insulinrezeptor-Klonen aus H9c2-Zellen	33
4.4. Untersuchung der Expression der Glukosetransporter-Isoform4 in Insulinrezeptor-Klonen aus H9c2-Zellen	35
4.5. Untersuchung der IGF-I Rezeptor-Expression in Insulinrezeptor-Klonen aus H9c2-Zellen	36
4.6. Messung des 2-Deoxyglukosetransportes in den H9c2-Zellen und drei stabil transfizierten Subklonen	38
4.7. Messung des 2-Deoxyglukosetransportes in H9c2-Zellen und dem stabil transfizierten E2-Klon mit verschiedenen Insulinkonzentrationen (Dosis-Wirkungskurve)	39
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>41</b>
5.1. Die H9c2- Muskelzelllinie ein gut geeignetes System für die Transfektion mit dem humanen Insulinrezeptor und für Langzeitstudien	41
5.2. Auswirkung der stabilen Transfektion der H9c2-Zellen mit dem Insulinrezeptor auf die Expression des IGF-I Rezeptors	43
5.3. Auswirkung der stabilen Transfektion der H9c2-Zellen mit dem Insulinrezeptor auf die Expression des GLUT1 und des GLUT4	45

5.4. Auswirkung der stabilen Transfektion der H9c2-Zellen mit dem Insulinrezeptor auf die zelluläre Glukoseaufnahme	49
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>52</b>
<b>7. Literatur.....</b>	<b>56</b>
<b>8. Anhang.....</b>	<b>70</b>
8.1. Verwendete Abkürzungen	70
8.2. Abbildungsverzeichnis	71
8.3. Erklärung	73
8.4. Danksagung	74
8.5. Curriculum vitae	75

# 1. Einleitung

## 1.1. Definition, Prävalenz, Ätiologie, Diagnostik, Pathogenese, Spätfolgen und Therapie der Diabeteserkrankung

Unter Diabetes mellitus versteht man ein sehr komplexes, heterogenes Krankheitsbild. Es handelt sich um eine Erkrankung des Kohlenhydratstoffwechsels, die als Charakteristikum einen chronisch erhöhten Blutzuckerspiegel (Hyperglykämie) hat. In der Bundesrepublik sind etwa 5 % der Bevölkerung an Diabetes mellitus erkrankt, wobei die Prävalenz in den letzten Jahrzehnten stark zugenommen hat. Bei dem größten Teil der Patienten handelt es sich um Typ 2 Diabetiker, nur 5-10 % aller Diabetiker sind am Typ 1 Diabetes erkrankt.

Die Ätiologie der Erkrankung lässt sich vier Gruppen (I-IV) zuordnen (Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2005).

Der Typ 1 Diabetes (insulin dependent diabetes mellitus, IDDM) kann sich in jedem Lebensalter manifestieren, häufig bereits im Kindes- und Jugendalter. Das Hauptmanifestationsalter liegt zwischen dem 4. und dem 11. Lebensjahr. Beim Typ 1 Diabetes handelt es sich um eine Störung der Glukoseverwertung. Diese Störung ist durch einen nahezu vollständigen Mangel an endogenem Insulin bedingt. Der Typ 1 Diabetes ist über die selektive Destruktion der  $\beta$ -Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas definiert. Man unterscheidet zwei Formen, zum einen die immunvermittelte (1A) und zum anderen die ideopathische (1B) (The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 1997). Die selektive Zerstörung der  $\beta$ -Zellen erfolgt durch einen Autoimmunprozess. Als Ätiopathogenese kommt weiterhin eine genetische Disposition für den Typ 1 Diabetes (Olmos et al., 1988; Tillil et al. 1987; Barnett et al., 1981), der mit spezifischen Histiokompatibilitätskomplexen (HLA-DR/DQ-Risikoallelen) assoziiert ist, in Frage. In diesem Zusammenhang zeigte ein Vergleich der Erkrankungsmanifestation von Verwandten ersten Grades, dass monozygote Zwillinge häufiger als HLA-identische Geschwister, diszygote Zwillinge oder nicht HLA-identische Geschwister an einem Typ 1 Diabetes erkranken (Olmos et al., 1988; Tillil et al., 1987). Jedoch ist die

beschriebene genetische Prädisposition für die Genese eines Typ 1 Diabetes nicht hinreichend. Dies kann man der unter 50 % liegenden Konkordanz (Erkrankung beider) eineiiger Zwillinge beim Auftreten des Typ 1 Diabetes entnehmen (Kompendium Diabetologie, 1999). Deshalb sollen weitere exogene Faktoren wie z. B. Viren, die den Krankheitsprozess zusätzlich begünstigen, in Betracht gezogen werden. Im Pankreas entsteht eine „Insulitis“, die  $\beta$ -Zellen werden vom Immunsystem als fremd erkannt. Als Ausdruck einer Aktivierung des Immunsystems infiltrieren Monozyten/Makrophagen die Inseln. Zusätzlich kommt es im Rahmen einer Immunreaktion zu einer Destruktion der  $\beta$ -Zellen durch zytotoxische Autoantikörper. Die  $\beta$ -Zelldestruktion verläuft meist langsam progredient über einen Zeitraum von Jahren. Einige Zeit vor und zum Zeitpunkt der klinischen Diabetesmanifestation können im Serum spezifische Autoantikörper nachgewiesen werden, z.B. zytoplasmatische Inselzellantikörper (ICA), Insulinautoantikörper (IAA) und Antikörper gegen Glutamatdecarboxylase (Anti-GAD, GADA) (Greten, 2001). Erst bei einer 80 %igen Zerstörung der  $\beta$ -Zellen des Pankreas manifestiert sich die klinische Symptomatik des Typ 1 Diabetes. Die Symptomatik wird von der klinischen Geschwindigkeit der Krankheitsentwicklung bestimmt. Bei schneller Entwicklung, in ca. 20 % der Fälle, stellt sich eine ketoazidotische Stoffwechsellage ein. Diese kann mit Übelkeit, Erbrechen, Azetongeruch in der Atemluft, Bauchschmerzen, Zeichen der Exsikose und Bewusstseinsstrübung bis hin zum Coma diabeticum einhergehen. Bei einer protrahierten Entwicklung stehen vermehrter Durst, Polyurie, Gewichtsabnahme und allgemeine Leistungsschwäche im Vordergrund (von Harnack, 2000). Die Diagnose gilt als gesichert, wenn im Rahmen einer Routineuntersuchung ein erhöhter Gelegenheitsblutzucker ( $\geq 200$  mg/dl, 11,1 mmol/l Plasmaglukose) oder Nüchternblutzucker ( $\geq 126$ mg/dl, 7,0 mmol/l Plasmaglukose, entspricht 110 mg/dl, 6,1 mmol/l kapillär oder Vollblut) erfasst wurde. Als nüchtern ist eine Periode ohne Nahrungsaufnahme von 8 Stunden definiert (The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 1997). Der Therapieansatz bei Typ 1 Diabetes liegt in der Schulung der Patienten, einer diabetesgerechten Ernährung, Langzeitbetreuung sowie der Kontrolle evtl. anderer Risikofaktoren. Obligat ist

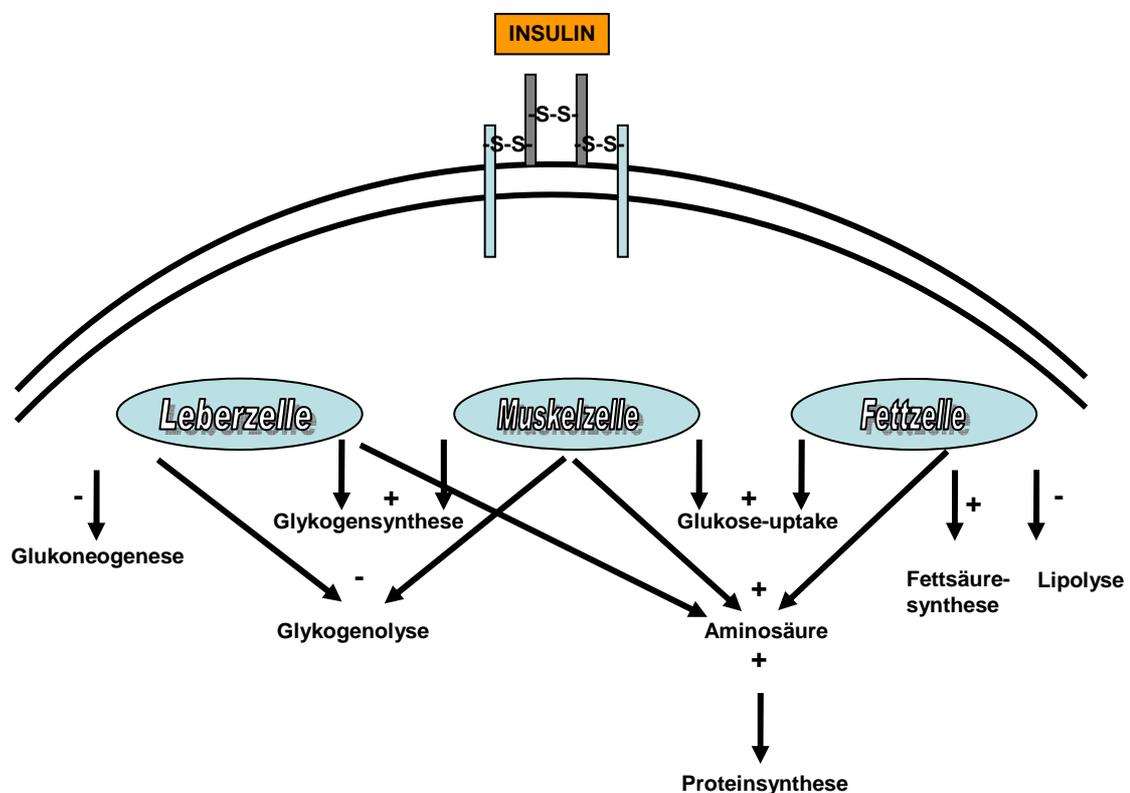
die Insulinbehandlung, bei der Insulin mit der bestmöglichen Nachahmung des natürlichen Sekretionsmusters exogen zugeführt wird (Lernmark, 1995).

Beim Typ 2 Diabetes (non insulin dependent diabetes mellitus, NIDDM) handelt es sich um eine Erkrankung des älteren Menschen mit einer komplexen, multifaktoriellen Pathogenese.

Der Insulinresistenz der Zielorgane, also von Muskel-, Fettgewebe (periphere Insulinresistenz) und Leber (Kahn, 1994; Lillioja et al., 1993; Martin et al., 1992) sowie die verminderte Sensitivität der  $\beta$ -Zellen gegenüber einer Hyperglykämie (Haffner et al., 1996; Olefsky & Nolan, 1995; Martin et al., 1992) werden eine herausragende Rolle zugeschrieben. Darüber hinaus gibt es noch die hepatische Insulinresistenz. Darunter versteht man die nicht ausreichende Suppression der hepatischen Glukoneogenese durch Insulin. Diese ist für einen großen Teil der Nüchternhyperglykämie beim manifesten Diabetes verantwortlich (Olefsky, 1995). Eine große Bedeutung bei der Pathogenese der Insulinresistenz wird der genetischen Disposition und einer Reihe von sekundären umweltbedingten Faktoren zugeschrieben (Kahn, 1995). Hierzu zählt man Adipositas (80 % der Typ 2 Diabetiker sind fettleibig), metabolische Faktoren (u.a. Hyperglykämie), Alter und Mangel an körperlicher Aktivität.

Es konnten durch eine Reihe von Untersuchungen Gene identifiziert werden, die an der Pathogenese des Typ 2 Diabetes beteiligt sind. Klinisch zeigt sich der Typ 2 Diabetes häufig erst nach bis zu 20 Jahren andauernder Insulinresistenz (Warram et al., 1990; Lillioja 1988). Häufig treten Begleiterkrankungen wie arterielle Hypertonie, Fettstoffwechselstörungen und degenerative Gefäßerkrankungen, z.B. koronare Herzerkrankung (KHK) auf. Beim Diabetes kommt es durch den Mangel an Insulin und/oder durch das Unvermögen des Organismus, zugefügte Kohlenhydrate zu verwerten (Glukosetoleranzstörung) zu einer Verminderung der zellulären Aufnahme von Glukose, welche das wichtigste energieliefernde Substrat darstellt. Gleichzeitig führen der Insulinmangel bzw. die Glukosetoleranzstörung zu einem pathologischen Blutglukosespiegel (Hyperglykämie). Kompensatorisch kommt es zu einer Mehrsekretion von antiinsulinären Hormonen (Wachstumshormon, Glukagon, Adrenalin) und zu einer vermehrten Glukoneogenese in der Leber, was die Hyperglykämie zusätzlich verstärkt. Wird die sogenannte

Nierenschwelle überschritten (ca. bei 160 mg/dl Glukose im Blut), kommt es zur Glukosurie und durch osmotische Diurese zur Polyurie und konsekutiv zur Polydipsie. Eine verstärkte Lipolyse führt zu einem Anstieg der freien Fettsäuren im Blut, die zu Ketonkörpern (z. B. Azeton) verstoffwechselt werden. Der vermehrte Anfall von sauren Stoffwechselprodukten kann schließlich zur metabolischen Azidose führen. Aus einer permanenten Hyperglykämie resultieren Anlagerung von Glukose und anderen Zuckern an Strukturproteine, was Gewebeveränderungen zur Folge hat. Durch das Auftreten von diabetischen Makro-, Mikro- und Polyneuropathien entstehen weitreichende pathologische Konsequenzen für den betroffenen Patienten.



**Abbildung 1:** Effekte des Insulins auf zellulärer Ebene. Diese Effekte kommen vor allem in Insulin-sensitiven Geweben wie Muskel, Fett und Leber vor. (In Anlehnung an Löffler, 1999).

Eine frühzeitige Diagnose, d. h. vor Auftreten von Symptomen, hat eine entscheidende Bedeutung. Hierdurch können die durch den Diabetes mellitus hervorgerufenen Sekundärkomplikationen und die damit assoziierte Morbidität und Mortalität vermindert werden. Die Problematik besteht darin, dass die Krankheit im symptomlosen Stadium erfasst werden muss. Deshalb müssen

Screening-Untersuchungen, vor allem bei Patienten mit eventuellen Risikokriterien (Adipositas, Verwandter 1. Grades mit Typ 1 Diabetes, Gestationsdiabetes, Hypertriglyzeridämie und erhöhter Blutdruck), engmaschiger vorgenommen werden.

Die Therapieprinzipien bestehen zunächst aus Gewichtsreduktion und verstärkter körperlicher Betätigung. Des Weiteren wird die Stoffwechseleinstellung kontrolliert, indem der Blutzuckerspiegel medikamentös normalisiert wird. Häufig angewandte orale Antidiabetika wirken z. B.: Über eine Steigerung der Insulinsekretion aus den  $\beta$ -Zellen (Sulfonylharnstoffe), über eine Verminderung der hepatischen Glukoneogenese (Biguanide) (Stumvoll et al., 1995) und über eine verzögerte intestinale Glukoseaufnahme durch Inhibitoren der intestinalen  $\alpha$ -Glukosidase (Acarbose) (Aguilar-Bryan et al., 1995; Coniff et al., 1995). Bei den meisten Typ 2 Diabetikern kommt es im Verlauf der Erkrankung zu einer progredienten Erschöpfung der  $\beta$ -Zellfunktion des Pankreas. Dadurch kommt es zu einem sekundären Versagen der oralen Antidiabetika. Da jetzt ein absoluter Insulinmangel vorliegt, muss Insulin exogen substituiert werden. Der größte Teil der Diabetesfälle kann den oben genannten Typ 1 und dem Typ 2 Diabetes zugeordnet werden. Die dritte, inhomogene Gruppe subsumiert z.B. genetische Defekte der  $\beta$ -Zellfunktion, genetische Defekte bei der Insulinaktion, Erkrankungen des endokrinen Pankreas, Endokrinopathien, Infektionen und andere spezifische Diabetestypen. Als vierte Gruppe wird der Gestationsdiabetes angesehen (Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2005). Darüber hinaus sei noch kurz das Metabolische Syndrom (engl.: „syndrome X“) erwähnt. Der Begriff des Metabolischen Syndroms beschreibt das gemeinsame Auftreten mehrerer Störungen. Die Hauptmerkmale sind abdominelle Adipositas, Dyslipoproteinämie (Hypertriglyzeridämie, niedriges HDL-Cholesterin), essentielle Hypertonie und Glukoseintoleranz/Typ 2 Diabetes. Weitere Störungen können Hyperurikämie/Gicht, gestörte Fibrinolyse und Hyperandrogenämie bei Frauen sein. Die Diagnose Metabolisches Syndrom sollte nur dann verwendet werden, wenn mindestens drei der vier Hauptmerkmale vorliegen (Thieme, 1999). Die periphere Insulinresistenz wird hier als zentrale Stoffwechselstörung und vermutliche pathogenetische Ursache verantwortlich gemacht. Neuere

Untersuchungen zeigten, dass die abdominelle Adipositas ebenfalls als Ursache in Betracht zu ziehen ist (Kompendium Diabetologie, 1999).

### **1.2. Molekulare Mechanismen der Insulinwirkung auf zellulärer/intrazellulärer Ebene**

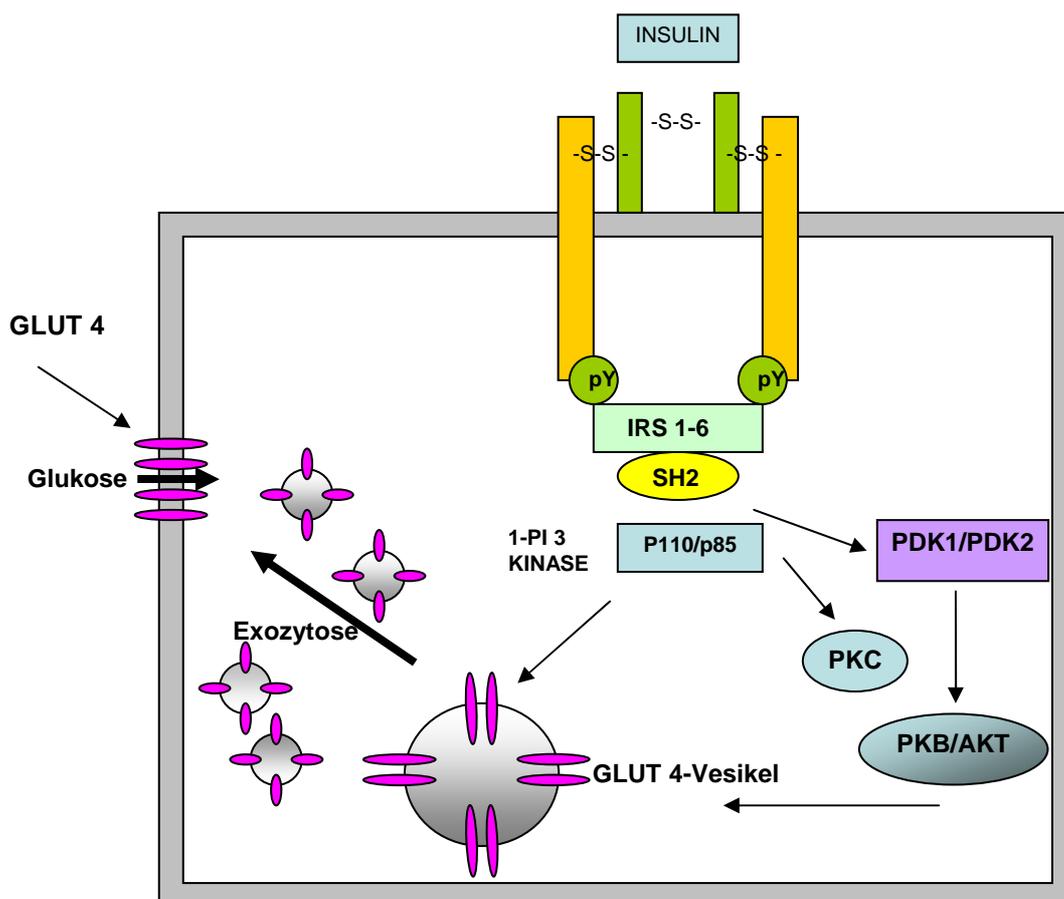
Wie oben bereits erwähnt, wird der Insulinresistenz der Zielorgane eine tragende Rolle in der Ätiopathogenese des Diabetes mellitus Typ 2 zugeschrieben. Zum besseren Verständnis der „Volkskrankheit“ Diabetes mellitus und um gegebenenfalls Prophylaxen bzw. Therapien verbessern zu können sind Kenntnisse und Forschung im Bereich der molekularen Mechanismen der Insulinaktion notwendig. Das Verständnis und das Wissen der Insulinwirkung auf zellulärer Ebene haben sich in den letzten Jahren entscheidend vertieft (Foster & Klip, 2000; Elmendorf & Pessin, 1999; Holman & Kasuga, 1997; Rea & James, 1997; Kandrör & Pilch, 1996; White & Kahn, 1994). Das Insulinsignaling in den Zielgeweben führt zu einer großen Anzahl von biologischen Reaktionen. Die Ereignisse sind essentiell für normales Wachstum und Entwicklung und für die normale Homöostase des Glukose-, Fett- und Proteinmetabolismus (Zick, 2004). Das Polypeptidhormon Insulin (5,8 kDa), bestehend aus 51 Aminosäuren, wurde im Jahre 1921 von Banting und Best (Bliss, 1982) entdeckt. Insulin wird durch die  $\beta$ -Zellen der Langerhans-Inseln der Bauchspeicheldrüse sezerniert. Es wirkt über die Bindung an spezifische Rezeptoren auf der Plasmamembran der Zielzellen (Docherty und Steiner, 1997). Die A- und B-Ketten des Insulins sind durch zwei Disulfidbrücken verbunden. Die Struktur der A-Kette wird durch eine weitere Disulfidbrücke stabilisiert. Die Biosynthese findet ebenfalls in den  $\beta$ -Zellen statt. Das Insulin entsteht aus einem einsträngigen Präkursormolekül, dem Präproinsulin. Präproinsulin besteht, vom N-Terminus an gerechnet, aus einer Signalsequenz, an die sich die 30 Aminosäuren der B-Kette anschließen. Die letzten 21 Aminosäuren bis zum Carboxy-Terminus bilden die Signalsequenz der A-Kette. Das in der Mitte liegende Stück besteht je nach Spezies aus 30-35 Aminosäuren und wird als C-Peptid bezeichnet. Die Signalsequenz vermittelt

den Transfer des Proteins vom Ort der Biosynthese im Zytosol in die sekretorischen Granula des Golgi-Apparates. Nach der Abspaltung der Signalsequenz entsteht die inaktive Vorstufe, das Proinsulin. Das Proinsulin wird in die cis-Region des Golgi-Apparates transportiert. Dort erfolgt eine Abspaltung des C-Peptids (engl.: connecting peptide) durch die Proinsulin-Konvertasen (PC2, PC3/PC1). Dieses native Insulin wird in Gegenwart von Zink in Form von hexameren Kristallen, von dem C-Peptid, von geringen Mengen an Proinsulin und von anderen intermediären Spaltprodukten in den Sekretgranula ( $\beta$ -Granula) des Golgi-Apparates gespeichert (Docherty & Steiner, 1997; Lomedico et al., 1977; Chan et al., 1976). Postprandial wird Insulin, getriggert durch den gesteigerten Blutglukosespiegel im extrazellulären Raum, vermehrt aus den  $\beta$ -Zellen des Pankreas freigesetzt. Es bindet an die transmembranös gelegenen Insulinrezeptoren. Bei den Hauptzielorganen des Insulins handelt es sich um Leber-, Muskel- und Fettgewebe. In der Leber wird die Glukoseproduktion durch Insulin herabgesetzt und die Fettsyntheserate erhöht. Gleichzeitig wird die Glukoseaufnahme in die Muskel-/Fettzellen stimuliert und die Freisetzung von Fettsäuren sinkt (Pessin & Saltiel, 2000). Eine weitere wichtige Funktion des Insulins besteht in der Gewährleistung der Regulation von Zellwachstum und Proliferation. Dies wird durch eine Aktivierung der Transkription von Genen, die eine große Bedeutung für Kontrolle und Ablauf des Zellzyklus haben, gesteuert (Straus, 1989). Der Insulinrezeptor und der strukturell homologe IGF-I Rezeptor (Insulin-like Growth Factor-I receptor) kommen in nahezu allen Geweben vor. Die Verteilung der Häufigkeit ist in den verschiedenen Geweben unterschiedlich. Sie gehören zur Familie der Rezeptortyrosinkinassen mit intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität und koppeln über eine Liganden-vermittelte Aktivierung das extrazelluläre Signal an gemeinsame intrazelluläre Signalkaskaden (White, 1997; LeRoith et al., 1995). Der 1972 aus Ratten Lebergewebe chromatographisch gereinigte Insulinrezeptor (Cuatrecasas, 1972) ist ein tetrameres Transmembranprotein ( $\alpha_2/\beta_2$ ) mit Tyrosinkinaseaktivität. Er besteht aus zwei extrazellulären 135 kDa  $\alpha$ -Ketten mit 723 Aminosäuren und zwei Membran-durchspannenden 95 kDa  $\beta$ -Untereinheiten mit 620 Aminosäuren. Die Ketten sind durch Disulfidbrücken kovalent miteinander verbunden. Die Untereinheiten stammen aus einem Gen.

