

Untersuchungen zur Rolle verschiedener Serinkinasen bei der Entstehung der Insulinresistenz

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Magdalene Stosik

aus Danzig

Mai 2006

Aus dem Deutschen Diabetes-Zentrum DDZ
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Leibniz-Zentrum für Diabetes-Forschung

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

Referent: Prof. Dr. Jürgen Eckel

Koreferent: Prof. Dr. Frank Wunderlich

Tag der mündlichen Prüfung: _____

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	10
1.1	Diabetes mellitus und Insulinresistenz	10
1.2	Insulinsignaltransduktion	11
1.3	Serinkinasen als potentielle Modulatoren des Insulinsignalweges.....	17
1.4	Ziel der Arbeit.....	20
2	MATERIAL UND METHODEN	22
2.1	Material	22
2.1.1	Allgemeine Chemikalien	22
2.1.2	Radiochemikalien	23
2.1.3	Antikörper	24
2.1.4	Enzyme	26
2.1.5	Kit-Systeme	27
2.1.6	Bakterienstämme.....	27
2.1.7	Adenoviren	27
2.1.8	Zellen und Zellkulturmedien	28
2.1.9	Nukleinsäuren.....	29
2.1.9.1	Oligonucleotide.....	29
2.1.9.2	Rekombinante Plasmide	30
2.2	Methoden	31
2.2.1	Transformation und Plasmidamplifikation in Bakterien	31
2.2.2	Isolierung von Plasmid-DNA.....	31
2.2.2.1	Analytische Präparation	31
2.2.2.2	Präparative Plasmidisolierung.....	31
2.2.3	Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen.....	32
2.2.4	Restriktion von DNA	32

2.2.5	Auftrennung von DNA in nativen Agarose-Gelen	32
2.2.6	Ligation von Plasmid-DNA.....	32
2.2.7	Ortspezifische Mutagenese	33
2.2.8	DNA Sequenzierungen.....	33
2.2.9	Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	33
2.2.10	Proteinbestimmung nach Bradford	34
2.2.11	Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen	35
2.2.12	Coomassie-Färbung der Acrylamid-Gele	35
2.2.13	Transfer der Proteine auf Membranen.....	35
2.2.14	Immunodetektion	36
2.2.15	Strippen von Blotmembranen	36
2.2.16	Tryptische Spaltung von Proteinen im SDS-Gel.....	37
2.2.17	HPLC-Analyse tryptischer Peptide	37
2.2.18	<i>In vitro</i> Phosphorylierung des IRS-1 Fusionsproteins.....	38
2.2.18.1	PKC ζ und PKC aus Rattengehirn	38
2.2.18.2	IKK Komplex	39
2.2.18.3	MEKK1	39
2.2.18.4	IKK β	39
2.2.19	Bestimmung des Phosphateinbaus	39
2.2.20	Zellkultur	40
2.2.20.1	H9c2-E2	40
2.2.20.2	HEK 293.....	40
2.2.20.3	HeLa.....	41
2.2.21	Transiente Transfektion.....	41
2.2.22	Adenovirale Überexpression.....	41
2.2.22.1	Virusamplifikation	42
2.2.22.2	Virustiterbestimmung	42
2.2.22.3	RCA-Test	43
2.2.22.4	Infektion von H9c2-Zellen	43

2.2.23	Behandlung der Zellen und Herstellung von Zellysaten	44
2.2.24	Immunopräzipitation von Proteinen aus Zellysaten	44
2.2.25	Bestimmung der Translokation von GLUT4.....	45
2.2.26	Auswertung der Daten und Statistik	45
3	ERGEBNISSE	46
3.1	In Vitro Phosphorylierung	46
3.1.1	Generierung und Untersuchung von IRS-1 Mutanten.....	47
3.1.2	PKC ζ phosphoryliert IRS-1 Fusionsprotein an Ser570 – Validierung spezifischer Antiseren	47
3.1.3	IKK-Komplex phosphoryliert IRS-1 Fusionsprotein <i>in vitro</i>	48
3.1.4	MEKK1 phosphoryliert IRS-1 Fusionsprotein <i>in vitro</i>	50
3.1.5	IKKbeta phosphoryliert IRS-1 Fusionsprotein <i>in vitro</i>	52
3.1.6	Externe massenspektrometrische Analyse der Phosphorylierungsstellen	55
3.2	Einfluss aktivierter Serinkinasen auf die Insulinsignaltransduktion im Zellmodell	57
3.2.1	Aktivierung der IKK und JNK	57
3.2.2	Einfluss aktivierter IKK und JNK auf die insulinvermittelte Tyrosinphosphorylierung von IRS-1	59
3.2.3	Einfluss aktivierter IKK und JNK auf die Interaktion von IRS-1 und PI3-K	60
3.2.4	Einfluss aktivierter IKK und JNK