Sie entstehen durch proteolytische Spaltung der Pro-Rezeptoren, bei denen sich eine 50 %ige Sequenzhomologie nachweisen lässt (Ullrich et al., 1986; Ullrich et al., 1985). Für die Ligand-induzierte Aktivierung des Rezeptors, die nach einem allosterischen Mechanismus verläuft, ist die native  $(\alpha/\beta)_2$  Struktur essentiell (Frattali et al., 1992; Treadway et al., 1991). Der Insulinrezeptor wird in Form von zwei verschiedenen mRNA Isoformen exprimiert. Diese leiten sich durch den Vorgang des alternativen Spleißens ab, Insulinrezeptor A (Exon 11-) und Insulinrezeptor B (Exon 11+) (Serrano et al.; 2005). Die Isoformen sollen verschiedene funktionelle Eigenschaften haben. Der IR-A verfügt über eine höhere Insulinaffinität und über eine höhere Internalisierungsrate als der IR-B (Vogt et al., 1991; Yamaguchi et al., 1991). Die Verteilung der beiden Isoformen ist in den verschiedenen Geweben unterschiedlich. In einer Studie an verschiedenen Geweben der Ratte konnte gezeigt werden, dass der IR-A vorwiegend in Skelettmuskulatur vorkommt und der IR-B überwiegend in Leber nachweisbar ist. In epidymalem weißem Fettgewebe, in braunem Fettgewebe und in Nierenzellen kommen beide vor, allerdings dominiert der IR-B. Im Herzen ist die Expression ungefähr gleich (Serrano et al., 2005). Die hochaffine und sehr spezifische Bindung des Insulins an die  $\alpha$ -Untereinheit des Rezeptors induziert eine Konformationsänderung. Diese bewirkt die Tyrosin-Autophosphorylierung und somit die Aktivierung der auf den  $\beta$ -Untereinheiten lokalisierten Tyrosinkinassen (Lee et al., 1993; Avruch et., 1982; Massague et al., 1982). Der Aktivierung der Tyrosinkinassen folgt die Phosphorylierung intrazellulärer Substrate. Somit wird die Insulinkaskade in Gang gesetzt, aus der letztlich die Aufnahme der extrazellulären Glukose resultiert (Kellerer et al., 1999; Taha et al., 1999). Das macht die Bindung von Insulin an den Rezeptor zu einem zentralen Schritt in der Signalkaskade. Die erwähnten Substrate entsprechen Proteinen. Es sind endogene Substrate der Insulinrezeptor-Tyrosinkinassen, die in Insulin-sensitiven Geweben wie Muskel, Fettgewebe und Leber identifiziert wurden. Über sie wird das Insulinsignal an verschiedene Kaskaden gekoppelt, die dann auf Stoffwechsel, Gegenregulation und Expression Einfluss nehmen. Bei den bisher identifizierten Proteinen handelt es sich um die Familie der Insulinrezeptorsubstrate (IRS-1 bis IRS-6), Shc-Proteinisoformen (src-homologes Kollagen Protein), Mitglieder der SIRP-

Familie, Gab-1 und APS. IRS-1 und IRS-2 sind die bislang am besten funktionell und strukturell charakterisierten Proteine (Übersichtsartikel: Yenush & White, 1997; Meyers & White, 1996). Die Insulinrezeptorsubstrate weisen charakteristische Merkmale in ihrer Grundstruktur auf, dazu gehören unter anderem Serin-/Threonin-reiche Regionen. In ihrem aminoterminalen Bereich besitzen sie eine so genannte Pleckstrin-homologe Domäne (PH-Domäne) und/oder eine Phosphotyrosin-Bindedomäne (PTB-Domäne). Im carboxyterminalen Bereich dieser Proteine gibt es Tyrosinreste, die als SH2-Bindungsstellen für nachgeschaltete Proteine dienen. Der aktivierte Insulinrezeptor interagiert mit IRS über seine PTB-Domäne, was zur Phosphorylierung von Tyrosinresten innerhalb des IRS- Moleküls führt. Durch zahlreiche Untersuchungen konnte belegt werden, dass die Aktivierung von Isoformen der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI 3-Kinase) einen essentiellen Vorgang in der Weiterleitung des Insulinsignals darstellt (Eckel et al., 2000; Shepherd et al., 1998; Backer et al., 1992). Die Insulin-sensitive Klasse 1-PI 3-Kinase ist ein intrazellulärer Signalmediator. Er besteht aus zwei Untereinheiten, der katalytischen p110-Untereinheit und der regulatorischen p85-Untereinheit (Dhand et al., 1994; Hu et al., 1993). Die p85-Untereinheit beinhaltet die etwa 100 Aminosäuren große SH2-Domäne (src-Homologie-2 Domäne). Die SH2-Domäne geht mit dem Tyrosin-phosphorylierten Motiv des IRS- Proteins eine Verbindung ein. Dies führt zur katalytischen Aktivierung der p110-Untereinheit. Die PI 3-Kinase katalysiert die Umsetzung von seinem physiologisch bedeutendsten Substrat, Phosphatidylinositol 4,5-Biphosphat, in Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphat (Vollenweider et al., 1999; Alessi & Downes, 1998). Von den beiden PI 3-Kinase-Untereinheiten wurden bisher jeweils drei Gewebe-spezifisch exprimierte Klassen beschrieben: p110 $\alpha$ ,- $\beta$ ,- $\delta$ , bzw. p85 $\alpha$ ,- $\beta$ ,- $\gamma$ . (Alessi & Downes, 1998; Shepered et al., 1998). Einigen Studien zur Folge soll p110 $\beta$  eine wichtige Rolle in der Weiterleitung des Insulinsignals zur Steigerung der Glukoseaufnahme spielen (Wang et al., 1998; Ozanne et al., 1997). Der PI 3-Kinase sind innerhalb der Insulinwirkung weitere Effektorproteine nachgeschaltet, die auch durch Phosphorylierung aktiviert werden (Kellerer et al., 1999; Alessi & Downes, 1998). Bei den bisher identifizierten Proteinen handelt es sich um die Serin-Threonin-Kinase Akt

(auch Proteinkinase B) (Wang et al., 1999), die Isoformen PDK1 und PDK 2 der PDK-Familie (Phospholipid-abhängige Kinase) (Kellerer et al., 1999) und die atypischen Isoformen der PKC-Familie (Proteinkinase C) PKC $\lambda$  und PKC $\zeta$ . Die funktionelle Bedeutung der Aktivierung der genannten Kinasen ist bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht hinreichend bekannt. Der MAP-Kinase-Weg (mitogen aktivierte Proteinkinase) wird durch IRS-abhängige Aktivierung von Grb2, einem SH2-domänehaltigem Protein, in Gang gesetzt. Einige Untersuchungen weisen daraufhin, dass eine zentrale Funktion des MAP-Kinase-Weges die Aktivierung der Genexpression ist. Diese wird über die Phosphorylierung verschiedener Transkriptionsfaktoren vermittelt (Übersichtsartikel: Blenis, 1993; Cobb & Goldsmith, 1995; Seger & Krebs, 1995). Obwohl der MAP-Kinase-Weg eine gut charakterisierte Kaskade ist, ist er nicht besonders Insulin-sensitiv und scheint nur für einen kleinen Teil des metabolischen Effekts des Insulins verantwortlich zu sein (Taha & Klip, 1999).



**Abbildung 2:** Insulintransduktion und Glukoseaufnahme (in Anlehnung an Kellerer et al., 1999 und Promotionsarbeit O.Dransfeld, 2001).

Unter normalen physiologischen Bedingungen stellt die Glukoseaufnahme durch die Plasmamembran den Geschwindigkeits-bestimmenden Schritt der zellulären Glukosenutzung dar (Furler et al., 1991; Ziel et al., 1988). Sie wird dadurch zu einem wichtigen Angriffspunkt in der Regulation des Glukosestoffwechsels (Clausen, 1975; Morgan et al., 1961). Der Glukosetransport durch die Plasmamembran wird bei Säugetieren durch eine Familie von Transportproteinen (Glukosetransporter, GLUT) koordiniert. Sie sind mit Hilfe von 12 Transmembranhelices in der Plasmamembran verankert und haben intrazellulär befestigte Amino- und Carboxy-termini. Durch Glukosetransporter gelangt Glukose (und andere Zucker) entlang ihres Konzentrationsgradienten, durch erleichterte Diffusion, in die Zelle (Gould & Holman, 1993; Gould & Bell, 1990). Der erste Glukosetransporter, der isoliert werden konnte (GLUT1), wurde aus der HepG2-Zelllinie geklont (Mueckler et al., 1985). Im Verlaufe der Jahre wurden immer mehr Mitglieder der GLUT-Familie beschrieben. Bisher konnten dreizehn Isoformen GLUT1-12 und HMIT ( $H^+$ -coupled myo-inositol transporters) beschrieben werden (Joost et al., 2002; Rogers et al., 2002; Wu et al., 2002; Doege et al., 2001; McVie-Wylie et al., 2001; Doege et al., 2000a; Doege et al., 2000b; Zierler, 1999; Gould & Holman, 1993; Gould & Bell, 1990). Die Benennung der Glukosetransporter erfolgte nach der Reihenfolge ihrer Entdeckung. Die einzelnen Isoformen weisen eine Übereinstimmung der Aminosäuresequenz von 28-65 % auf (Wood & Trayhurn, 2003). Sequenzvergleiche aller Mitglieder zeigen die Präsenz von zahlreichen Glycin- und Tryptophan-Anteilen (Joost & Thorens, 2001). Diese Anteile werden generell als essentiell für die erleichterte Diffusion angesehen. Basierend auf der Übereinstimmung einiger Sequenzmotive wurden die Glukosetransporter in drei Unterklassen (I-III) eingeteilt (Joost & Thorens, 2001). Klasse I beinhaltet GLUT1-4, in Klasse II werden GLUT5, GLUT7, GLUT9 und GLUT11 eingeteilt und zu Klasse III zählen GLUT6, GLUT8, GLUT10, GLUT12 und HMIT.

In den wichtigsten Insulin-sensitiven Geweben (Fettgewebe, Herz- und Skelettmuskel) (Foster & Klip, 2000; Martin et al., 1999; DeFronzo et al., 1981) wurden bisher: GLUT1, GLUT3, GLUT4, GLUT5, GLUT8, GLUT10, GLUT11, GLUT12 und HMIT (Joost & Thorens, 2001) nachgewiesen. Als Insulin-sensitiv gelten GLUT4, GLUT8 (nur in Blastozysten) (Gaster et al., 2003) und GLUT12.

In diesen Geweben spielten in den letzten Jahren vor allem zwei Glukosetransporter eine wichtige Rolle. Zum einen, der für die basale Glukoseaufnahme verantwortliche GLUT1 und zum anderen, der in diesen Zellen vorherrschende, Insulin-sensitive und für Glukose hochaffine GLUT4 (James et al., 1988). GLUT1 ist im basalen Zustand verstärkt in der Plasmamembran lokalisiert (Gould & Bell, 1990). Es erfolgt keine ausgeprägte intrazelluläre Umverteilung als Antwort auf einen Insulinstimulus. Beim GLUT4 beeinflusst Insulin sowohl die metabolische Regulation als auch die Expression des Glukosetransporters. Nach Stimulation der Zelle mit Insulin wird der im Basalzustand in einem intrazellulären Trans-Golgi Vesikelpool lokalisierte GLUT4 an die Plasmamembran transloziert (Bryant et al., 2002; Martin et al., 1999; Zorzano et al., 1998 Cushman et al., 1980). Dieser Prozess wurde auch bei kardialem Gewebe untersucht und beschrieben (Dransfeld et al., 2000; Fischer et al., 1997). An der Plasmamembran kommt es zusätzlich durch eine bisher unbekannte Modifikation zu einer Steigerung der intrinsischen Aktivität des Transporters (Kuroda et al., 1987).

### **1.3. Periphere Insulinresistenz der Muskulatur als initiales Ereignis in der Pathogenese des Typ 2 Diabetes**

Die Muskulatur nimmt unbestritten eine zentrale Rolle in der Glukosehomöostase ein. Unter Betrachtung dieses Aspektes wird die Insulinresistenz der Zellen als ein initiales Ereignis in der Pathogenese des Typ 2 Diabetes angesehen (Groop, 1999; DeFronzo, 1988). Die Insulinresistenz kann zunächst durch eine erhöhte Insulinsekretion kompensiert werden. Wenn die daraus resultierende Hyperinsulinämie nicht mehr aufrechterhalten werden kann, folgt daraus ein mangelnder, postprandialer Uptake von Glukose in die Zielzelle. Das führt zu einer extrazellulären Hyperglykämie. Eine der wichtigsten Folgen dieser Insulinresistenz ist eine deutliche Reduktion der Insulin-stimulierten Glukoseaufnahme in den Skelettmuskeln (Sherman et al., 1988) und in den Herzmuskel (Eckel et al., 1985). Als Ursache werden, wie oben erläutert, verschiedene Aspekte diskutiert. Die Aktivierung der Tyrosinkinase

des Insulinrezeptors stellt einen absolut notwendigen Schritt der Signalkaskade dar. Mutationen im Bereich der Tyrosinphosphorylierung (Lys 1018, Met 1153) können bei folgenden Vorgängen zu Störungen führen: Bei der Wirkung des Insulins auf den Glukosetransport, bei der Glykogensynthese oder bei der Stimulierung der Proliferation von Gefäßzellen (Holman & Kasuga 1997; Klarlund et al., 1997). Diese Beeinträchtigungen können vermutlich zu einer Hyperglykämie beitragen oder sie auslösen. Für Untersuchungen und Versuche auf zellulärer Ebene sind Muskelzellsysteme gut geeignet. Dementsprechend kommt ihnen eine große Bedeutung bei der Analysierung der Insulinwirkung auf molekularem Niveau zu. Die meisten der zurzeit zur Verfügung stehenden Muskelzelllinien zeigen ein geringes Ansprechen auf Insulin. Es sind in den vergangenen Jahren verschiedene Muskelzelllinien verwendet worden, wie z. B. L6, C2C12 und G8 als Skelettmuskelzellen, welche im Laufe der Differenzierung zu multinukleären Myotuben fusionieren. Von den L6-Zellen konnte in mehreren Studien belegt werden, dass sie GLUT4 exprimieren (Koivisto et al., 1991; Mitsumoto et al., 1991). Das Gleiche gilt für die Adipozytenzelllinie 3T3 (Piper et al., 1991). Als Modell für Herzmuskelzellen, dem dritten Insulin-sensitiven Gewebe, steht die H9c2-Zelllinie zur Verfügung. Sie wird aus embryonalen Rattenherzen gewonnen. Die H9c2-Zellen weisen trotz ihres kardialen Ursprungs einige Skelettmuskel-typische Merkmale auf. Dazu gehören, dass die mononukleären Myoblasten nach 7-8 Tagen Zellkulturwachstum zu multinukleären Myotuben fusionieren (Kutscher, 1993). Es konnten aber auch Herzmuskel-spezifische Merkmale gezeigt werden (Hescheler et al., 1991; Sipido & Marban, 1991). Hierzu zählt man die für Herzmuskel typischen spannungsabhängigen  $Ca^{2+}$ -Kanäle vom L-Typ mit Kinetiken und  $\beta$ -adrenerger Sensitivität, ähnlich der Kardiomyozyten. Unsere Arbeitsgruppe verfügt über langjährige Erfahrung mit der Herzmuskelzelllinie H9c2. Sie hat sich als Transfektions-fähiges und gut zu kultivierendes Zellsystem bewährt. Es konnten bereits verschiedene GLUT4 überexprimierende Klone etabliert werden (Dransfeld et al., 2000). Ein Nachteil dieser Zelllinie ist, dass der Insulinrezeptor nur gering, der IGF-I Rezeptor (insulin-like growth factor-I receptor) im Gegensatz dazu stark exprimiert wird (Bähr et al., 1996).

#### **1.4. Ziel dieser Arbeit**

Die Insulinresistenz in der Muskulatur wird weitläufig als initiales Ereignis in der Ätiopathogenese des Typ 2 Diabetes betrachtet. Aus diesem Grund ist die Forschung mit Muskelzellsystemen zur Untersuchung der Insulinsensitivität und der Insulinresistenz von großer Bedeutung.

Die primäre Zielsetzung dieser Arbeit war, aus dem kardialen Herzmuskelsystem H9c2 Subklone mit stabiler Überexpression des Insulinrezeptors zu etablieren. Wie sich durch die langjährige Erfahrung mit dieser Zelllinie in unserer Arbeitsgruppe bereits zeigte, handelt es sich um rasch wachsende und widerstandsfähige Zellen. Ein weiterer Vorteil ist der relativ niedrige Kostenaufwand. Aus diesem Grund eignen sich diese Zellen für Routineuntersuchungen und Charakterisierung besonders gut. Diese Voraussetzungen konnten als gute Grundlage für die nachfolgenden Versuche betrachtet werden.

Die H9c2-Zellen wurden mit dem für den humanen Insulinrezeptor kodierenden pML Vektor transfiziert. Nach der erfolgreichen Etablierung der Klone wurden die weiteren Ziele für diese Arbeit festgelegt.

Zuerst sollte auf molekularbiologischer Ebene gezeigt werden, ob sich nach der Klonierung eine vermehrte Insulinrezeptorexpression nachweisen lässt.

Eine weitere wichtige Zielsetzung war die Auswirkung der Transfektion des Insulinrezeptors auf die Expression des IGF-I (Insulin-like Growth Factor-I), den GLUT1 und/oder den GLUT4. Die Untersuchungen erfolgten mittels Western Blot-Analyse.

Zuletzt galt es herauszufinden, ob sich die Glukoseaufnahme der Klone, im Vergleich zu den nur gering Insulin-sensitiven H9c-Zellen, nach Insulinstimulation ändern würde und so ein neues, Insulin-sensitives Zellsystem zur Verfügung stehen würde.

## 2. Material

### 2.1. Verbrauchsmaterial

Applikationsplättchen für Polyacrylamidgele	Pharmacia, Freiburg
Blotmembran, PVDF	Millipore
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Chemilumineszenzsubstrat	Pierce, Hamburg
Einfrierbox für Kryoröhrchen	Nalgene, Hamburg
Elektrophoresekammer (LKB 2117 Multiphor II)	Amersham, Pharmacia
Excel-Gel SDS (Homogen 7, 5 % & gradient 8-18)	Amersham, Pharmacia
Faltenfilter	Schleicher & Schüll, Kassel
Filterpapier	Munktell
Film-Remover	Amersham, Pharmacia
Gewebekulturplatten (6 Vertiefungen, 96 Vertiefungen)	Falcon, Essen
Kryo-Einfrierröhrchen (1,8ml)	Falcon, Essen
LUMI-Imager mit LUMI-Analyst-Software	Boehringer, Mannheim
Plastikküvetten	Sarstedt, Karlsruhe
Pufferstreifen	Amersham, Pharmacia
Schraubröhrchen (15 & 50ml)	Falcon, Essen
Serologische Pipetten, steril (1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml & 50 ml)	Falcon, Essen
Szintillationszähler (LS 6000 IC)	Beckman
T-ease-Programm	ISI, USA
Western Blot Recycling Kit	Biotrend, Köln
Zellkulturschalen	Falcon, Essen
Zellschaber	Falcon, Essen

## 2.2. Radioisotope

L-[1-14 C]-Glucose

Spezifische Aktivität      55mCi/mmol      Amersham, Braunschweig

2-Desoxy-D-[1-14 C]-Glucose

Spezifische Aktivität      55mCi/mmol      Amersham, Braunschweig

## 2.3. Insuline

<sup>125</sup>I-Humaninsulin

(363mCi/mg)

Aventis, Frankfurt a.M.

Humaninsulin

CHR 1799

Aventis, Frankfurt a. M.

Insulin vom Schwein

Novo Nordisk, Mainz

## 2.4. Antikörper

GLUT1-Antiserum

polyklonales      Kaninchen-  
Antiserum,  
Prof. Sasson (Sasson et al.,  
1997)

GLUT4-Antiserum

SA 1680

Eurogenetec

IGF-I Rezeptor

(Alpha-subunit)

Biomol

IR-β Rezeptor,

Monoklonaler Antikörper

Oncogene

Sekundäre Antikörper

(Anti-Huhn, anti-Maus, anti-Kaninchen,

anti- Ziege)

Promega, USA

## **2.5. Zellsysteme**

H9c2-Zelllinie

(Kardiomyozyten der Ratte)

American Type Culture  
Collection,  
Maryland, USA

E2-Subklone (und andere  
Subklone) aus H9c2-Zellen

siehe H9c2-Zellen + transfizierter  
EV-IR Vektor

## **2.6. Expressionsvektor**

PML Vektor zur Trans-  
fektion von HIR-cDNA

Dr. Margriet Ouwens  
Leiden, Niederlande

## **2.7. Kulturmedien**

für die H9c2-Zellen

Kulturmedium (serumhaltig)

- DMEM (1000mg/l D-Glukose  
mit L-Glutamin,  
Natriumpyruvat, 25mM  
HEPES)
- Nichtessentielle Aminosäuren  
(1 %)
- Penicillin-Streptomycin-  
Lösung (500 U/500 µg/ml)
- FCS (10 % [v/v])

für die H9c2- Subklone

Kulturmedium (serumhaltig)  
gleiche Zusammensetzung  
wie oben, Zusatz von Geneticin  
(G418: 200 µg/ml)

## 2.8. Molekularstandards

Broad Range (Proteinmarker)	Biolabs, New England
HMW (53-212 kDa)	Pharmacia, England
LMW (14-94 kDa)	Pharmacia, England
Prestained (Proteinmarker)	Biolabs, New England

## 2.9. Chemikalien

Aquasafe 300 plus	Zinsser Analytic
Bio-Rad-Proteintest	Bio-Rad, München
BSA: Rinderserum Albumin, reinst	Behring, Marburg
Color Marker	Sigma, München
Cytochalasin B	Sigma, München
DMEM	Gibco, Berlin
DMSO	Gibco, Berlin
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
FCS	Gibco, Berlin
„Indian Ink“-Tinte	Pelikan
KCL	Merck, Darmstadt
Laemmli-Probenpuffer	Laemmli
Methanol	Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Neuform, Fink GmbH, Herrenberg
Natronlauge	Merck, Darmstadt
PBS, steril	Gibco, Berlin
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Berlin
Proteinnachweisreagenz	Biorad, München
Protease-Inhibitor Complete™-Tabletten	Boehringer, Mannheim
Rinderserumalbumin, Fraktion V	Behring, Marburg

Salzsäure 37 %, rauchend (HCL)	Merck, Darmstadt
Supersignal <sup>®</sup> -Peroxid-Substratlösung	Pierce, USA
Supersignal <sup>®</sup> -Luminol-Verstärkerlösung	Pierce, USA
Trypanblaulösung	Sigma, Berlin
Trypsin, EDTA	Gibco, Berlin
Tween 20	Biorad, München

### 3. Methoden

#### 3.1. Kultivierung von H9c2-Zellen

Die in Stickstoff gelagerte Zellsuspension wurde in einem 37 °C Wasserbad aufgetaut und im Anschluss in eine 10 cm<sup>2</sup> Petrischale gegeben. Darin befindet sich auf 37 °C vorgewärmtes Medium. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und einer Atmosphäre von 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank (Heraeus, Hanau). Um DMSO-Reste zu entfernen wurde nach 24 Stunden das Medium gewechselt (weitere Mediumwechsel alle 3-4 Tage).

Nach dem Absaugen des Kulturmediums wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung in die Kulturschale gegeben. Die Schale wurde auf einer 37 °C warmen Heizplatte abgestellt, bis sich nach wenigen Minuten alle Zellen ablösten. Nach Inhibierung des Trypsins durch 7 ml Kulturmedium wurde die Zellsuspension umgehend in ein steriles Zentrifugationsröhrchen überführt und für 10 Minuten bei 800 rpm und 37 °C abzentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde nun mit 5 ml Medium aufgenommen und sorgfältig resuspendiert. Nach der Zellzählung in einer Neubauer Zählkammer wurde eine geeignete Zellzahl in einer neuen Petrischale ausgesät und diese mit 10 ml vorgewärmten Kulturmedium gefüllt. Die Zellen wurden analog zum Tryponieren eingefroren, jedoch wurden hier die Zellen nach dem Abzentrifugieren in Normalmedium +10% DMSO resuspendiert. Die Zellsuspension ( Zelldichte 1-1,5 x10<sup>6</sup>) wurde in Kryoröhrchen aliquotiert. Um die Zellen nicht durch Kristallbildung zu gefährden, wurde eine Temperaturabnahme von 1 °C pro Minute gewählt (Kryoeinfriergerät von Nalgene).

Am nächsten Tag wurden die Zellen langfristig in flüssigem Stickstoff gelagert.

#### 3.2. Solubilisierung der Zellen

Zur Solubilisierung wurden adhärenente Zellen verwendet. Diese wurden zuerst zweimal mit eiskaltem, sterilem PBS-Puffer gewaschen. Nachdem die Pufferflüssigkeit abgesaugt war, wurden die Schalen auf Eis gelegt. Jede

Zellschale wurde mit 1 ml eiskaltem, modifiziertem RIPA-Puffer (150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 % (v/v) NP-40; 0,25 % (w/v) Na-deoxycholat; 1 mM PMSF Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>; 1 mM NaF; Protease- Inhibitor Complete TM –Tabletten (Boehringer, Mannheim); 50 mM Tris/HCl; pH 7,4) versetzt. Nach 15minütiger Einwirkzeit wurden die Zellen mit einem Zellschaber (Falcon, Essen) vollständig von der Oberfläche der Kulturschalen abgekratzt und in ein Eppendorf Gefäß überführt. Durch die nun folgende zweistündige Inkubation der gewonnenen Zellsuspension bei 4 °C in einem Überkopfschüttler wurde n die Zellen durch die im RIPA-Puffer enthaltenen Detergenzien solubilisiert. Zur Abtrennung unlöslicher Bestandteile erfolgte eine 30minütige Zentrifugation bei 4 °C und 15000 rpm. Das Pellet wurde verworfen. Der klare Überstand wurde zur weiteren Verwendung in Eppendorf Gefäße aliquotiert und bei -70 °C gelagert.

### **3.3. Transfektion**

Unter Transfektion versteht man ein Verfahren, bei dem DNA von Mikroorganismen oder Eukaryonten in Zellen eingeschleust wird. Man spricht von stabiler Transfektion, wenn das eingeschleuste Fremdgen im Organismus persistiert. Ihr gegenüber steht die transiente Transfektion, bei der die Gene nur vorübergehend aktiv bleiben, da das Fremdgen nicht in dem Organismus persistiert.

Die H9c2-Zellen wurden in der 19. Passage mit dem für den humanen Insulinrezeptor codierenden Vektor pML (Leiden, Niederlande) transfiziert. Die Zelltransfektion erfolgte mit Hilfe der Kalziumphosphatmethode.

Dabei wurden pro 10 cm Petrischale 20 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Im Anschluss wurden die Zellen über Nacht bei 35 °C und 3 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen zweimal mit 5 ml PBS (37 °C) gewaschen und mit Normalmedium bedeckt, um dann bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert zu werden. 60 Stunden nach der Transfektion wurde das Normalmedium durch das Selektionsmedium (900 µg/ml Geneticin) ersetzt.

Hierdurch erfolgte die Selektion auf stabil transfizierten Mischklon-Kolonien. Nach ungefähr 3 Wochen wurden die Zellen abgelöst und auf 10 Zellen/ml verdünnt. Mit 100 µl dieser Zellsuspension wurden 96-Well Zellkulturplatten

bestückt und mit 200 µl Selektionsmedium aufgefüllt. Die Zellklone wurden täglich mikroskopisch kontrolliert. Als sie eine Zellstärke von ca. 500 Zellen erreichten, wurden sie abgelöst auf eine 6-Well-Platte ausgesät. Nach dem Heranwachsen wurden die Zellen auf 10 cm Petrischalen transferiert. Die Geneticinkonzentration im Medium wurde auf 600 µg/ml verringert.

### **3.4. Proteinbestimmung**

Die Proteinbestimmung der Proben wurde mit dem auf Bradford (Bradford, 1976) beruhenden Bio-Rad-Proteintest (Bio-Rad, München) durchgeführt.

Die Lysate und die Standard-Proteinlösung (1 mg/ml) aus Rinderserumalbumin (Reinst, Behring) wurden in H<sub>2</sub>O dest. aufgenommen (800 µl total). Die Inkubationszeit betrug ca. 10 min und dann wurde die Extinktion bei  $\lambda=595$  nm gemessen, um dann die daraus resultierende Proteinkonzentration zu berechnen.

### **3.5. Gelelektrophorese**

Um die Proteine aufzutrennen, wurden 0,5 mm dicke, diskontinuierliche, foliengebundene SDS-Polyacrylamid-Gele (Excel Gel SDS Gradient 8-18 %, Amersham Pharmacia) verwendet. Excel-Pufferstreifen (Anode: 0,3 M Tris/Acetat; 0,4 % (w/v) SDS; pH 6,4. Kathode: 0,08 M Tris; 0,8 M Tricin; 0,4 % (w/v) SDS; pH 7,1) von Amersham Pharmacia wurden als Puffer benutzt. Den Proben wurde modifizierter 4 x Laemmli-Probenpuffer (40 % (v/v) Glycerin; 8 % (w/v) SDS; 0,02 % (w/v) Bromphenolblau; 10 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol; 250 mM Tris; pH 6,8) hinzu gegeben und für 10 Minuten bei 95 °C in einem Thermoblock denaturiert (Laemmli, 1970). Danach wurden die Proben kurz auf Eis abgekühlt und dann abzentrifugiert. Die Proben wurden auf Applikationsplättchen für Polyacrylamidgele (Pharmacia, Freiburg) aufgetragen. Im Anschluss erfolgte die Elektrophorese in einer Horizontal-Elektrophoresekammer (LKB 2117 Multiphor II, Amersham Pharmacia, Freiburg) bei einer Temperatur von 13 °C, einer Stromstärke von 50 mA und

einer variablen Spannung von maximal 600 V, für ca. 90 Minuten. Als Molekulargewichtsmarker wurde eine Standard-Proteinmischung verwendet. Für den niedrig molekularen Bereich: LMW-Marker (Phosphorylase b aus Kaninchenmuskel 94 kDa; Rinderserumalbumin, 67 kDa; Ovalbumin, 43 kDa; Carboanhydrase aus Rindererythrozyten, 30 kDa; Trypsininhibitor aus Sojabohnen, 20,1 kDa;  $\alpha$ -Lactalbumin aus Rindermilch, 14,4 kDa; Amersham Pharmacia). Für den höher molekularen Bereich: HMW-Marker (Glutamin Dehydrogenase aus Rinderleber, 53 kDa; Transferrin, 76 kDa;  $\beta$ -Galaktosidase aus E.coli 116 kDa;  $\alpha$ 2-Makroglobulin aus Rinderplasma 170 kDa; Myosin aus Kaninchenmuskel 212 kDa, Amersham Pharmacia).

### **3.6. Transfer der Proteine auf Membranen**

Die aufgetrennten Proteine wurden nach Beendigung der Elektrophorese in einer Semidry-Blot-Apparatur mit Graphitelektroden (NovaBlot, Amersham Pharmacia) auf PVDF-Membranen (Immobilon P, Porengröße 0,45  $\mu$ m; Sigma, Deisenhofen) transferiert. Es wurden insgesamt 18 Filterpapiere (Munktell) auf Gelgröße zurechtgeschnitten. 6 Filterpapiere wurden in Anodenlösung I (300 mM Tris; 20 % (v/v) Methanol) getränkt und dann auf die mit H<sub>2</sub>O angefeuchtete Anodenplatte gelegt. 3 weitere Filterpapiere wurden in Anodenlösung II (25 mM Tris; 20 % (v/v)) gewässert und auf die ersten sechs platziert. Das Gel selber wurde 5 Minuten lang in Anodenlösung II äquillibriert. Im Anschluss wurde die Trägerfolie mit Hilfe eines Film-Removers (Amersham Pharmacia) abgetrennt. Die Blotmembran, die zuerst in Methanol getränkt und danach ebenfalls in Anodenlösung II äquillibriert wurde, wurde dann auf das abgetrennte Gel gelegt und das gesamte Paket kopfüber auf die bereits auf der Anodenplatte liegenden Filterpapiere gebracht. Nach Ablösen der Folie wurden die restlichen 9 Filterpapiere in Kathodenlösung (40 mM 6-Aminohexansäure; 0,01 % (w/v) SDS; 20 % (v/v) Methanol) getränkt und auf das Gel gelegt. Nach Entfernen der Luftblasen wurde die Kathoden-Graphitplatte ebenfalls mit H<sub>2</sub>O befeuchtet und mit ihr das ganze Paket abgedeckt. Der Transfervorgang dauerte bei einer Stromstärke von 200 mA und einer Spannung von 20 V, 60 Minuten.

### 3.7. Färbetechnik nach Ponceau S

Nach der Beendigung des Proteintransfers in der Blotapparatur wurden die Membranabschnitte zusammen mit den dazugehörigen Markerproteinen für 10 Minuten in H<sub>2</sub>O dest. gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation für etwa 10 Minuten in Ponceau S-Färbelösung (0,1 % (w/v) Ponceau S in 3 % (v/v) Essigsäure).

Im Anschluss wurden die Membranen erst kurz und noch einmal 10 Minuten in H<sub>2</sub>O dest. gewaschen und an der Luft getrocknet.

### 3.8. Detektion mit verstärkter Chemilumineszenz (ECL)

Zur Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen wurde nach dem Proteintransfer die Blotmembranen für 60 Minuten in TBST-Puffer (137 mM NaCl; 20 mM Tris/HCL; 0,1 % (v/v) Tween-20; pH 7,5) und mit 5 % (w/v) Magermilchpulver bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgte eine Inkubation der Membranen mit den jeweils spezifischen Antikörpern in einer Antikörperlösung (5 % (w/v) Magermilchpulver; 0,02 % (w/v) NaN<sub>3</sub>; in TBST) für 16 Stunden bei 6 °C auf einem Taumelmischer. Dann wurden die Membranen zweimal kurz und sechsmal für jeweils 10 Minuten mit TBST gewaschen. Danach wurde die Membran mit dem entsprechenden sekundären Antikörper (anti-Ziege; anti-Maus; anti-Huhn; anti-Kaninchen, Promega, Madison, USA), in entsprechender Verdünnung in TBST-Puffer mit 5 % (w/v) Magermilchpulver für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde wieder zweimal kurz und dann sechsmal für 10 Minuten mit TBST gewaschen. Nun wurden die Membranen für ca. 5 Minuten in einer Mischung von Supersignal®-Peroxid-Substratlösung und Supersignal®-Luminol-Verstärkerlösung im Volumenverhältnis 1:1 (Pierce, Rockford, IL, USA) inkubiert. Die Signale wurden mit Hilfe des LUMI-Imagers und der LUMI-Analyst-Software (Boehringer, Mannheim) analysiert und quantifiziert.

### 3.9. Strippen von Blotmembranen

Bei bereits mit dem ECL-System detektierten Blotmembranen wurden bei Bedarf sowohl der primäre spezifische Antikörper als auch das Enzym-Konjugat mit Hilfe des Western Blot Recycling Kit (Biotrend, Köln) wieder abgetrennt. Die Antikörper-Strip-Lösung wurde mit H<sub>2</sub>O dest. 1:10 verdünnt. Die Blotmembran wurde für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Membranen für ca. zweimal 5 Minuten mit TBST und 5 % (w/v) Magermilchpulver gewaschen.

### 3.10. Messung der Insulinbindung

Für die Insulinbindung wurden die H9c2-Zellen und die entsprechenden Subklone in 6-Well Platten mit einer Dichte von zweimal 10<sup>5</sup> Zellen/Well ausgesät. Dann erfolgte eine 24stündige Kultivierung bei 37 °C in DMEM-Medium, ergänzt mit 10 % FCS, 1 % nicht essentielle Aminosäuren, 100 µg/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin (DMEM komplett). Dem Medium der Klone wurde zusätzlich Geneticin (G418) hinzugefügt. Die konfluenten Zellen wurden am nächsten Tag zweimal mit vorgewärmtem, sterilem PBS gewaschen und anschließend für 1 Stunde bei 37 °C in serumfreien DME M (ohne FCS), mit 2 % BSA versetzt, inkubiert. Nun folgte die Zugabe von 5 x 10<sup>-11</sup> M radioaktiv markiertem Insulin, Tracerkonzentration 0,1 µCi/Well (Aventis), in jeweils drei Kavitäten der 6-Well Platten und dann die Bindung für 90 Minuten bei 37 °C. Im Anschluss wurde das Medium entfernt und nach zweimaligem Waschen der markierten Zellen mit eiskaltem PBS erfolgte die Lyse in 0,1 % SDS und die Bestimmung der Radioaktivität in einem γ-Counter.

Zur Ermittlung der unspezifischen Bindung wurden parallele Ansätze mit Überschuss des entsprechenden unmarkierten Insulins (10<sup>-5</sup> M) vorbereitet. Die dreifachen Ansätze (Triplikate) wurden in die übrigen drei Kavitäten der 6-Well Platten gegeben. Aus den drei Ansätzen mit unmarkiertem Insulin wurde der Mittelwert errechnet, der die unspezifische Bindung darstellt. Dieser Wert wurde vom Ergebnis der Bindungsmessung abgezogen, um so die spezifischen Bindungswerte zu erhalten.

### 3.11. Messung des 2-Desoxyglucose Transportes

Die Zellen wurden 24 Stunden zuvor in einer feststehenden Anzahl in 6-Well Kulturschalen ausgesät. Am nächsten Tag wurden sie für 2,5 Stunden in einem DMEM-Komplettmedium (5,5 mM Glucose; FCS-frei) im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, um die verbleibende Glucose zu entfernen. Nun wurden in die oberen drei Vertiefungen je 1 ml eines Glucose-freien Transportpuffers (134 mM NaCl, 5,4 mM KCL, 1,8 mM CaCl, 0,8 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM HEPES, pH 7,4) gegeben. In die unteren drei Kavitäten der Schale wurde der gleiche Transportpuffer zugegeben, dieser wurde vorher mit einer bestimmten Konzentration Insulin versetzt. Dann wurden die Kulturschalen für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. Es wurden Kulturschalen mit Insulinkonzentrationen von 10<sup>-6</sup> molar bis 10<sup>-11</sup> molar und ein Leerwert angesetzt. Danach wurde 2-Desoxy-D-[1-14C]Glucose (7,3 µM final, 0,4 µCi pro Kulturschale) zugegeben und somit die Reaktion gestartet. Um die unspezifische Glucoseaufnahme durch Diffusion zu ermitteln, wurden Parallelansätze mit L-[1-14C]Glucose mitgeführt. So konnten die ermittelten Werte (ca. 2-5 % der Gesamt-Glucoseaufnahme) von der Totalaufnahme subtrahiert werden und der spezifische Carrier-vermittelte Transport errechnet werden. Abgestoppt wurde der Glucosetransport durch dreimaliges Waschen der Zellen mit eiskaltem Cytochalasin B (25 µM in Transport-Puffer). Danach wurden die gewaschenen und getrockneten Zellen mit je 1 ml 1 N NaOH solubilisiert und die Lysate im Trockenschrank bei 70 °C hydrolysiert. Je 500 µl der Lysate wurden 100 µl Essigsäure (100 %) hinzugefügt, um sie zu neutralisieren. Nach der Zugabe von je 10 ml Aquasafe 300 Plus (Zinsser, Frankfurt) wurde die aufgenommene Radioaktivität mit Hilfe eines Szintillationszählers (LS 6000 IC, Beckman) ermittelt.

### 3.12. Berechnung und Statistik

Falls nicht anders angegeben, sind grundsätzlich die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Mittelwerte (+/- SEM) dargestellt. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz wurde das Programm „t-ease“ (ISI, Philadelphia, USA) verwendet. Es basiert auf dem Student t-Test für gepaarte und ungepaarte Daten. Als Signifikanzgrenze wurde  $p \leq 0,05$  festgelegt.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Transfektion der H9c2- Zellen mit dem PML Vektor mit der HIR-cDNA für den humanen Insulinrezeptor**

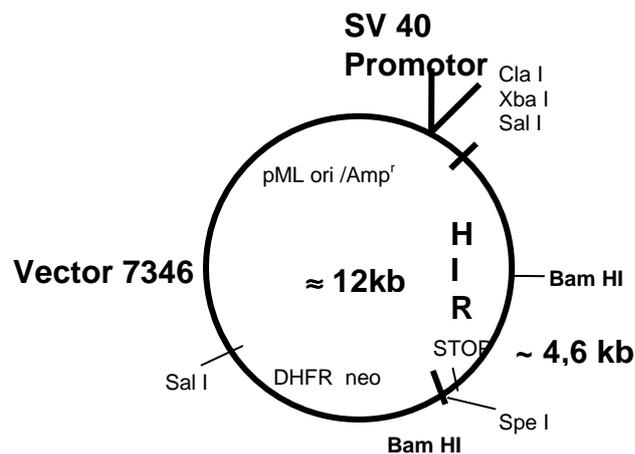
In den letzten Jahren haben sich die Kenntnisse über die Mechanismen der Glukoseaufnahme in Insulin-sensitiven Geweben vertieft. Das Hormon Insulin bindet an die hochaffinen Bindungsstellen der extrazellulären  $\alpha$ -Untereinheiten des Insulinrezeptors. Dieser besteht aus einem tetrameren Transmembranprotein. Der Rezeptor initiiert somit den ersten Schritt in der sogenannten Insulinrezeptorkaskade, durch die die Glukoseaufnahme in die Zelle vermittelt wird.

Die kardiale H9c2-Muskelzelllinie (Hescheler et al., 1991) wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits vielfach verwendet und gut charakterisiert. Zu den vorangegangenen Studien über die H9c2- Muskelzelllinie gehörte der Nachweis von verschiedenen Elementen der Insulinkaskade wie z.B. Shc, MAP-Kinase, IRS-1 und IRS-2 (Abas et al., 2000; Chun et al., 2000; Kim et al., 1999; Nishida et al., 1999). Der dem Insulinrezeptor morphologisch homologe IGF-I Rezeptor konnte ebenfalls in diesen Zellen detektiert werden (Bahr et al., 1997). An anderer Stelle wurde auf der Ebene der Insulin-stimulierten Glukoseaufnahme geforscht. Hierbei ergab sich, dass die im Herzmuskel vorherrschenden Glukosetransporter-Isoformen GLUT1 und GLUT4 in differenzierten H9c2-Myotuben nachgewiesen werden konnten (Yu et al., 1999; Tsiani et al., 1998; Lu et al., 1997). Bei Glukoseaufnahmemeasurements nach Insulinstimulation an den H9c2-Zellen im Myoblastenstadium ergab sich keine signifikante Steigerung der Glukoseaufnahme (Kutscher, Diplomarbeit 1993). Basierend auf diesen Kenntnissen wurde in unserer Arbeitsgruppe dieses Zellsystem transfiziert, um Subklone mit stabiler GLUT4-Überexpression herzustellen (Dransfeld, Promotionsarbeit 2001). Die Idee war, ein Modellsystem für Langzeitstudien zur Regulation der subzellulären Verteilung und Translokation des kardialen GLUT4 zu etablieren (Dransfeld, Promotionsarbeit 2001; Dransfeld et al., 2000). Hierbei zeigte sich, dass eine stabile Überexpression von GLUT4 in H9c2- Zellen nicht zu einer gesteigerten Insulinsensitivität der

Zellen führte. In verschiedenen Studien konnte herausgearbeitet werden, dass die Insulinansprechbarkeit der H9c2-Zellen generell eher gering ist (Bahr et al., 1997). Darüber hinaus wird der Insulinrezeptor in diesen Zellen nur marginal exprimiert. Um weitere Versuche, die die Insulinansprechbarkeit dieses Zellsystems betreffen, vorzunehmen, wurden die H9c2-Zellen mit dem Insulinrezeptor stabil transfiziert.

### Karte des Vektors

HIR-cDNA:	ca. 4,6 kb
PML-backbone:	ca. 7,3 kb
Promotor:	SV40
Gesamtgröße:	ca. 12 kb
Resistenz-	
Marker:	Amp, Neo

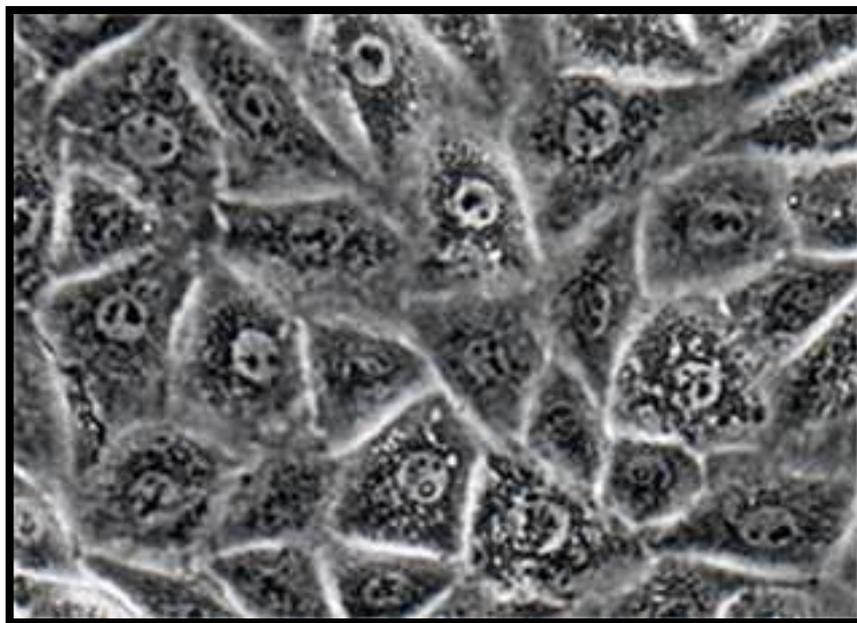


**Abbildung 3: Karte des Vektors pML zur Transfektion von HIR-cDNA**

Der Vektor ist ein auf SV 40-Promotor basierender Expressionsvektor. Gesamtgröße: ca. 12 kb, HIR-cDNA: ca. 4,6 kb, pML-backbone: ca. 7,3 kb, bakterielle Resistenz: Ampicillin. Die Transfektion der Zellen erfolgte mit der Kalziumphosphat-Methode. Es wurden pro 10 cm Petrischale 20 µg Plasmid-DNA verwandt. Im Anschluss wurden die Zellen über Nacht bei 35 °C und 3 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen zweimal gewaschen und mit Normalmedium bedeckt. Im Anschluss erfolgte die Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. 60 Stunden nach der Transfektion wurde das Normalmedium durch Selektionsmedium (900 µg/ml Geneticin) ersetzt.

Wie im Methodenteil bereits beschrieben, wurden die H9c2-Zellen mit dem Insulinrezeptor transfiziert. Die Zellen wurden im Selektionsmedium (Normalmedium plus 900 µg/ml Geneticin) kultiviert und ein Mediumwechsel erfolgte alle 3-4 Tage. Kurz vor Erreichen des konfluenten Stadiums wurde die Zellzahl halbiert und weiter kultiviert. Nach 3 Wochen wurden die Zellklone verdünnt und auf eine 96-Well Platte verteilt. Die Zellen wurden engmaschig,

mikroskopisch kontrolliert. Die Zellen, die eine Zellstärke von ca. 500 erreichten, wurden auf 6-Well Platten ausgesät. Die Klone, die nun weiter heranwuchsen, wurden schließlich auf 10 cm Petrischalen transferiert und hier angezogen. Auf diesem Weg erhielten wir 14 Klone, die ein gutes Wachstum zeigten. Die 14 verschiedenen Klone zeigten ein unterschiedlich schnelles Wachstum. Sie erreichten das konfluente Stadium mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Der Klon A5 z. B. zeigte ein sehr rasches Wachstum, die Klone B4, D1, E2 und H7 wuchsen mittelschnell und D6 und H12 wuchsen im Vergleich sehr langsam.



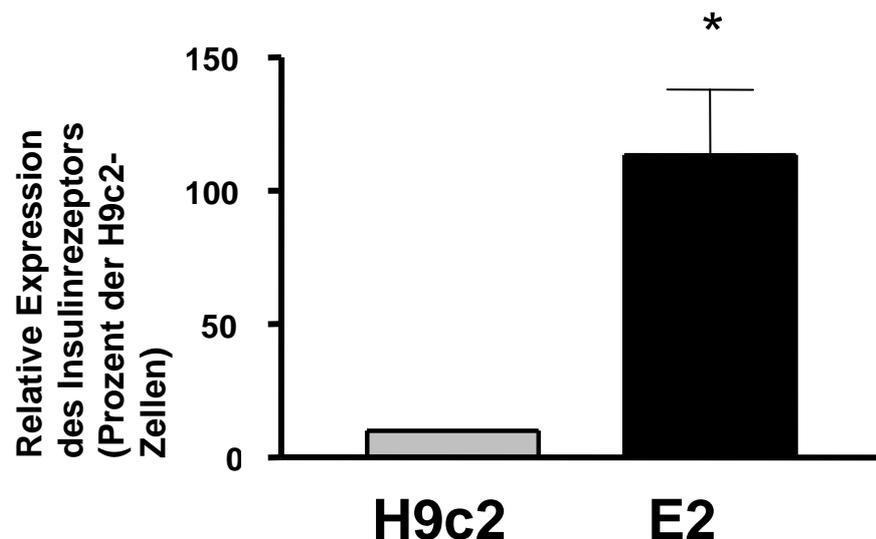
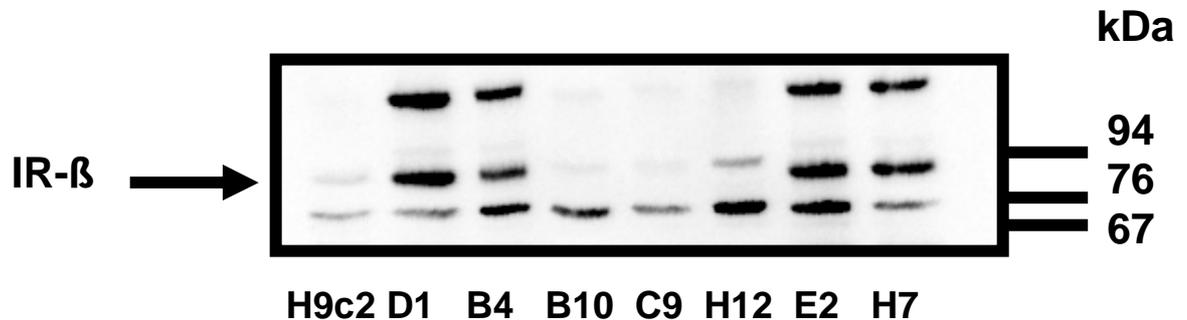
**Abbildung 4 : E2-Klon**

Die Aufnahme zeigt das lichtmikroskopische Bild des E2-Klones bei 100 % Konfluenz. Die Zellen sind kultiviert in serumhaltigem Kulturmedium mit Zusatz von Geneticin (G418: 200 µg/ml).

#### **4.2. Überexpression des Insulinrezeptors und Insulinbindung in verschiedenen Subklonen aus H9c2-Zellen nach stabiler Transfektion**

Um die Überexpression des Insulinrezeptors zu verifizieren, wurden die Klone einem initialen Screening unterzogen. Zuerst wurden die auf den Petrischalen adhärent herangewachsenen Zellen lysiert. Das erhaltene Proteinmaterial konnte nun auf einem SDS-Gel (8-18 %) aufgetrennt und im Anschluss auf

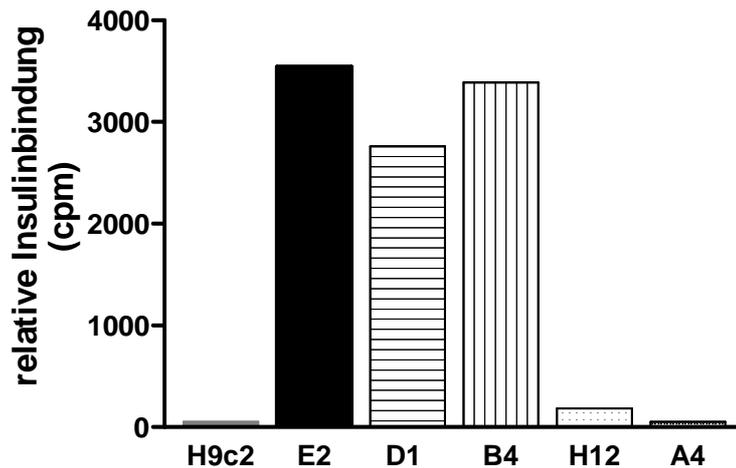
PVDF-Membranen überführt werden. Die Membranen wurden mit einem für die  $\beta$ - Untereinheit des Insulinrezeptors spezifischen Antikörper inkubiert.



\* =signifikant verschieden von der Kontrolle,  $p < 0,05$

**Abbildung 5 und 6: Westernblot-Analyse der Insulinrezeptorexpression in H9c2-Zellen und 7 verschiedenen stabil transfizierten Klonen.**

Die H9c2-Zellen wurden, wie bereits im Methodenteil beschrieben, mit dem für den humanen Insulinrezeptor codierenden Vektor pML transfiziert und dann wurden durch Klonselktion 14 Subklone herausgefiltert. Die in der Zellkultur konfluent gewachsenen Zellen wurden lysiert und 10  $\mu$ g gewonnenes Proteinmaterial pro Spur in einem SDS-Gel (8-18 %) aufgetrennt. Durch Immunblotting mit einem für die  $\beta$ -Untereinheit des Insulinrezeptors-spezifischen Antikörper wurden die Proteine detektiert. Mit ECL-Detektion auf einem LUMI-Imager-System wurden die Signale sichtbar gemacht und analysiert. Die Quantifizierung konnte mit Hilfe der LUMI-Imager-Software erfolgen. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von (6) verschiedenen Versuchen. \* =signifikant verschieden von der Kontrolle mit  $p < 0,05$ .



**Abbildung 7: Bindungsmessung mit  $^{125}$ I-Insulin an H9c2-Zellen und 5 verschiedenen stabil transfizierten Klonen.**

Die Zellen wurde in 6-Well-Platten mit einer Dichte von  $2 \times 10^5$  Zellen/Well ausgesät. Es folgte eine 24stündige Kultivierung bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  in DMEM-Medium, ergänzt mit 10 % FCS, 1 % nicht essentielle Aminosäuren, 100  $\mu\text{g/ml}$  Streptomycin und 100 U/ml Penicillin (DMEM komplett). Dem Medium der Klone wurde zusätzlich Geneticin (G418) hinzugefügt. Am nächsten Tag erfolgte die Zugabe von  $5 \times 10^{-11}$  M radioaktiv markiertem Insulin in jeweils drei Kavitäten der 6-Well-Platten und dann erfolgte die Bindung für 90 min bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$ . Bestimmung der Radioaktivität in einem  $\gamma$ -Counter.

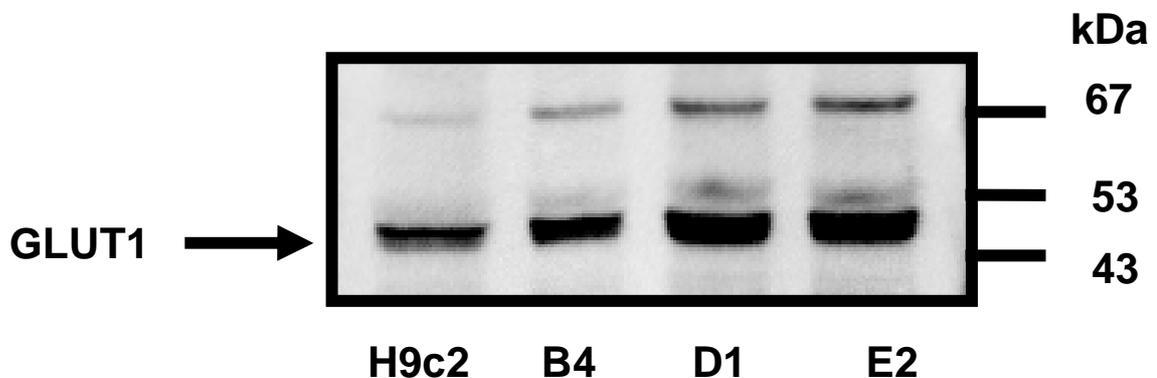
Die Abbildung 5 zeigt eine repräsentative Western Blot-Analyse eines Experimentes mit 6 verschiedenen Subklonen und den H9c2-Zellen. Man sieht, dass die bei 95 kDa befindliche  $\beta$ -Untereinheit des Insulinrezeptors bei den H9c2-Zellen nur ein sehr schwaches Signal, als Ausdruck einer schwachen Expression, zeigt. Im Gegensatz dazu zeigen die Klone D1, B4, E2, H12 und H7 ein sehr ausgeprägtes bis mittelstarkes Signal. In Abbildung 6 ist die Quantifizierung von verschiedenen Versuchen ( $n=6$ ) mit dem E2-Klon gezeigt. Die Expression des Insulinrezeptors ist im E2-Klon um das 10-15fache im Vergleich zu der Expression in den H9c2-Zellen erhöht. Die Messung der relativen Insulinbindung in Abbildung 7 zeigt sehr hohe Bindungswerte für die Klone D1, B4 und die höchsten Werte für E2. Bei den anderen, durch mittelstarke oder sehr starke Rezeptorexpression auffallenden Klonen wurden nur geringe Bindungswerte nachgewiesen. Da die Messungen der Insulinbindung für jeden Klon nur einmal durchgeführt wurde, soll sie nur als Orientierung angesehen werden. Basierend auf den bisher herausgearbeiteten Ergebnissen, konnte eine weitere Selektion getroffen werden. Da die Klone B4, D1 und E2 die ausgeprägteste Expression zeigten und gute auch

Insulinbindungswerte aufwiesen, wurde die weitere Charakterisierung mit diesen Zellen vorgenommen.

#### 4.3. Untersuchung der Expression des GLUT1 in IR-Klonen aus H9c2-Zellen

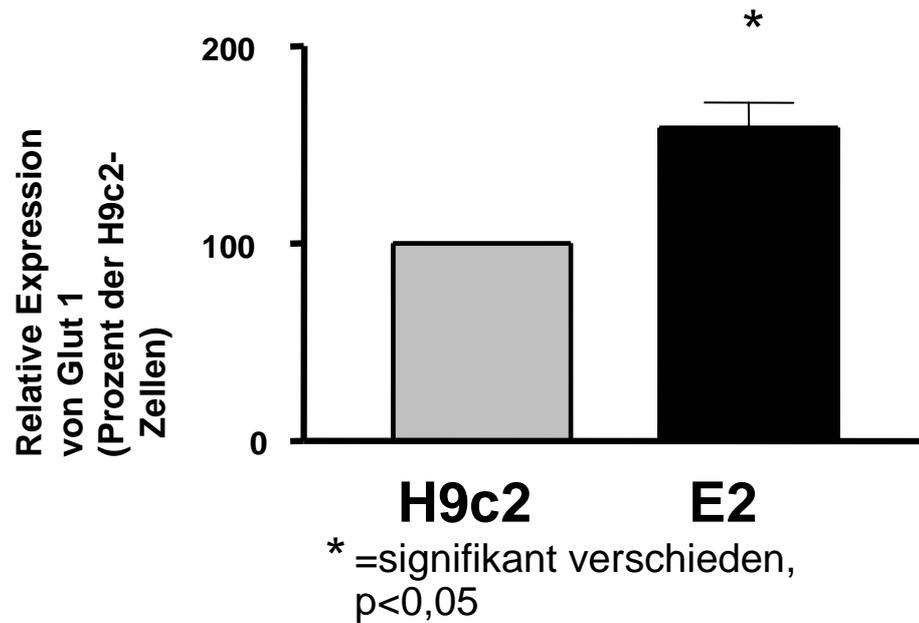
Als nächstes sollte die Expression des in Insulin-sensitiven Geweben vorkommenden Glukosetransporters GLUT1 untersucht werden. Das Vorkommen der Isoform GLUT1 in H9c2-Myozyten wurde bereits in zahlreichen Studien belegt (Yu et al., 2000; Lu et al., 1997). Ihm wird die Aufrechterhaltung der Grundversorgung der Zelle mit Glukose zugeordnet (Assimacopoulos-Jeannet et al., 1990).

Mit der Western Blot-Analyse wurde das GLUT1- Signal in den H9c2-Zellen bei einer Masse von 47 kDa detektiert (Gould 1990; Marette et al., 1992).



**Abbildung 8: Western Blot-Analyse der GLUT1-Expression in H9c2-Zellen und 3 selektierten, verschiedenen stabil transfizierten Klonen.**

Die in der Zellkultur konfluent gewachsenen Zellen wurden lysiert und 10 µg gewonnenes Proteinmaterial pro Spur in einem SDS-Gel (8-18 %) aufgetrennt. Durch Immunblotting mit einem GLUT1 Antiserum wurden die Proteine detektiert. Mit ECL-Detektion auf einem LUMI-Imager-System wurden die Signale sichtbar gemacht und analysiert.

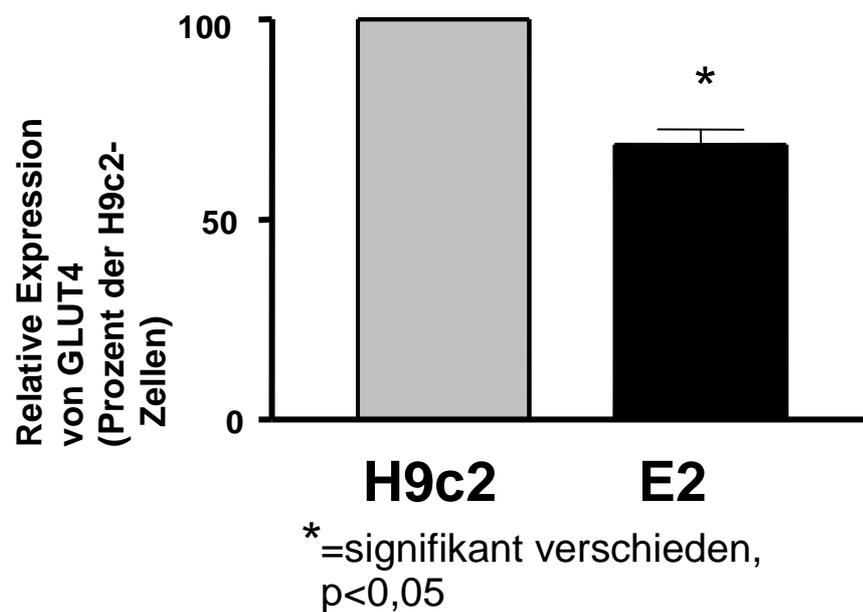
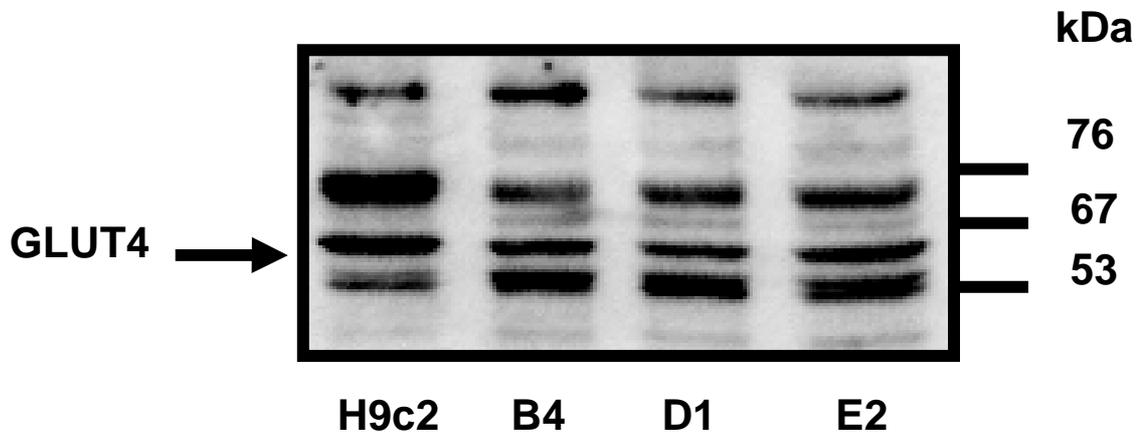


**Abbildung 9: Quantifizierung der Western Blot- Analyse der GLUT1-Expression in H9c2-Zellen und dem E2-Klon**

Die Quantifizierung konnte mit Hilfe der LUMI-Imager-Software erfolgen. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von (n=6) verschiedenen Versuchen. \*=signifikant verschieden von der Kontrolle mit  $p < 0,05$ .

In Abbildung 8 sieht man die Expression des Glukosetransporter GLUT1 in H9c2-Zellen und in den Klonen B4, D1 und E2. Das GLUT1-Signal ließ sich bei ca. 47 kDa nachweisen. Diesem repräsentativen Western Blot lässt sich entnehmen, dass im Vergleich zu den H9c2-Zellen alle IR-Rezeptor-Klone eine erhöhte GLUT1-Expression aufweisen. Die Quantifizierung für den E2-Klon (Abbildung 9), berechnet aus 6 separaten Experimenten, zeigt eine Erhöhung von ca. 50 % der GLUT1-Expression in den Klonen von im Vergleich zu den H9c2-Zellen.

#### 4.4. Untersuchung der Expression des GLUT4 in IR-Klonen aus H9c2-Zellen

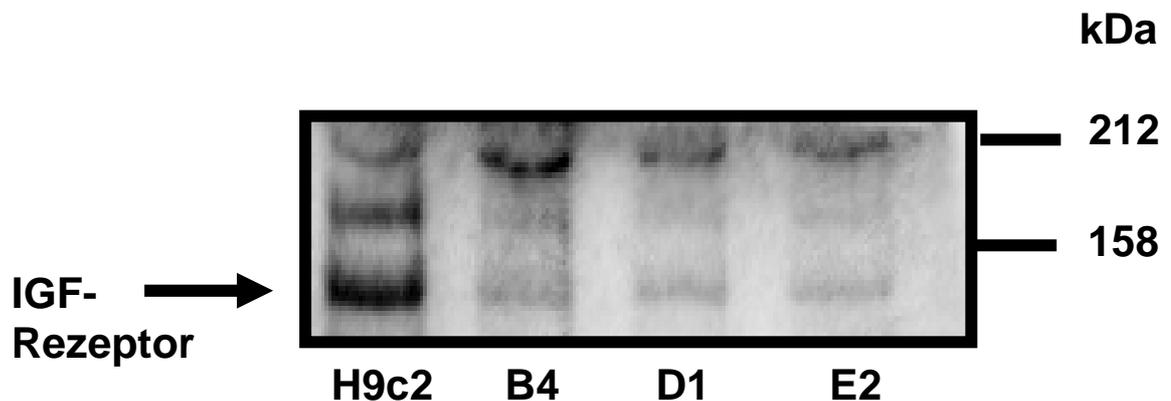


**Abbildung 10 und 11: Western Blot-Analyse der GLUT-4-Expression in H9c2-Zellen und 3 selektierten Klonen.**

Die in der Zellkultur konfluent gewachsenen Zellen wurden lysiert und 10  $\mu$ g gewonnenes Proteinmaterial pro Spur in einem SDS-Gel (8-18 %) aufgetrennt. Durch Immunblotting mit einem GLUT4-Antiserum wurden die Proteine detektiert. Mit ECL-Detektion auf einem LUMI-Imager-System wurden die Signale sichtbar gemacht und analysiert. Die Quantifizierung konnte mit Hilfe der LUMI-Imager-Software erfolgen. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von (n=5) verschiedenen Versuchen.

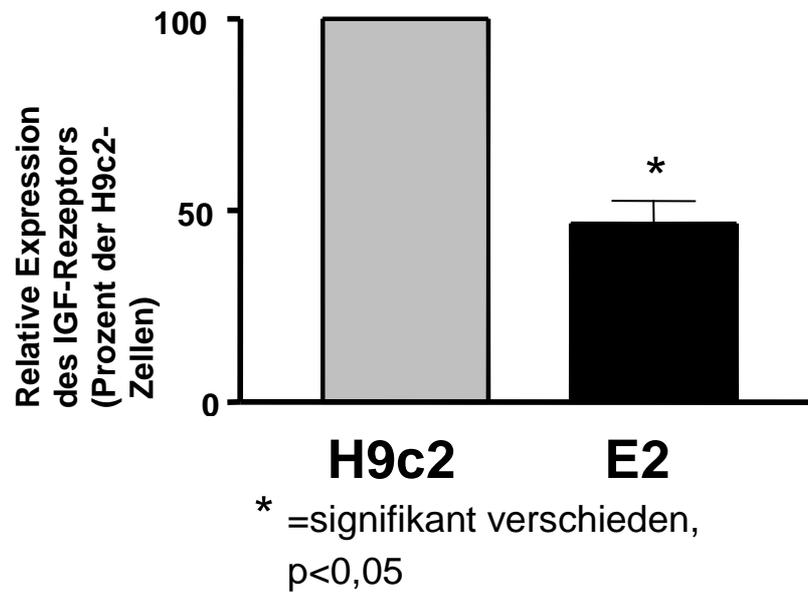
Die insulininduzierte Steigerung der Glukoseaufnahme in Skelettmuskel, Fettgewebe (Mueckler, 1994; Gould & Bell, 1990) und in kardialem Gewebe (Eckel et al., 2000; Fischer et al., 1997) wird hauptsächlich durch die Translokation der Isoform GLUT4 (James et al., 1988) von intrazellulär gelegenen mikrosomalen Vesikelpools zur Plasmamembran der Zelle vermittelt (Martin et al., 1999; Zorzano et al., 1997; Rea & James et al., 1997). In Hinblick auf diese Kenntnisse kommt der Expression des GLUT4 eine besondere Bedeutung zu. Innerhalb unserer Arbeitsgruppe wurde bereits anhand von Untersuchungen gezeigt, dass die Glukosetransporterisoform GLUT4 in H9c2-Zellen bei einer molekularen Masse von ca. 60 kDa detektierbar ist (Dransfeld, Promotionsarbeit 2001; Dransfeld et al., 2000). Die Abbildung der Western Blot-Analyse zeigt, dass bei den 3 Klonen ein schwächeres Signal für den GLUT4 zu sehen ist als bei den H9c2-Zellen. Im Falle des Klons E2 zeigt die Quantifizierung in Abbildung 11, dass die Abnahme ca. 40 % beträgt.

#### 4.5. Untersuchung der IGF-I Rezeptor-Expression in IR-Klonen aus H9c2-Zellen



**Abbildung 12: Western Blot-Analyse der IGF-I Rezeptor-Expression in H9c2-Zellen und drei selektierten Klonen.**

Die in der Zellkultur konfluent gewachsenen Zellen wurden lysiert und 10 µg gewonnenes Proteinmaterial pro Spur in einem SDS-Gel (8-18 %) aufgetrennt. Durch Immunblotting mit einem IGF-I Rezeptor-Antiserum wurden die Proteine detektiert. Mit ECL-Detektion auf einem LUMI-Imager-System wurden die Signale sichtbar gemacht und analysiert.



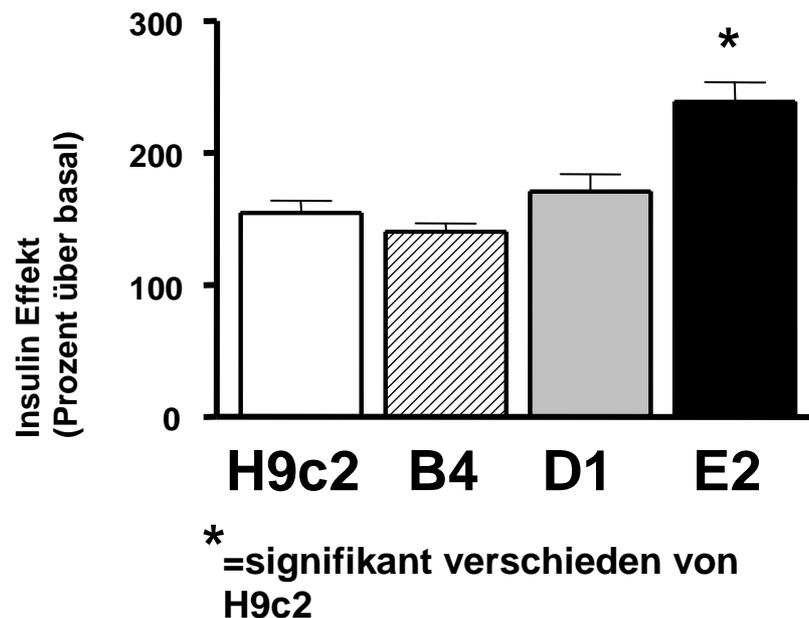
**Abbildung 13: Quantifizierung der Western Blot- Analyse der GLUT1-Expression in H9c2-Zellen und dem E2-Klon**

Die Quantifizierung konnte mit Hilfe der LUMI-Imager-Software erfolgen. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von (n=5) verschiedenen Versuchen. \*=signifikant verschieden von der Kontrolle mit  $p < 0,05$ .

Von großem Interesse war es, herauszufinden, wie sich die Überexpression des Insulinrezeptors auf die Expression des IGF-I Rezeptors auswirken würde. Der IGF-I Rezeptor (insulin-like growth factor-I receptor) ist genau wie der Insulinrezeptor in nahezu allen Geweben vorhanden, nur mit unterschiedlicher Häufigkeit. Der IGF-I Rezeptor weist eine homologe Struktur zum Insulinrezeptor auf. Er ist also ein tetrameres Transmembranprotein ( $\alpha_2/\beta_2$ ), welches mit der extrazellulären Einheit einen Hormon-Rezeptor-Komplex bildet. Die physiologischen Aufgaben des IGF-I Rezeptors sind unterschiedlich zu denen des Insulinrezeptors. Er ist zuständig für Zellwachstum, Überleben und Differenzierung der Zellen. Die Abbildung 12 zeigt einen repräsentativen Western Blot. Man sieht, dass das Signal des IGF-I Rezeptors bei etwa 130 kDa auszumachen ist. Bei den H9c2-Zellen ist eine kräftige Bande zu erkennen. Im Gegensatz dazu ist das Signal bei den Klonen E2, B4 und D1 sehr schwach. Die Abbildung 13 zeigt die Quantifizierung für den E2-Klon und die H9c2-Zellen. Man erkennt eine 50-60 %ige Abnahme der IGF-I Rezeptor-Expression bei dem Klon.

#### 4.6. Messung des 2-Desoxyglucosetransportes in den H9c2-Zellen und drei stabil transfizierten Subklonen

Die bisher charakterisierten Klone sollten weiter untersucht werden. Die transfizierten Zellen wurden nun auf ihre Ansprechbarkeit auf Insulin untersucht.



**Abbildung 14: Messung des 2-Desoxyglucosetransportes an H9c2-Zellen und selektierten Klonen**

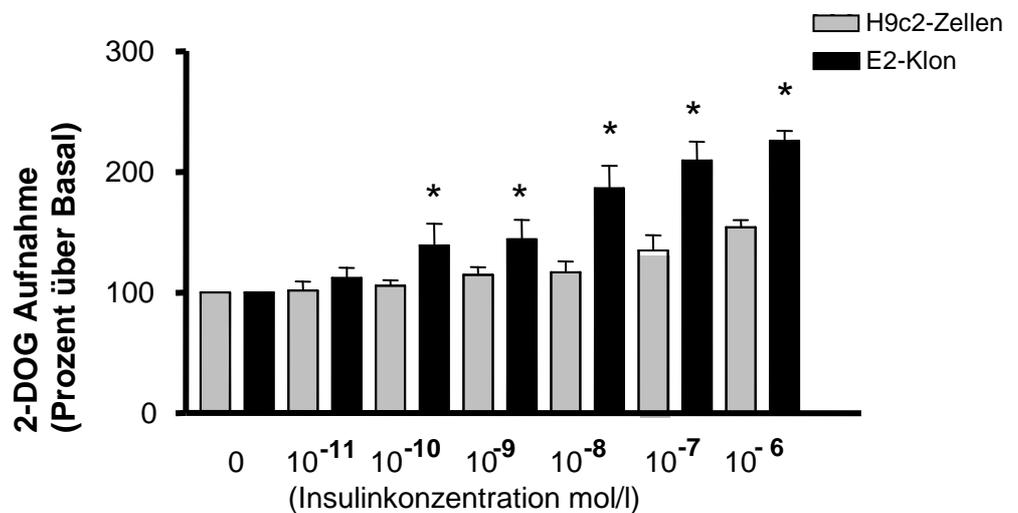
Die Zellen wurden (wie im Methodenteil detailliert beschrieben) für 2,5 Stunden in serumfreiem Medium inkubiert. Anschließend wurde die basale und die Insulinstimulierte (45 Minuten Inkubation mit oder ohne  $10^{-6}$  mol/l Insulin) Glucoseaufnahme, mittels Zugabe von 2-Desoxyglucose (2-DOG) zu  $2 \times 10^5$  -Zellen unter 30 Minuten Inkubation, gemessen. Hier sind die Mittelwerte von 5 separaten Experimenten (+/- SEM) dargestellt. \* =signifikant verschieden von H9c2-Zellen,  $p < 0,05$ .

Abbildung 14 zeigt den Einfluss des Insulins auf den 2-Desoxyglucosetransport (2-DOG-Transport) bei den untersuchten H9c2-Zellen und den oben beschriebenen 3 charakterisierten Klonen. Unter maximaler Stimulierung mit Insulin ( $10^{-6}$  mol/l) erkennt man, dass die H9c2-Zellen und die beiden Klone B4 und D1 eine sehr ähnliche Ansprechbarkeit (im Bereich von etwa 150-160 % über Basal) zeigen. Im Gegensatz dazu weist der Klon E2 einen eindeutig

gesteigerten Response mit einer Stimulation des 2-DOG-Transportes von ca. 200- 300 % über Basal auf.

#### 4.7. Messung des 2-Desoxyglukosetransportes in den H9c2-Zellen und dem stabil transfizierten E2-Klon mit verschiedenen Insulinkonzentrationen (Dosis-Wirkungskurve)

Die Klone B4, D1 und H9c2-Myozyten zeigten unter maximaler Insulinstimulation einen etwa vergleichbaren Glukose-Uptake. Aufgrund der deutlich gesteigerten Glukoseaufnahme des E2-Klons wurde er für ein weiteres Experiment ausgewählt. In der weiterführenden Untersuchung sollte gezeigt werden, ob dieser Klon auch eine erhöhte Insulinsensitivität bei Stimulation mit Insulin in geringerer bzw. physiologischer Konzentration zeigen würde.



\* = signifikant verschieden von Basal,  $p < 0,05$

**Abbildung 15: Dosiswirkungskurve der 2-DOG- Aufnahme bei H9c2- Zellen und dem Klon E2.**

Die Zellen wurden, wie in Abbildung 14 (und im Methodenteil ausführlich) beschrieben, vorinkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Weiterbehandlung mit ansteigenden Insulinkonzentrationen ( $10^{-11}$  mol/l -  $10^{-6}$  mol/l) für 45 Minuten. Die Glucoseaufnahme wurde mittels Zugabe von 2-Deoxyglucose (2-DOG) zu  $2 \times 10^5$  -Zellen unter 30 Minuten Inkubation gemessen. Hier sind die Mittelwerte von 5 separaten Experimenten dargestellt (+/- SEM). \* = signifikant verschieden von Basal,  $p < 0,05$ .

Die Abbildung 15 zeigt Dosiswirkungskurven mit einer steigenden Insulinkonzentration (Basal,  $10^{-11}$  mol/l -  $10^{-6}$  mol/l) des 2-DOG-Uptakes für die H9c2-Zelle und den E2-Klon. Man kann diesem Diagramm entnehmen, dass der Klon eine signifikant gesteigerte Ansprechbarkeit in den Konzentrationen  $10^{-10}$  mol/l -  $10^{-6}$  mol/l zeigt. Er weist eine geringe Steigerung im Bereich der Konzentration  $10^{-11}$  mol/l gegenüber dem H9c2-Zellen auf. In diesem Versuch kann man deutlich erkennen, dass der E2-Klon auch bei einer physiologischen Ausschüttung des Hormons Insulin eine deutlich messbare Glukoseaufnahme auf zellulärer Ebene aufweist.

## 5. Diskussion

Der Insulinrezeptor als Einstieg in die molekularen Mechanismen der Insulinwirkung ist bereits in vielen Studien beschrieben und gezeigt worden (Taha et al., 1999; Kandrór et al., 1996; White und Kahn, 1994). Wie bereits erwähnt, stellt die Bindung von Insulin an den Insulinrezeptor den initialen Schritt in der Insulinkaskade dar. Die so initiierte Aktivierung der Tyrosinkinase wird als essentiell für die Glukoseaufnahme angesehen (Quon et al., 1994b) und ist das erste identifizierte Ziel der Insulinresistenz (Musso et al., 2004). Die Insulinresistenz konnte bei einigen Syndromen mit massiver Insulinresistenz, in verschiedenen Studien, auf Mutationen des Insulinrezeptorgens zurückgeführt werden. (Musso et al., 2004). Diese Fakten weisen darauf hin, dass Qualität oder Quantität des Insulinrezeptors die Glukoseaufnahme der Zellen beeinflussen können. Welche Auswirkung würde es haben, wenn Zellen oder Organismen, die den Insulinrezeptor initial nur gering exprimieren und/ oder nur wenig Insulin-sensitiv sind, einer Insulinrezeptortransfektion unterzogen würden und den Rezeptor daraufhin stabil überexprimieren?

Die zentrale Frage der vorliegenden Arbeit war, ob eine positive, negative oder unveränderte Wirkung aus der Insulinrezeptorüberexpression resultiert und wie sie die Glukoseaufnahme der Zellen der Zielgewebe beeinflusst.

### 5.1. Die H9c2-Muskelzelllinie ein gut geeignetes System für die Transfektion mit dem humanen Insulinrezeptor und für Langzeitstudien

Die periphere Insulinresistenz in den Geweben, die von zentraler Bedeutung für die Glukosehomöostase sind (Muskulatur und Fettgewebe), wird weitläufig als initiales Ereignis in der Pathogenese beim Typ 2 Diabetes betrachtet (Perseghin et al., 2003; Kellerer et al., 1999; DeFronzo, 1985). Obwohl die periphere Insulinresistenz in den Geweben und ihre Bedeutung für den Typ 2 Diabetes bereits gut charakterisiert und verstanden wurde, gibt es auf der molekularen Ebene noch zahlreiche unbeantwortete Fragen (Kellerer et al., 1999).

Für Untersuchungen und Versuche auf zellulärer Ebene sind Muskelzellsysteme gut geeignet. Sie haben eine große Bedeutung bei der Analysierung der Insulinwirkung auf molekularem Niveau. Klip und Mitarbeitern zufolge kann die Verringerung des basalen Glukosetransportes bei kultivierten Zellen durch Serumentzug im Kulturmedium erreicht werden (Klip et al., 1984). Dadurch sind kultivierte Zellen besonders geeignet für Glukosetransportmessungen, sie stellen zum einen eine homogene Population dar und zum anderen ist die definierte Zusammensetzung des extrazellulären Milieus möglich. Die meisten der zurzeit zur Verfügung stehenden Muskelzelllinien zeigen ein geringes Ansprechen auf Insulin. Aus diesem Grund wird in unserer Arbeitsgruppe seit einigen Jahren mit primären Kardiomyozyten geforscht (Eckel et al., 2000; Eckel et al., 1991). Die Kardiomyozyten zeichnen sich durch eine hohe GLUT4-Expression aus. Die Translokation dieses Glukosetransporters zur Plasmamembran wird durch Insulin induziert (Kolter et al., 1992). Die Genexpression in diesen Zellen wird ebenfalls Insulin-abhängig reguliert (Petersen et al., 1995). Diese Zellsysteme sind jedoch sehr aufwendig und kostenintensiv und deshalb nicht für Routineuntersuchungen bzw. Screeningansätze geeignet. Eine weitere Problematik bei diesem Kultursystem ist die fehlende Teilungsfähigkeit der adulten Herzmuskelzellen. Hierdurch entstehen hohe Verluste bei der Zellkultivierung. Zusätzlich sind spezielle Manipulationen, wie z.B. Transfektionsexperimente, erschwert möglich. Es war also erstrebenswert, eine rasch wachsende, unkomplizierte Muskelzelllinie, die sich für Langzeitstudien eignet, zu etablieren. Die in dieser Arbeit verwendeten H9c2-Zellen wurden aus embryonalen Rattenherzen gewonnen. Sie wurden unter anderem auf Grund ihrer relativ einfachen Kultivierung und ihrer Widerstandsfähigkeit verwendet. Unsere Arbeitsgruppe benutzte diese Zellen bereits für zahlreiche Untersuchungen und sie sind gut charakterisiert.

Ausgehend von diesen Voraussetzungen wurde diese Zelllinie mit dem humanen Insulinrezeptor transfiziert. Wie im Ergebnisteil gezeigt, wurde nach Selektion von 14 Subklonen die Überexpression des Insulinrezeptors mittels Western Blot-Analyse verifiziert. Es zeigte sich, dass einige Klone eine bis zu 15fach gesteigerte Expression im Vergleich zu den H9c2-Zellen aufwiesen. Die hohen Insulinbindungswerte einiger Klone konnte man so interpretieren, dass die extrazellulär lokalisierte  $\alpha$ -Untereinheit des Rezeptors nach der Transfektion

mehr Insulin als die H9c2-Zellen binden konnte. Der E2-Klon wies sowohl eine sehr hohe IR-Expression als auch die höchsten Insulinbindungswerte auf. Auch andere Klone (B4, D1) konnten gegenüber den H9c2-Zellen deutlich gesteigerte Werte aufweisen und wurden ebenfalls in ausgewählten Versuchen weiter charakterisiert.

## **5.2. Auswirkung der stabilen Transfektion der H9c2-Zellen mit dem IR auf die Expression des IGF-I Rezeptors**

Der IGF-I Rezeptor (Insulin-like Growth Factor-I receptor) ist genau wie der Insulinrezeptor in nahezu allen Geweben vorhanden, allerdings mit unterschiedlicher Häufigkeit. Er gehört ebenfalls zur Familie der Rezeptortyrosinkinasen mit intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität. Der IGF-I Rezeptor initiiert über eine Liganden-vermittelte extrazelluläre Aktivierung das intrazelluläre Signal (LeRoith et al., 1995; White, 1997). Der IGF-I Rezeptor weist eine dem Insulinrezeptor homologe Struktur auf. Er ist also ein tetrameres Transmembranprotein ( $\alpha_2/\beta_2$ ), welches mit der extrazellulären Einheit einen Hormon-Rezeptor-Komplex bildet.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die  $\alpha$ -Untereinheit des IGF-I Rezeptors (bei 130 kDa) im Western Blot eindeutig in den H9c2-Zellen detektierbar ist. Dies steht im Einklang mit früheren Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe (Bahr et al., 1997). Die Expression des IGF-I Rezeptors in den Klonen, die den IR überexprimieren, zeigte im Vergleich zu den H9c2-Zellen eine deutliche Repression (60 % im E2-Klon). Die physiologische Rolle des IGF-I Rezeptors unterscheidet sich von der des Insulinrezeptors. Seine Hauptaufgaben bestehen vor allem im Zellwachstum, Überleben und Differenzierung der Zelle (Siddle et al., 2001). Der Hauptligand für den Insulinrezeptor ist das Hormon Insulin und für den IGF-I Rezeptor der Insulin-like Growth Factor-I. Aufgrund ihrer morphologischen Ähnlichkeiten und dem ubiquitären Vorkommen der Rezeptoren, wurden sie in zahlreichen Studien untersucht und verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass die Rezeptoren auch jeweils das andere Substrat binden, jedoch mit niedrigerer Affinität (Robert et al., 1998). In diesem Zusammenhang stellte sich die häufig diskutierte Frage,

inwieweit der IGF-I Rezeptor die Aufgaben des Insulinrezeptors übernehmen bzw. kompensieren kann. Aus einigen Studien ging hervor, dass bei *in vivo* Versuchen mit Insulinrezeptor-Knockout-Mäusen diese eine starke diabetische Ketoazidose und Hyperlipidämie entwickelten und verstarben (Accili et al., 1996; Joshi et al., 1996). Daraus kann man folgern, dass bei intaktem IGF-I Rezeptor dieser die Aufgaben des Insulinrezeptors, wie z.B. Glukoseaufnahme in die Zelle, nicht ausreichend substituieren kann. Bei weiteren Versuchen wurden aus Insulinrezeptor-Knockout-Mäusen gewonnene Skelettmuskelzellen in eine Zellkultur überführt. In diesen Zellen ließ sich gleichzeitig ein quantitativer Anstieg des IGF-I Rezeptors messen. Hieraus könnte man folgern, dass die Abwesenheit des Insulinrezeptors die vermehrte Produktion des IGF-I Rezeptors bewirkt, um z. B. die Insulin-induzierten Mechanismen der Zellen zu gewährleisten (Shefi-Friedman et al., 2001). Diese Daten konnten mit der hier vorliegenden Arbeit größtenteils in Einklang gebracht werden. In den nicht transfizierten H9c2-Zellen wurde eine vergleichsweise starke Expression des IGF-I Rezeptors gemessen. In den Insulinrezeptorklonen war das Signal deutlich schwächer. Dies spricht für eine Downregulation des IGF-I Rezeptorgens nach erfolgreicher Transfektion. In dieser Arbeit war die Glukoseaufnahme der Klone mit geringer IGF-I Rezeptorexpression gesteigert. Das spricht dafür, dass bei den nicht transfizierten H9c2-Zellen eine gewisse Leistung durch den IGF-I Rezeptor übernommen werden kann. Die Insulinwirkung des Insulinrezeptors kann auf zellulärer Ebene nicht durch den IGF-I Rezeptor ersetzt oder als gleich eingestuft werden.

Ein weiteres bemerkenswertes Ergebnis ergab eine Studie von Jospe. Hier wurden die Zellen eines Patienten, der an Leprechaunismus erkrankt war, untersucht. Der homozygote Insulinrezeptordefekt betraf die extrazelluläre Untereinheit und daraus resultierte das Fehlen des Insulinrezeptors an der Oberfläche. Versuche mit Fibroblasten aus einem entzündeten Hautareal dieses Patienten zeigten, dass bei fehlendem Insulinrezeptor der Insulineffekt über den IGF-I Rezeptor vermittelt wurde. Des Weiteren wurde die These vertreten, dass die phänotypischen und metabolischen Merkmale des Leprechaunismus durch eine Kombination aus Mangel bzw. Fehlen des Insulinrezeptors und einer Überaktivität des IGF-I Rezeptors verursacht wurden (Jospe et al., 1996).

In einer anderen Veröffentlichung wurde mit Muskelzelllinien von Insulinrezeptor-Knockout-Mäusen gearbeitet. Es wurde ein IGF-I Substrat Bindungsversuch (mit  $^{125}\text{I}$ -IGF-I) vorgenommen. Hier kam man zu dem Resultat, dass die Bindung in den Knockout- und in den Wildtypzellen, die mit dem Insulinrezeptor ausgestattet waren, nahezu gleiche Werte ergaben. Daraus wurde gefolgert, dass kein quantitativer Anstieg des IGF-I Rezeptors in Abwesenheit des Insulinrezeptors erfolgte (Baudry et al., 2001). Hier lässt sich anmerken, dass z. B. eine Western Blot-Analyse zu einer weiteren Verifizierung der Daten beigetragen hätte. So wäre dann eine Aussage über die tatsächliche Expression des Insulin-like Growth Factor-I Rezeptor möglich. In der gleichen Veröffentlichung wurde anhand dieses und weiterer Versuche gezeigt, dass die Funktion des IGF-I Rezeptors nicht nur im Bereich des zellulären Wachstums und der Differenzierung liegt. Hier wurde im Rahmen von *in vitro* Studien beschrieben, dass die metabolischen Effekte des IGF-I Rezeptors bei differenzierten Muskelzellen mit denen des Insulinrezeptors vergleichbar sind (Baudry et al., 2001).

Die Diskrepanz der verschiedenen Ergebnisse lässt sich zumindest teilweise durch die Verwendung von verschiedenen Zellen bzw. Zellsystemen erklären. In der vorliegenden Arbeit wird die These vertreten, dass der IGF-I Rezeptor in Abwesenheit oder bei geringer Expression des Insulinrezeptors kompensatorisch ansteigt. Somit wird vermutlich in diesem Zellsystem die Erhaltung der Glukosehomöostase gewährleistet.

### **5.3. Auswirkung der stabilen Transfektion der H9c2-Zellen mit dem IR auf die Expression des GLUT1 und des GLUT4**

Die Plasmamembranen der Insulin-sensitiven Zellen sind für Glukose impermeabel. Um sie aufzunehmen, stehen geeignete Transportproteine zur Verfügung, die Glukosetransporter. Sie können in allen Geweben nachgewiesen werden. In dieser Arbeit waren der für einen Großteil der Glukoseaufnahme verantwortliche GLUT4 und der ubiquitär exprimierte GLUT1 von großem Interesse. Sie sind im Fettgewebe sowie im Herz- und Skelettmuskel stark vertreten. GLUT1 ist auch im basalen/nüchternen Zustand

zahlreich in der Plasmamembran der Zellen lokalisiert. Ihm wird die Funktion der Aufrechterhaltung der basalen Glukoseaufnahme der Zelle zugeschrieben (Gould & Bell, 1990; Mueckler, 1994). In unserer Arbeitsgruppe konnten beide Isoformen schon früher in den H9c2-Zellen nachgewiesen werden (Kutscher, 1993).

Die Detektion des GLUT1 in den H9c2-Zellen und den Klonen gelang in der vorliegenden Arbeit bei einem Molekulargewicht von ca. 50 kDa und stimmt somit mit vorliegenden Literaturdaten aus anderen Untersuchungen überein (Kutscher Diplomarbeit, 1993; Murette et al., 1992; Gould, 1990). In den Klonen war ein stärkeres Signal als in den H9c2-Zellen nachweisbar. Die Hauptaufgabe des GLUT1 besteht vermutlich in der Grundversorgung der Zellen mit Glukose. Dies führt zu der Vermutung, dass die Translokation und die Expression nicht oder nur zu einem geringen Anteil Insulin-abhängig sind. Dementsprechend ist der GLUT1 vermutlich größtenteils in der Plasmamembran lokalisiert (Goodyear et al., 1991; Assimacopoulos-Jeannet et al., 1990). Die Insulin-abhängige Expression des GLUT1 in Insulin-sensitiven Geweben wird in der Literatur allerdings kontrovers diskutiert. Es ergaben sich unterschiedliche Ergebnisse bei der Untersuchung verschiedener Zellen (Shefi- Friedman et al., 2001; von Holtey, 1996; Sargeant & Pâquet, 1993; Kozka et al., 1991 Walker et al., 1990). Es wird diskutiert, inwieweit die gesteigerte Expression des Insulinrezeptors einen Einfluss auf die Grundversorgung der Zelle mit Glukose und auf die Expression des GLUT1 nimmt. In einer Studie mit Skelettmuskelzellen von Insulinrezeptor-Knockout-Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Knockout-Mäuse eine geringe Erhöhung der GLUT1-Expression gegenüber dem mit dem Insulinrezeptor ausgestatteten Wildtyp aufwiesen (Shefi- Friedman et al., 2001). Dieses Ergebnis ist nicht direkt mit der hier vorliegenden Arbeit in Einklang zu bringen. Hier wurde eine Erhöhung der GLUT1-Expression bei Überexpression des Insulinrezeptors gemessen. Die sich hieraus ergebene Diskrepanz lässt sich eventuell durch die Verwendung der verschiedenen Zellsysteme erklären. Die Expression des GLUT1 ist nicht nur gewebespezifisch, sondern soll auch entwicklungspezifisch reguliert werden. GLUT1 wird in embryonalen bzw. wenig differenzierten Stadien vermehrt exprimiert (Mitsumoto & Klip, 1992). Diese These ist aber in dem vorliegenden Fall nur von untergeordneter Bedeutung. Die Tatsache, dass die Klone mehr GLUT1 als die H9c2-Zellen

exprimieren und die Mechanismen, die dazu führen, sind somit nicht sicher geklärt. Man kann mutmaßen, dass die genetisch veränderten Zellen einen erhöhten basalen Glukoseverbrauch aufweisen und somit eine quantitative Erhöhung des GLUT1 indiziert wird. Da diese Möglichkeit in dieser Arbeit nicht untersucht wurde, bleibt sie vorerst nur eine mögliche These.

In den Geweben, in denen der GLUT4 vornehmlich lokalisiert ist, wird ihm ein großer Anteil an der Steigerung der intrazellulären Glukoseaufnahme zugeschrieben. Nach Insulinstimulation erfolgt die Translokation des GLUT4 (Harney et al., 1991; James et al., 1988) aus einem intrazellulär gelegenen Vesikelpool zur Plasmamembran der Zelle (Martin et al., 1999; Zorzano et al., 1998; Rea & James, 1997). Dieser Mechanismus ist, auch für kardiales Gewebe, bereits von unserer Arbeitsgruppe beschrieben worden (Dransfeld, 2001; Eckel et al., 2000; Fischer et al., 1997).

In der hier vorliegenden Arbeit wurde bei den Klonen eine Abnahme der GLUT4-Expression gemessen. In verschiedenen Studien konnte belegt werden, dass die Expression des GLUT4 in unterschiedlichen Geweben wie Herz (Wang, 1999), Adipozyten (Tordjman, 1989) und Skelettmuskel (Klip et al., 1991; Mitsumoto et al., 1991; Mitsumoto et al., 1992) erst in entwickelten und differenzierten Stadien stärker ausgeprägt ist. Auch bei den H9c2-Zellen wurde im Myoblasten-Stadium eine sehr geringe GLUT4-Expression gezeigt. Diese steigerte sich aber mit der Entwicklung zur Myotube (Dransfeld, 2001; Lu et al., 1997). In anderen Studien wurde beschrieben, dass die differenzierten H9c2-Zellen zwar eine gesteigerte GLUT4-Expression aufwiesen, aber die Glukoseaufnahme nach Insulinstimulus nicht signifikant gesteigert werden konnte (Yu et al., 2000; Yu et al., 1999; Tsiani et al., 1998). Hieraus könnte man folgern, dass die Wirkung des Insulins eventuell schon auf der Insulinrezeptorebene nicht ausreichend vermittelt werden konnte. Darüber hinaus wurde an anderer Stelle (Bahr et al., 1996) gezeigt, dass die H9c2-Zellen nur wenig Insulinrezeptor exprimieren. In Arbeiten mit der Muskelzelllinie C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> wurde belegt, dass eine GLUT4-Überexpression nicht ausreichend oder ausschlaggebend ist, um eine Steigerung der Insulinsensitivität dieser Zellen zu indizieren (Kotilar & Pilch, 1992). Zu einem davon abweichenden Ergebnis führte eine Untersuchung in unserer Arbeitsgruppe. Hier wurden aus H9c2-

Myoblasten, die den GLUT4 nur wenig exprimierten, Subklone mit stabiler GLUT4-Überexpression hergestellt (Dransfeld et al., 2000). Einer der Klone (H9K6) zeigte nach Insulinstimulation eine, im Vergleich zu den H9c2-Myoblasten, signifikante Steigerung der Glukoseaufnahme um 60-70 %.

Aus welchem Grund weniger GLUT4 in den Klonen nachgewiesen wurde und warum es trotzdem zu einer Steigerung der Glukoseaufnahme kam, bleibt in der vorliegenden Arbeit letztlich unklar. Es gibt viele Faktoren, die die GLUT4-Expression beeinflussen können. In unserer Arbeitsgruppe war schon lange bekannt, dass frisch isolierte Kardiomyozyten der Ratte den GLUT4 stark exprimieren. Nach 48 Stunden in Primärkultur unterlag die GLUT4-Transkription aber einer Degradierung (Dransfeld et al., 2000; von Holtey, 1996). Ein sehr wichtiger Faktor, der ebenfalls auf die Transkription des GLUT4 Einfluss nimmt, ist das Insulin (von Holtey, 1996). In primären, ventrikulären Kardiomyozyten und fetalen, braunen Adipozyten induziert das Hormon einen Anstieg der GLUT4 mRNA (Tereul et al., 1996; Petersen et al., 1995). Bei 3T3-L1 Zellen und L6 Muskelzellen wurden andererseits abfallende mRNA-Level gemessen (Thomson et al., 1997; Koivisto et al., 1991). Es wurden noch eine ganze Reihe weiterer Faktoren untersucht, die die GLUT4-Expression regulieren können. So sollen z. B. auch körperliches Training und das Thyreoidhormon zu einem Anstieg der mRNA des GLUT4 in der Skelettmuskulatur von Mäusen und Ratten führen (Ezaki, 1997). Im Gegensatz dazu scheint Ernährung mit fettigen Speisen zu einem Abfall des endogenen GLUT4 mRNA-Levels zu führen (Ezaki, 1997).

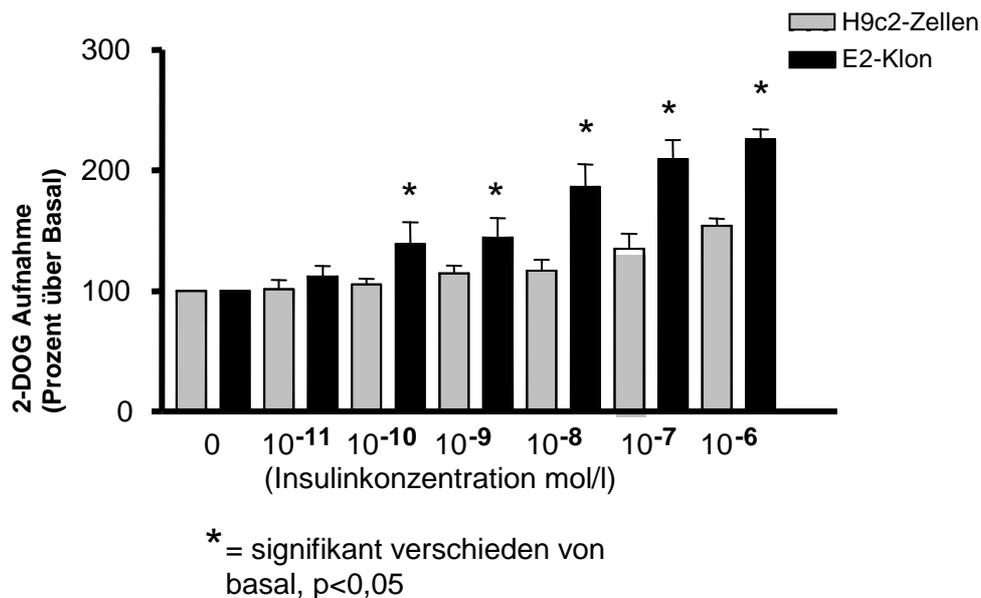
Wie im Ergebnisteil dieser Arbeit bereits beschrieben, war eine deutliche Steigerung der Glukoseaufnahme des E2-Klon im Vergleich zu den H9c2-Zellen zu beobachten. Das heißt, dass das System zum einen deutlich Insulin-sensitiv ist und zum anderen die GLUT4-Expression dieser Zellen verringert ist. Deshalb liegt die Vermutung nahe, dass zumindest in diesem Zellsystem die Quantität der Expression des GLUT4 nicht das entscheidende Kriterium für einen gesteigerten Glukose-Uptake ist. Warum es letztlich, trotz verringerter GLUT4-Expression, zu einer so deutlich gesteigerten Glukoseaufnahme der Zellen kommt, sollte zukünftig noch weiter untersucht werden.

#### 5.4. Auswirkung der stabilen Transfektion der H9c2-Zellen mit dem IR auf die zelluläre Glukoseaufnahme

Praktisch alle in der Literatur beschriebenen Zelllinien und Muskelzellsysteme verfügen über nur geringe Insulinsensitivität. Auch die H9c2-Zellen weisen diese typische Eigenschaft dieser Zelllinien auf. Die Insulinrezeptorexpression ist eher niedrig und zeigt außerdem nur eine relativ geringe Insulinsensitivität bei einer halbmaximalen Stimulation der Glukoseaufnahme bei 10 nM (Dransfeld, 2001).

In der hier vorliegenden Arbeit konnte im Ergebnisteil gezeigt werden, dass einige Klone nach der Transfektion eine deutlich gesteigerte IR-Expression aufwiesen. Eine zentrale Frage der vorliegenden Arbeit war, ob sich bei der Glukosetransportermessung eine gesteigerte Insulinsensitivität bei den Klonen nachweisen lassen würde. Initial wurde eine 2-Desoxyglukosetransportmessung mit der maximalen Insulinstimulation ( $10^{-6}$  mol/l Insulin) durchgeführt. Hierbei zeigten einige Klone vergleichbare Werte zu der Glukoseaufnahme der H9c2-Zellen. Der E2-Klon konnte allerdings eine bis zu 300 % gesteigerte Glukoseaufnahme zu Basal aufweisen. Diese Untersuchung zeigte eindeutig, dass sich die Insulinsensitivität der Zellen und somit der Glukose-Uptake der Zellen nach der Transfektion deutlich erhöht hatte.

Ein weiterer Versuch mit dem aus einer H9c2-Zelllinie stammenden E2-Klon führte zu einem interessanten Ergebnis. Bei der Glukosetransportmessung mittels Dosiswirkungskurve ließ sich bei dem Klon, im Vergleich zu den H9c2-Zellen, eine signifikant gesteigerte Glukoseaufnahme auch im physiologischen Bereich ( $10^{-10}$  mol/l Insulin) messen (siehe Abbildung 16).



**Abb. 16: Dosiswirkungskurve der 2-DOG-Aufnahme der H9c2-Zellen und dem Klon E2.**

Basierend auf dieser Datenlage kann man den E2-Klon als Insulin-sensitives Zellsystem betrachten. Die Klonierung der H9c2-Zellen mit dem Insulinrezeptor hat offensichtlich dazu geführt, dass sich die Glukoseaufnahme der Zellen erhöhte. Welche Bedeutung hat also die Quantität oder die Qualität des Insulinrezeptors in diesem Zusammenhang?

In verschiedenen früheren Arbeiten wurde die Frage erörtert, ob eine Mutation oder das Fehlen des Insulinrezeptors die Genese des Diabetes mellitus Typ 2 begünstigt oder auslöst. Einige natürlich auftretende Mutationen des menschlichen Insulinrezeptorgens konnten im Zusammenhang mit Syndromen, die mit einer ausgeprägten Insulinresistenz einhergehen, beschrieben werden (Krook & O'Rahilly 1996). Das seltene Donhues Syndrom (Leprechaunismus) tritt infolge von Fehlen funktionierender Insulinrezeptoren oder bei Rezeptordefekten auf Grund von Mutationen auf. Diese Erkrankung geht mit niedrigem Geburtsgewicht bei Säuglingen, Hyperinsulinämie, Hypertrophie der Langerhans-Inseln, Hepatosplenomegalie, psychomotorische Retardierung, Hypertrophie der Klitoris und der Labia minora, Minderwuchs, Hypertrichose, Acanthosis nigricans und anderen Symptomen einher (Pschyrembel klinisches Wörterbuch, 258. Auflage 1998). Die beschriebenen Mutationen des Insulinrezeptors, die zum Donohues Syndrom oder dem Rabson-Mendenhall Syndrom führen, wurden bisher selten beschrieben.

Bei jungen Insulinrezeptor-Knockout-Mäusen wurde eine starke diabetische Ketoazidose, Hyperlipidämie, Fettleber und ein Sterben der Mäuse in der ersten Lebenswoche beobachtet (Accili et al., 1996; Joshi et al., 1996). Ein reduzierter Autoaktivierungsstatus des Insulinrezeptors bei Skelettmuskelzellen von Diabetes Typ 2 Patienten wurde in verschiedenen Studien beschrieben (Nolan et al., 1994; Maegawa et al., 1991; Obermaier- Kusser et al., 1989; Arner et al., 1987). Diese verminderte Insulinrezeptor-Autophosphorylierung kann das Insulinsignaling negativ beeinflussen und so zur Insulinresistenz der Skelettmuskulatur bei Typ 2 Diabetiker beitragen. Andere Untersuchungen zeigten, dass die Kinaseaktivität als absolut essentiell für die biologische Aktivität des Insulinrezeptors einzustufen ist. Natürliches Auftreten und auch künstlich hergestellte Insulinrezeptor-Mutanten ohne Kinaseaktivität waren nicht in der Lage, intrazelluläre, physiologische Signale zu vermitteln (Krook und O´Rahilly., 1996; Cama et al., 1991; Chou et al., 1987).

Es wurden über 100 Mutationen des Insulinrezeptorgens beschrieben. Taylor hat diese Mutationen in 5 verschiedene Klassen eingeteilt (Taylor, 1992). Phänotypen, die mit diesen Mutationen einhergehen, zeigen ein weites Symptomspektrum. Hierzu gehören: Starke Insulinresistenz des Gewebes bis hin zu milden Formen, Akanthosis nigricans, Wachstumsretardierung in Verbindung mit Leprechaunismus und Rabson-Mendenhall Syndrom. Glukoseintoleranz und auch Mutationen ohne offensichtliche klinische Symptome wurden beschrieben.

Eine abweichende Sichtweise, im Zusammenhang zu dem oben gesagten, zeigten andere Forschungsergebnisse. Brüning untersuchte die Skelettmuskulatur von Muskel-spezifischen Insulinrezeptor-Knockout-Mäusen. Das heißt, dass diese Mäuse über keinen oder fast keinen Insulinrezeptor in den Skelettmuskelzellen verfügen. Andere Insulin-sensitive Gewebe, wie die Adipozyten und die Hepatozyten weisen keine verminderte Expression auf (Brüning et al., 1998). Hier konnte überraschenderweise gezeigt werden, dass die Mäuse keine signifikanten Störungen der Glukosehomöostase aufwiesen, aber einige andere Symptome des metabolischen Syndroms zeigten (Brüning et al., 1998).

Häufig wurde folgender Aspekt untersucht: Ist ein Defekt, der zu verminderter Autophosphorylierung führt, an einer Ätiologie des Typ- 2 Diabetes beteiligt?

Eine Studie von Krook ergab, dass die Insulinrezeptor-Autophosphorylierung in Skelettmuskelzellen von mäßig adipösen Typ 2 Diabetikern, im Vergleich zu einer Kontrollgruppe gleichen Alters, Gewichts und Fitness, nicht erniedrigt war (Krook et al., 2000). In einer neueren Studie von Gourni-Berthold und seinen Mitarbeitern wurde eine große Anzahl von Probanden aus der deutschen Bevölkerung untersucht (Gourni-Berthold et al., 2005). Es sollte der Zusammenhang zwischen der Pro378Leu-Variante der Proteintyrosinphosphatase-1B (PTB-1B) und einem erhöhten Risiko für Typ 2 Diabetes untersucht werden. Die PTB-1B dephosphoryliert verschiedene Prokinasen *in vitro*. Zu ihnen gehört auch die  $\beta$ -Untereinheit des Insulinrezeptors. Für die in diesem Versuch untersuchte, deutsche Bevölkerung konnte keine Assoziation zwischen dem Polymorphismus und einem erhöhten Krankheitsrisiko für Typ 2 Diabetes nachgewiesen werden. Auch in einer vergleichbaren Studie, bei der Polymorphismen des Thyrosinphosphatase-1B-Gens und die Assoziation zum Typ 2 Diabetes in einer finnischen Population untersucht wurde, konnte kein erhöhtes Diabetesrisiko nachgewiesen werden (Santaniemi et al., 2004).

In einer Studie von Krook und Mitarbeitern wurden zwei natürlich vorkommende Mutanten der Insulinrezeptortyrosinkinase, die bei Patienten mit Insulinresistenz gefunden wurden, untersucht. Die Mutationen wurden in CHO-Zellen (Chinese hamster ovary cells) transfiziert, sodass sie stabil überexprimiert wurden (Krook et al., 1997). In dieser Studie wurde unter anderem gezeigt, dass diese Mutanten eine Beeinträchtigung der Aktivierung des Transkriptionsfaktor Elk-1 durch den Insulinrezeptor aufwiesen. Der Transkriptionsfaktor Elk-1 initiiert die Translokation des GLUT4 zur Plasmamembran. Dieses Ergebnis spricht für eine Abhängigkeit der GLUT4-Translokation und der Qualität bzw. Quantität des Insulinrezeptors in diesen Zellen. Ein weiteres interessantes Ergebnis ergab eine Studie von M. Caruso und ihrer Arbeitsgruppe. Hier wurden L6-Myotuben (Skelettmuskelzellen), in die man die Mutation des Arg<sup>1152</sup> Insulinrezeptors stabil transfizierte, detailliert betrachtet. Die transfizierten Zellen zeigten nach Insulinstimulation einen niedrigeren Glukoseresponse als der Wildtyp. Des Weiteren konnte durch Insulin in den L6-Wildtypzellen eine erhöhte Expression von GLUT1 und GLUT4 in der Plasmamembran gemessen werden. Bei den L6<sup>1152</sup>-Zellen waren die Glukosetransporter ebenfalls

vorhanden. In den Mutanten konnte aber durch Insulinstimulation keine höhere Expression festgestellt werden. Es gibt eine weitere Studie, die sich mit der gezielten Ablation des Insulinrezeptors beschäftigte. In dieser Untersuchung wurden Mäuse mit einem variablen Mosaik für Insulinrezeptor-Nullallele präpariert (Kitamura et al., 2004). Es wurden unter anderem das Wachstum der Tiere und das Lebergewebe und die Muskulatur untersucht. In dieser Arbeit wird die These vertreten, dass das Insulin unabhängig vom Metabolismus auch das Wachstum beeinflusst. Eine 80 %ige Ablation des Insulinrezeptors der Zellen führte zu einer deutlichen Wachstumsretardierung, Lipoatrophie und Hypoglykämie. Des Weiteren wurde herausgefunden, dass eine 98 %ige Ablation zu einem Diabetes ohne  $\beta$ -Zellhyperplasie und auch zu Wachstumsretardierung und Lipoatrophie führte. In dieser Studie war die Wachstumsretardierung assoziiert mit einer 60fach erhöhten Expression des hepatischen Insulin-like Growth Factor-I. Die Autoren folgerten aus diesen Ergebnissen, dass Wachstum und Metabolismus unabhängig voneinander durch Insulin reguliert werden und dass die Anzahl der Insulinrezeptoren entscheidend für die Spezifität der Insulinaktion ist (Kitamura et al., 2004).

Die Kernergebnisse der vorliegenden Arbeit sind: Eine gute Insulinsensitivität, eine gesteigerte Glukoseaufnahme der Zellen und ein niedrig exprimierter IGF-I Rezeptor. Die erhobenen Daten weisen in eine Richtung und somit liegt die Vermutung nahe, dass in diesem Zellsystem, durch Erhöhung der Insulinrezeptorzahl, eine gesteigerte Interaktion mit dem Hormon Insulin resultierte. Wahrscheinlich ist eine Mutation oder das gänzliche Fehlen des Insulinrezeptors allgemein nicht als zwingend beteiligt oder gar als Auslöser des Diabetes mellitus Typ 2 anzusehen. Jedoch scheint die Steigerung der Quantität des Rezeptors in nur gering sensitivem Gewebe einen deutlichen Effekt auf die Glukoseaufnahme der Zelle zu haben.

Kontrovers betrachten kann man, wie sich das Verteilungsmuster der beiden relevanten Glukosetransporter GLUT1 und GLUT4 letztlich erklären lässt und welcher Zusammenhang zu der Überexpression des Insulinrezeptors im E2-Klon besteht. Man könnte vermuten, dass sich die Überexpression des Insulinrezeptors direkt oder indirekt auf die Transkription der Glukosetransporter in den Subklonen auswirkt. Vor allem die erniedrigte GLUT4-Expression spricht

dafür, dass letztlich die Überexpression des Insulinrezeptors ausschlaggebend für die Regulation der Insulinaufnahme in diesem Zellsystem ist. Trotz wenig GLUT4-Expression erfolgte eine deutlich gesteigerte Glukoseaufnahme der Zellen. Eine weitere Schlussfolgerung ist, dass durch den quantitativen Anstieg der Insulinrezeptorzahl mehr Insulin an die einzelne Zelle gebunden werden kann. Dies könnte eine schnellere Translokation des GLUT4 innerhalb der Zelle vermitteln und ihn somit suffizienter arbeiten lassen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die Transfektion der H9c2-Muskelzelllinie mit dem Insulinrezeptor Zellen entstanden, die einen guten Glukose-Uptake aufweisen. Dadurch ist das Gewebe in der Lage, die extrazelluläre Glukosekonzentration zu senken. Auch wenn die periphere Insulinresistenz nicht der einzige Auslöser der komplexen Erkrankung Diabetes mellitus ist, so spielt sie unumstritten eine bedeutende Rolle in der Genese. Entscheidend ist die Verbesserung des Verständnisses der Vorgänge auf molekularer Ebene. In diesem Zusammenhang kann man den hier charakterisierten E2-Klon als ein neues und interessantes Zellsystem betrachten, mit dem man in der Zukunft weitere Untersuchungen der Insulinsignalkaskade und ihrer verschiedenen Elemente vornehmen sollte.

## 6. Zusammenfassung

Als die wichtigsten Zielgewebe für das Hormon Insulin gelten das Fettgewebe, der Skelett- und der Herzmuskel. Die Insulin-induzierte Glukoseaufnahme dieser Gewebe trägt zu einem großen Teil zu der postprandialen Erniedrigung des Blutzuckerspiegels bei. Die periphere Insulinresistenz wird als ein herausragender Faktor in der Entstehung des Diabetes mellitus Typ 2 angesehen. Um Untersuchungen der peripheren Insulinresistenz vorzunehmen, hat sich in den letzten Jahren das Verwenden von Muskelzelllinien weitläufig etabliert. Aufgrund des zuverlässigen Wachstums und der Stabilität wurde in dieser Arbeit die H9c2-Zelllinie verwendet. Dieses Zellsystem verfügt nur über geringe Insulinsensitivität und der Insulinrezeptor (IR) wird schwach exprimiert. Basierend auf diesem Hintergrund wurden im Rahmen dieser Arbeit die H9c2-Zellen mit dem Vektor, der den humanen Insulinrezeptor codiert, transfiziert. Es entstanden 14 verschiedene Subklone, die alle eine stabile Überexpression für den Insulinrezeptor aufwiesen. Der E2-Klon wurde mittels gezielter Versuche herausselektiert. Die Western Blot-Analysen zeigten eine bis zu 15fach gesteigerte Expression des Insulinrezeptors im Vergleich zu den H9c2-Zellen. Auch bei der Insulinbindungsmessung konnten hohe Werte nachgewiesen werden. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die Expression des IGF-I Rezeptors nur noch gering ausgeprägt war. Im Vergleich dazu zeigten die H9c2-Zellen eine starke Expression dieses Rezeptors. Die Expression des GLUT1 war bei dem Klon leicht erhöht, was für eine gesteigerte basale Glukoseaufnahme der Zellen sprechen kann. Die Expression des GLUT4 war auch in den Klonen nachweisbar. Sie konnte aber bei den H9c2-Zellen stärker detektiert werden. Der Kernpunkt dieser Arbeit ist die erhöhte Glukoseaufnahme des E2-Klons. Bei den Glukosetransportmessungen zeigte er bei maximaler Insulinstimulation stark gesteigerte Ansprechbarkeit. Auch bei physiologischer Konzentration des Hormons konnte, im Gegensatz zu den H9c2-Zellen, eine signifikante Ansprechbarkeit gemessen werden. Diese Insulinsensitivität einer Muskelzelllinie ist bisher noch nicht beschrieben worden. Das macht diese Zellen sicherlich zu einem interessanten System für weitere Versuche im Zusammenhang mit der molekularen Insulinwirkung und der peripheren Insulinresistenz.

## 7. Literatur

**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;12:106-9.

**Aguilar-Bryan L, Nichols CG, Wechsler SW, Clement JP 4th, Boyd AE 3rd, Gonzalez G, Herrera-Sosa H, Nguy K, Bryan J, Nelson DA.**

Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion.

Science. 1995;68:423-6.

**Alessi DR, Downes CP.**

The role of PI 3-kinase in insulin action.

Biochim Biophys Acta. 1998;1436:151-64.

**American Diabetes Association**

Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus.

Diabetes Care. 2005;28:37-S42.

**Arner P, Pollare T, Lithell H, Livingston JN.**

Defective insulin receptor tyrosine kinase in human skeletal muscle in obesity and type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus.

Diabetologia. 1987;437-40.

**Assimacopoulos-Jeannet F, Cusin I, Greco-Perotto RM, Terrettaz J, Rohner-Jeanrenaud F, Zarjevski N, Jeanrenaud B.**

Glucose transporters: structure, function, and regulation.

Biochimie. 1991;73:67-70.

**Assimacopoulos-Jeannet F, Jeanrenaud B.**

Insulin activates 6-phosphofructo-2-kinase and pyruvate kinase in the liver.

Indirect evidence for an action via a phosphatase.

J Biol Chem. 1990;265:7202-6.

**Avruch J, Alexander MC, Palmer JL, Pierce MW, Nemenoff RA, Blackshear PJ, Tipper JP, Witters LA.**

Role of insulin-stimulated protein phosphorylation in insulin action.

Fed Proc. 1982;41:2629-33.

**Backer JM, Myers MG Jr, Shoelson SE, Chin DJ, Sun XJ, Miralpeix M, Hu P, Margolis B, Skolnik EY, Schlessinger J, et al.**

Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation.

EMBO J. 1992;11:3469-79.

**Bahr M, Kolter T, Seipke G, Eckel J.**

Growth promoting and metabolic activity of the human insulin analogue [GlyA21,ArgB31,ArgB32]insulin (HOE 901) in muscle cells.  
Eur J Pharmacol. 1997;320:259-65.

**Bahr M, Spelleken M, Bock M, von Holtey M, Kiehn R, Eckel J.**

Acute and chronic effects of troglitazone (CS-045) on isolated rat ventricular cardiomyocytes.  
Diabetologia. 1996;39:766-74

**Barnett AH, Spiliopoulos AJ, Pyke DA, Stubbs WA, Burrin J, Alberti KG.**

Metabolic studies in unaffected co-twins of non-insulin-dependent diabetics.  
Br Med J (Clin Res Ed). 1981;282:1656-8.

**Baudry A, Lamothe B, Bucchini D, Jami J, Montarras D, Pinset C, Joshi RL.**

IGF-1 receptor as an alternative receptor for metabolic signaling in insulin receptor-deficient muscle cells.  
FEBS Lett. 2001;488:174-8.

**Blenis J.**

Signal transduction via the MAP kinases: proceed at your own RSK.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1993;90:5889-92

**Bliss M.**

Banting's, Best's, and Collip's accounts of the discovery of insulin.  
Bull Hist Med. 1982;56:554-68.

**Bruning JC, Michael MD, Winnay JN, Hayashi T, Horsch D, Accili D, Goodyear LJ, Kahn CR.**

A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance.  
Mol Cell. 1998;2:559-69.

**Bryant NJ, Govers R, James DE.**

Regulated transport of the glucose transporter GLUT4.  
Nat Rev Mol Cell Biol. 2002;3:267-77.

**Cama A, de la Luz Sierra M, Ottini L, Kadowaki T, Gorden P, Imperato-McGinley J, Taylor SI.**

A mutation in the tyrosine kinase domain of the insulin receptor associated with insulin resistance in an obese woman.  
J Clin Endocrinol Metab. 1991;73:894-901.

**Chan SJ, Keim P, Steiner DF.**

Cell-free synthesis of rat preproinsulins: characterization and partial amino acid sequence determination.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1976;73:1964-8.

**Chou CK, Dull TJ, Russell DS, Gherzi R, Lebwohl D, Ullrich A, Rosen OM.**  
Human insulin receptors mutated at the ATP-binding site lack protein tyrosine kinase activity and fail to mediate postreceptor effects of insulin.  
J Biol Chem. 1987;262:1842-7

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

**Coniff RF, Shapiro JA, Seaton TB, Hoogwerf BJ, Hunt JA.**  
A double-blind placebo-controlled trial evaluating the safety and efficacy of acarbose for the treatment of patients with insulin-requiring type II diabetes.  
Diabetes Care. 1995;18:928-32.

**Cuatrecasas P.**  
Affinity chromatography and purification of the insulin receptor of liver cell membranes.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1972;69:1277-81.

**Cushman SW, Wardzala LJ.**  
Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell. Apparent translocation of intracellular transport systems to the plasma membrane.  
J Biol Chem. 1980; 255:4758-62.

**DeFronzo RA.**  
Lilly lecture 1987. The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM.  
Diabetes. 1988;37:667-87.

**DeFronzo RA.**  
Obesity is associated with impaired insulin-mediated potassium uptake.  
Metabolism. 1988; 37:105-8.

**DeFronzo RA, Gunnarsson R, Bjorkman O, Olsson M, Wahren J.**  
Effects of insulin on peripheral and splanchnic glucose metabolism in noninsulin-dependent (type II) diabetes mellitus.  
J Clin Invest. 1985;76:149-55.

**Dhand R, Hiles I, Panayotou G, Roche S, Fry MJ, Gout I, Totty NF, Truong O, Vicendo P, Yonezawa K.**  
PI 3-kinase is a dual specificity enzyme: autoregulation by an intrinsic protein-serine kinase activity.  
EMBO J. 1994;13:522-33.

**Docherty K and Steiner DF.**  
**Molecular and cellular biology of the beta-cell.**  
*In: Porte D, Sherwin RS (eds) Ellenberg & Rifkin's Diabetes mellitus, Appleton & Lange*  
Stamford. 1997;5:29-48

**Doege H, Bocianski A, Joost HG, Schurmann A.**

Activity and genomic organization of human glucose transporter 9 (GLUT9), a novel member of the family of sugar-transport facilitators predominantly expressed in brain and leucocytes.

Biochem J. 2000;350:771-6.

**Doege H, Bocianski A, Scheepers A, Axer H, Eckel J, Joost HG, Schurmann A.**

Characterization of human glucose transporter (GLUT) 11 (encoded by SLC2A11), a novel sugar-transport facilitator specifically expressed in heart and skeletal muscle.

Biochem J. 2001;359:443-9.

**Doege H, Schurmann A, Bahrenberg G, Brauers A, Joost HG.**

GLUT8, a novel member of the sugar transport facilitator family with glucose transport activity.

J Biol Chem. 2000;275:16275-80.

**Dransfeld O, Rakatzi I, Sasson S, Gruzman A, Schmitt M, Haussinger D, Eckel J.**

Eicosanoids participate in the regulation of cardiac glucose transport by contribution to a rearrangement of actin cytoskeletal elements.

Biochem J. 2001;359:47-54.

**Eckel J, Till M, Uphues I.**

Cardiac insulin resistance is associated with an impaired recruitment of phosphatidylinositol 3-kinase to GLUT4 vesicles.

Int J Obes Relat Metab Disord. 2000;24:120-1.

**Eckel J, Wirdeier A, Herberg L, Reinauer H.**

Insulin resistance in the heart: studies on isolated cardiocytes of genetically obese Zucker rats.

Endocrinology. 1985;116:1529-34.

**Elmendorf JS, Pessin JE.**

Insulin signaling regulating the trafficking and plasma membrane fusion of GLUT4-containing intracellular vesicles.

Exp Cell Res. 1999;253:55-62

**Ezaki O.**

Regulatory elements in the insulin-responsive glucose transporter (GLUT4) gene.

Biochem Biophys Res Commun. 1997;241:1-6.

**Fischer Y, Thomas J, Sevilla L, Munoz P, Becker C, Holman G, Kozka IJ, Palacin M, Testar X, Kammermeier H, Zorzano A.**

Insulin-induced recruitment of glucose transporter 4 (GLUT4) and GLUT1 in isolated rat cardiac myocytes. Evidence of the existence of different intracellular GLUT4 vesicle populations.

J Biol Chem. 1997;272:7085-92.

**Foster LJ, Klip A.**

Mechanism and regulation of GLUT-4 vesicle fusion in muscle and fat cells.  
Am J Physiol Cell Physiol. 2000;279:877-90.

**Frattali AL, Treadway JL, Pessin JE.**

Transmembrane signaling by the human insulin receptor kinase. Relationship between intramolecular beta subunit trans- and cis-autophosphorylation and substrate kinase activation.

J Biol Chem. 1992;267:19521-8.

**Gaster M, Handberg A, Schurmann A, Joost HG, Beck-Nielsen H, Schroder HD.**

GLUT11, but not GLUT8 or GLUT12, is expressed in human skeletal muscle in a fibre type-specific pattern.

Pflugers Arch. 2004;448:105-13.

**Goodyear LJ, Hirshman MF, Horton ES.**

Exercise-induced translocation of skeletal muscle glucose transporters.

Am J Physiol. 1991;261:795-9.

**Gould GW, Bell GI.**

Facilitative glucose transporters: an expanding family.

Trends Biochem Sci. 1990;15:18-23.

**Gouni-Berthold I, Giannakidou E, Muller-Wieland D, Faust M, Kotzka J, Berthold HK, Krone W.**

The Pro387Leu variant of protein tyrosine phosphatase-1B is not associated with diabetes mellitus type 2 in a German population.

J Intern Med. 2005;257:272-80.

**Greten H.**

Innere Medizin

10., überarbeitete und neu gestaltete Auflage. 2001

**Groop LC.**

Pathogenesis of insulin resistance in type 2 diabetes: a collision between thrifty genes and an affluent environment.

Drugs. 1999;58:75-82.

**Haffner SM, Miettinen H, Gaskill SP, Stern MP.**

Decreased insulin action and insulin secretion predict the development of impaired glucose tolerance.

Diabetologia. 1996;39:1201-7.

**Haney PM, Slot JW, Piper RC, James DE, Mueckler M.**

Intracellular targeting of the insulin-regulatable glucose transporter (GLUT4) is isoform specific and independent of cell type.

J Cell Biol. 1991;114:689-99.

**Harnack G.A. von**

Kinderheilkunde

11. Ausgabe, vollst. Überarb. und teilw. neu verf. Auflage. 2000

**Hescheler J, Meyer R, Plant S, Krautwurst D, Rosenthal W, Schultz G.**

Morphological, biochemical, and electrophysiological characterization of a clonal cell (H9c2) line from rat heart.

Circ Res. 1991;69:1476-86.

**Holman GD, Kasuga M.**

From receptor to transporter: insulin signalling to glucose transport.

Diabetologia. 1997;40:991-1003.

**Hu P, Mondino A, Skolnik EY, Schlessinger J.**

Cloning of a novel, ubiquitously expressed human phosphatidylinositol 3-kinase and identification of its binding site on p85.

Mol Cell Biol. 1993;13:7677-88.

**James DE, Brown R, Navarro J, Pilch PF.**

Insulin-regulatable tissues express a unique insulin-sensitive glucose transport protein.

Nature. 1988;333:183-5.

**Joost HG, Thorens B.**

The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review).

Mol Membr Biol. 2001;18:247-56.

**Joost HG, Bell GI, Best JD, Birnbaum MJ, Charron MJ, Chen YT, Doege H, James DE, Lodish HF, Moley KH, Moley JF, Mueckler M, Rogers S, Schurmann A, Seino S, Thorens B.**

Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators.

Am J Physiol Endocrinol Metab. 2002 A;282:E974-6.

**Joshi RL, Lamothe B, Cordonnier N, Mesbah K, Monthieux E, Jami J, Bucchini D.**

Targeted disruption of the insulin receptor gene in the mouse results in neonatal lethality.

EMBO J. 1996;15:1542-7.

**Jospe N, Kaplowitz PB, Furlanetto RW.**

Homozygous nonsense mutation in the insulin receptor gene of a patient with severe congenital insulin resistance: leprechaunism and the role of the insulin-like growth factor receptor.

Clin Endocrinol (Oxf). 1996;45:229-35.

**Kahn CR.**

Diabetes. Causes of insulin resistance.

Nature. 1995;373:384-5.

**Kahn CR.**

Banting Lecture. Insulin action, diabetogenesis, and the cause of type II diabetes. *Diabetes*. 1994;43:1066-84.

**Kandror KV, Pilch PF.**

Compartmentalization of protein traffic in insulin-sensitive cells. *Am J Physiol*. 1996;271:1-14.

**Kellerer M, Lammers R, Haring HU.**

Insulin signal transduction: possible mechanisms for insulin resistance. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 1999;107:97-106.

**Kitamura T, Kitamura Y, Nakae J, Giordano A, Cinti S, Kahn CR, Efstratiadis A, Accili D.**

Mosaic analysis of insulin receptor function. *J Clin Invest*. 2004;113:209-19.

**Klip A, Li G, Logan WJ.**

Induction of sugar uptake response to insulin by serum depletion in fusing L6 myoblasts. *Am J Physiol*. 1984;247:291-6.

**Koivisto UM, Martinez-Valdez H, Bilan PJ, Burdett E, Ramlal T, Klip A.**

Differential regulation of the GLUT-1 and GLUT-4 glucose transport systems by glucose and insulin in L6 muscle cells in culture. *J Biol Chem*. 1991;266:2615-21.

**Kolter T, Uphues I, Wichelhaus A, Reinauer H, Eckel J.**

Contraction-induced translocation of the glucose transporter Glut4 in isolated ventricular cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992;189:1207-14.

**Kotliar N, Pilch PF.**

Expression of the glucose transporter isoform GLUT 4 is insufficient to confer insulin-regulatable hexose uptake to cultured muscle cells. *Mol Endocrinol*. 1992;6:337-45.

**Kozka IJ, Clark AE, Holman GD.**

Chronic treatment with insulin selectively down-regulates cell-surface GLUT4 glucose transporters in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*. 1991;266:11726-31.

**Krook A, Bjornholm M, Galuska D, Jiang XJ, Fahlman R, Myers MG Jr, Wallberg-Henriksson H, Zierath JR.**

Characterization of signal transduction and glucose transport in skeletal muscle from type 2 diabetic patients. *Diabetes*. 2000;49:284-92.

**Krook A, O'Rahilly S.**

Mutant insulin receptors in syndromes of insulin resistance. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*. 1996;10:97-122.

**Kutscher U.**

Regulation der Glucosetransporter- Genexpression in H9c2-  
Herzmuskelzellen. Diplomarbeit, Düsseldorf. 1993

**Lernmark A.**

Glutamic acid decarboxylase--gene to antigen to disease.  
J Intern Med. 1996;240:259-77.

**LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT Jr.**

Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor.  
Endocr Rev. 1995;16:143-63.

**Lillioja S, Bogardus C.**

Obesity and insulin resistance: lessons learned from the Pima Indians.  
Diabetes Metab Rev. 1988;4:517-40.

**Lillioja S, Mott DM, Spraul M, Ferraro R, Foley JE, Ravussin E, Knowler WC, Bennett PH, Bogardus C.**

Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin-  
dependent diabetes mellitus. Prospective studies of Pima Indians.  
N Engl J Med. 1993;329:1988-92.

**Löffler**

Basiswissen Biochemie  
3., vollständig überarbeitete Auflage. 1999

**Lomedico PT, Saunders GF.**

Preparation of pancreatic mRNA: cell-free translation of an insulin-  
immunoreactive polypeptide.  
Nucleic Acids Res. 1976;3:381-91.

**Lu Z, Zaniewska E, Lo TC.**

Use of transport mutants to examine the identity and expression of GLUT  
isoforms in rat cardiac myoblasts.  
Biochem Mol Biol Int. 1997;41:103-21.

**Maegawa H, Shigeta Y, Egawa K, Kobayashi M.**

Impaired autophosphorylation of insulin receptors from abdominal skeletal  
muscles in nonobese subjects with NIDDM.  
Diabetes. 1991; 40:815-9.

**McVie-Wylie AJ, Lamson DR, Chen YT.**

Molecular cloning of a novel member of the GLUT family of transporters,  
SLC2a10 (GLUT10), localized on chromosome 20q13.1: a candidate gene for  
NIDDM susceptibility.  
Genomics. 2001;7:113-7.

**Marette A, Richardson JM, Ramlal T, Balon TW, Vranic M, Pessin JE, Klip A.**

Abundance, localization, and insulin-induced translocation of glucose transporters in red and white muscle.

Am J Physiol. 1992;263:443-52.

**Martin S, Slot JW, James DE.**

GLUT4 trafficking in insulin-sensitive cells. A morphological review.

Cell Biochem Biophys. 1999;30:89-113.

**Martin BC, Warram JH, Krolewski AS, Bergman RN, Soeldner JS, Kahn CR.**

Role of glucose and insulin resistance in development of type 2 diabetes mellitus: results of a 25-year follow-up study.

Lancet. 1992;340:925-9.

**Massague J, Guillette BJ, Czech MP.**

Role of disulfides in the subunit structure of the insulin receptor. Reduction of class I disulfides does not impair transmembrane signalling.

J Biol Chem. 1982;257:6729-38.

**McCusker RH, Kaleko M, Sackett RL.**

Multivalent cations and ligand affinity of the type 1 insulin-like growth factor receptor on P2A2-LISN muscle cells.

J Cell Physiol. 1998;176:392-401.

**Mitumoto Y, Burdett E, Grant A, Klip A.**

Differential expression of the GLUT1 and GLUT4 glucose transporters during differentiation of L6 muscle cells.

Biochem Biophys Res Commun. 1991;175:652-9.

**Mitumoto Y, Klip A.**

Development regulation of the subcellular distribution and glycosylation of GLUT1 and GLUT4 glucose transporters during myogenesis of L6 muscle cells.

J Biol Chem. 1992;267:4957-62.

**Mueckler M.**

Facilitative glucose transporters.

Eur J Biochem. 1994;219:713-25

**Mueckler M, Caruso C, Baldwin SA, Panico M, Blench I, Morris HR, Allard WJ, Lienhard GE, Lodish HF.**

Sequence and structure of a human glucose transporter.

Science. 1985;229:941-5.

**Musso C, Cochran E, Moran SA, Skarulis MC, Oral EA, Taylor S, Gorden P.**

Clinical course of genetic diseases of the insulin receptor (type A and Rabson-Mendenhall syndromes): a 30-year prospective.

Medicine (Baltimore). 2004;83:209-22.

**Nawroth PP.**

Kompendium Diabetologie  
Springer Verlag. 1999

**Nolan JJ, Freidenberg G, Henry R, Reichart D, Olefsky JM.**

Role of human skeletal muscle insulin receptor kinase in the in vivo insulin resistance of noninsulin-dependent diabetes mellitus and obesity.  
J Clin Endocrinol Metab. 1994;78:471-7.

**Nyomba BL, Ossowski VM, Bogardus C, Mott DM.**

Insulin-sensitive tyrosine kinase: relationship with in vivo insulin action in humans.  
Am J Physiol. 1990;258:964-74.

**Obermaier-Kusser B, White MF, Pongratz DE, Su Z, Ermel B, Muhlbacher C, Haring HU.**

A defective intramolecular autoactivation cascade may cause the reduced kinase activity of the skeletal muscle insulin receptor from patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus.  
J Biol Chem. 1989;264:9497-504.

**Olefsky JM, Nolan JJ.**

Insulin resistance and non-insulin-dependent diabetes mellitus: cellular and molecular mechanisms.  
Am J Clin Nutr. 1995;61:980-986.

**Olmos P, A'Hern R, Heaton DA, Millward BA, Risley D, Pyke DA, Leslie RD.**

The significance of the concordance rate for type 1 (insulin-dependent) diabetes in identical twins.  
Diabetologia. 1988;31:747-50.

**Ozanne SE, Nave BT, Wang CL, Shepherd PR, Prins J, Smith GD.**

Poor fetal nutrition causes long-term changes in expression of insulin signaling components in adipocytes.  
Am J Physiol. 1997;273:46-51.

**Perseghin G, Petersen K, Shulman GI.**

Cellular mechanism of insulin resistance: potential links with inflammation.  
Int J Obes Relat Metab Disord. 2003;27: 6-11.

**Pessin JE, Saltiel AR.**

Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance.  
J Clin Invest. 2000;106:165-9.

**Petersen S, Bahr M, Eckel J.**

Insulin-dependent regulation of Glut4 gene expression in ventricular cardiomyocytes: evidence for a direct effect on Glut4 transcription.  
Biochem Biophys Res Commun. 1995;213:533-40.

**Piper RC, Hess LJ, James DE.**

Differential sorting of two glucose transporters expressed in insulin-sensitive cells.

Am J Physiol. 1991;260:570-80.

**Pschyrembel klinisches Wörterbuch**

De Gruyter- Verlag 258. Auflage. 1998

**Quon MJ, Butte AJ, Zarnowski MJ, Sesti G, Cushman SW, Taylor SI.**

Insulin receptor substrate 1 mediates the stimulatory effect of insulin on GLUT4 translocation in transfected rat adipose cells.

J Biol Chem. 1994;269:27920-4.

**Rea S, James DE.**

Moving GLUT4: the biogenesis and trafficking of GLUT4 storage vesicles.

Diabetes. 1997;46:1667-77.

**Rogers S, Macheda ML, Docherty SE, Carty MD, Henderson MA, Soeller WC, Gibbs EM, James DE, Best JD.**

Identification of a novel glucose transporter-like protein-GLUT-12.

Am J Physiol Endocrinol Metab. 2002;282:E733-8.

**Sargeant RJ, Paquet MR.**

Effect of insulin on the rates of synthesis and degradation of GLUT1 and GLUT4 glucose transporters in 3T3-L1 adipocytes.

Biochem J. 1993;290:913-9.

**Seger R, Krebs EG.**

The MAPK signaling cascade.

FASEB J. 1995;9:726-35.

**Serrano R, Villar M, Martinez C, Carrascosa JM, Gallardo N, Andres A.**

Differential gene expression of insulin receptor isoforms A and B and insulin receptor substrates 1, 2 and 3 in rat tissues: modulation by aging and differentiation in rat adipose tissue.

J Mol Endocrinol. 2005;34:153-61.

**Shefi-Friedman L, Wertheimer E, Shen S, Bak A, Accili D, Sampson SR.**

Increased IGF activity and glucose transport in cultured skeletal muscle from insulin receptor null mice.

Am J Physiol Endocrinol Metab. 2001;281:16-24.

**Shepherd PR, Withers DJ, Siddle K.**

Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling.

Biochem J. 1998;333:471-90.

**Sherman WM, Katz AL, Cutler CL, Withers RT, Ivy JL.**

Glucose transport: locus of muscle insulin resistance in obese Zucker rats.

Am J Physiol. 1988; 255:374-82.

**Siddle K, Urso B, Niesler CA, Cope DL, Molina L, Surinya KH, Soos MA.**  
Specificity in ligand binding and intracellular signalling by insulin and insulin-like growth factor receptors.  
Biochem Soc Trans. 2001;29:513-25.

**Sipido KR, Marban E.**  
L-type calcium channels, potassium channels, and novel nonspecific cation channels in a clonal muscle cell line derived from embryonic rat ventricle.  
Circ Res. 1991;69:1487-99.

**Straus DS.**  
Regulation by insulin of cellular growth and proliferation: Relationship to the insulin-like growth factors. In: Draznin B, Melmed S and LeRoith D (eds) Insulin Action.  
A.R. Liss, 1989 New York:143

**Stumvoll M, Nurjhan N, Perriello G, Dailey G, Gerich JE.**  
Metabolic effects of metformin in non-insulin-dependent diabetes mellitus.  
N Engl J Med. 1995;333:550-4.

**Taha C, Klip A.**  
The insulin signaling pathway.  
J Membr Biol. 1999;169:1-12.

**Taylor SI, Cama A, Accili D, Barbetti F, Quon MJ, de la Luz Sierra M, Suzuki Y, Koller E, Levy-Toledano R, Wertheimer E.**  
Mutations in the insulin receptor gene.  
Endocr Rev. 1992;13:566-95.

**Teruel T, Valverde AM, Benito M, Lorenzo M.**  
Insulin-like growth factor I and insulin induce adipogenic-related gene expression in fetal brown adipocyte primary cultures.  
Biochem J. 1996;319:627-32.

**The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus** Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus.  
Diabetes Care. 1997;20:1183-1197

**Thieme**  
Thiemes Innere Medizin: TIM. 1999

**Thomson MJ, Williams MG, Frost SC.**  
Development of insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes.  
J Biol Chem. 1997;272:7759-64.

**Tillil H, Kobberling J.**  
Age-corrected empirical genetic risk estimates for first-degree relatives of IDDM patients.  
Diabetes. 1987;36:93-9.

**Tordjman KM, Leingang KA, James DE, Mueckler MM.**

Differential regulation of two distinct glucose transporter species expressed in 3T3-L1 adipocytes: effect of chronic insulin and tolbutamide treatment. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989;86:7761-5.

**Treadway JL, Morrison BD, Soos MA, Siddle K, Olefsky J, Ullrich A, McClain DA, Pessin JE.**

Transdominant inhibition of tyrosine kinase activity in mutant insulin/insulin-like growth factor I hybrid receptors. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991;88:214-8.

**Tsiani E, Bogdanovic E, Sorisky A, Nagy L, Fantus IG.**

Tyrosine phosphatase inhibitors, vanadate and pervanadate, stimulate glucose transport and GLUT translocation in muscle cells by a mechanism independent of phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase C. Diabetes. 1998;47:1676-86.

**Ullrich A, Bell JR, Chen EY, Herrera R, Petruzzelli LM, Dull TJ, Gray A, Coussens L, Liao YC, Tsubokawa M, .**

Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. Nature. 1985;313:756-61.

**Vollenweider P, Clodi M, Martin SS, Imamura T, Kavanaugh WM, Olefsky JM.**

An SH2 domain-containing 5' inositolphosphatase inhibits insulin-induced GLUT4 translocation and growth factor-induced actin filament rearrangement. Mol Cell Biol. 1999;19:1081-91.

**von Holtey M, Csermely P, Niggemann J, Eckel J.**

Insulin-induced phosphorylation of a 38 kDa DNA-binding protein in ventricular cardiomyocytes: possible implication of nuclear protein phosphatase activity. Mol Cell Endocrinol. 1996;120:107-14.

**Walker PS, Ramlal T, Sarabia V, Koivisto UM, Bilan PJ, Pessin JE, Klip A.**

Glucose transport activity in L6 muscle cells is regulated by the coordinate control of subcellular glucose transporter distribution, biosynthesis, and mRNA transcription. J Biol Chem. 1990;265:1516-23.

**Wang L, Hayashi H, Ebina Y.**

Transient effect of platelet-derived growth factor on GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes. J Biol Chem. 1999;74:19246-53.

**Wang Q, Bilan PJ, Tsakiridis T, Hinek A, Klip A.**

Actin filaments participate in the relocalization of phosphatidylinositol3-kinase to glucose transporter-containing compartments and in the stimulation of glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. Biochem J. 1998;331:917-28.

**Warram JH, Laffel LM, Valsania P, Christlieb AR, Krolewski AS.**  
Excess mortality associated with diuretic therapy in diabetes mellitus.  
Arch Intern Med. 1991;151:1350-6.

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

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

**Wood IS, Hunter L, Trayhur P.**  
Expression of Class III facilitative glucose transporter genes (GLUT-10 and GLUT-12) in mouse and human adipose tissues.  
Biochem Biophys Res Commun. 2003;308:43-9.

**Wu X, Li W, Sharma V, Godzik A, Freeze HH.**  
Cloning and characterization of glucose transporter 11, a novel sugar transporter that is alternatively spliced in various tissues.  
Mol Genet Metab. 2002;76:37-45.

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

**Yu B, Poirier LA, Nagy LE.**  
Mobilization of GLUT-4 from intracellular vesicles by insulin and K(+) depolarization in cultured H9c2 myotubes.  
Am J Physiol. 1999;277:259-67.

**Yu B, Schroeder A, Nagy LE.**  
Ethanol stimulates glucose uptake and translocation of GLUT-4 in H9c2 myotubes via a Ca(2+)-dependent mechanism.  
Am J Physiol Endocrinol Metab. 2000;279:1358-65.

**Zick Y.**  
Molecular basis of insulin action.  
Novartis Found Symp. 2004;262:36-50

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

## 8. Anhang

### 8.1. verwendete Abkürzungen

AKT	Proteinkinase B
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	complementary Desoxyribonucleinsäure
DMEM-Medium	Dulbecco´s modifiziertes Eagle-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECL	verstärkte Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	fötales Kälberserum
GLUT	Glukosetransporter
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1piperazin-N-2-ethansulfonsäure
HMW	high molecular weight
IAA	Insulinautoantikörper
ICA	zytoplasmatische Inselzellantikörper
IDDM	insulin dependent diabetes mellitus
IGF	insulin-like growth factor
IR	Insulinrezeptor
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
LMW	low molecular weight
NIDDM	non insulin dependent diabetes mellitus
PAGE	Polycrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PDK	Phospholipidabhängige Kinase
PH-Domäne	Pleckstrin homologe Domäne
PI	Phosphatidylinositol
PKB	Proteinkinase B (=Akt)
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTB-Domäne	Phosphotyrosinbindende Domäne
PVDF	Polyvinylidendifluorid
pY	Phosphotyrosin
RIPA	Radioimmunopräzipitationsassay

SDS	Natriumdodecylsulfat
SH2-Domäne	Src-homologe Domäne
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat

## 8.2. Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b> Schema: Effekte des Insulins auf zellulärer Ebene	<b>4</b>
<b>Abb. 2:</b> Schema: Insulintransduktion und Glukoseaufnahme	<b>10</b>
<b>Abb. 3: Karte des Vektors pML zur Transfektion von HIR-cDNA</b>	<b>29</b>
<b>Abb. 4: Lichtmikroskopische Bild des E2-Klones bei 100% Konfluenz</b>	<b>30</b>
<b>Abb. 5:</b> Western Blot-Analyse: Expression von IR in H9c2-Zellen und 6 verschiedenen stabil transfizierten Klonen	<b>31</b>
<b>Abb. 6:</b> Quantifizierung der Expression des Insulinrezeptors für H9c2-Zellen und den E2-Klon	<b>31</b>
<b>Abb. 7:</b> Bindungsmessung mit <sup>125</sup> I-Insulin an H9c2-Zellen und 5 verschiedenen stabil transfizierten Klonen	<b>32</b>
<b>Abb. 8:</b> Western Blot-Analyse: Expression von GLUT1 in H9c2-Zellen und 3 verschiedenen stabil transfizierten Klonen	<b>33</b>
<b>Abb. 9:</b> Quantifizierung der Expression von GLUT1 für H9c2-Zellen und den E2-Klon	<b>33</b>

<b>Abb. 10:</b> Western Blot-Analyse: Expression von GLUT4 in H9c2-Zellen und 3 verschiedenen stabil transfizierten Klonen	<b>34</b>
<b>Abb. 11:</b> Quantifizierung der Expression von GLUT4 für H9c2-Zellen und den E2-Klon	<b>35</b>
<b>Abb. 12:</b> Western Blot-Analyse: Expression von IGF-I-R in H9c2-Zellen und 3 verschiedenen stabil transfizierten Klonen	<b>36</b>
<b>Abb. 13:</b> Quantifizierung der Expression von IGF-I-R für H9c2-Zellen und den E2-Klon	<b>36</b>
<b>Abb. 14:</b> Messung des 2-Desoxyglucosetransportes an H9c2-Zellen und 3 selektierten Klonen	<b>38</b>
<b>Abb. 15:</b> Dosiswirkungskurve der 2-DOG- Aufnahme bei H9c2- Zellen und dem Klon E2	<b>39</b>
<b>Abb. 16:</b> Dosiswirkungskurve der 2-DOG-Aufnahme bei H9c2- Zellen und dem Klon E2	<b>49</b>

### **8.3. Erklärung**

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Arbeit ohne zulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und ist auch nicht veröffentlicht worden.

Ich bin mir darüber klar, dass der Bruch der obigen Eidesstattlichen Versicherung in jedem Fall zu Folge hat, dass die Fakultät die Promotion widerruft.

Düsseldorf den 7, November 2005

Jamila Pause

## **8.4. Danksagung**

Ich danke Herrn Prof. Dr. J. Eckel für die gute Betreuung und die überaus nette Arbeitsatmosphäre und für die Begutachtung meiner Arbeit und deren Vertretung vor der medizinischen Fakultät.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. W. Däubener für die Übernahme des Korreferates.

Weiterhin danke ich dem Direktor des Deutschen Diabetes-Zentrum, Herrn Prof. Dr. med. D. Müller-Wieland, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, sowie allen Mitarbeitern für die entspannte, freundliche Arbeitsatmosphäre.

Ich danke Dr. Olaf Dransfeld und Waltraud Paßlack für die nette Einarbeitung, für ihre ständige Hilfsbereitschaft und die gute Stimmung in der Arbeitsgruppe.

## **8.5. Curriculum vitae**

### **Persönliche Daten**

Name: Jamila Pause  
Geb.-Datum: 30.03.1975  
Geb.-Ort: Düsseldorf  
Anschrift: Talstrasse 64, 40217 Düsseldorf  
Telefon: 0211/9944433; mobil: 0177/2304536  
Email Adresse: [JBPause@aol.com](mailto:JBPause@aol.com)  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Konfession: römisch-katholisch  
Familienstand: ledig

### **Schulbildung**

1981-1985 Färbergrundschule/Düsseldorf  
1985-1994 Geschwister-Scholl-Gymnasium/Düsseldorf  
Mai 1994 Abitur

### **Studium**

10.1994-04.1995 Diplom-Pädagogik, Heinrich-Heine Universität  
Düsseldorf  
10.1997 Beginn des Medizinstudiums an der HHU  
Düsseldorf  
03.2001 Absolvierung des 1. Staatsexamens  
09.2002 Absolvierung des 2. Staatsexamens  
11.2003 Beendigung des Medizinstudiums  
durch Absolvierung des 3. Staatsexamens

### **Praktisches Jahr**

10.2002-10.2003 Gynäkologie und Geburtshilfe, Städtische  
Kliniken Düsseldorf  
Chirurgie, Kantonales Spital Sursee-Wolhusen  
Innere Medizin, Städtische Kliniken Düsseldorf

**Assistenzarzt-Tätigkeit**

01.-12.2005

Chirurgie und Orthopädie, Regionalspital Thun,  
PD Dr. Wagner, Dr. Hess

seit 04.2005

Chirurgie und Orthopädie, Kantonsspital Uri,  
Dr. Burri, Dr. Joller

**Fremdsprachen**

Englisch

sehr gute Kenntnisse in Wort und Schrift

Französisch

Grundkenntnisse in Wort und Schrift

Düsseldorf, den 7.11.2005











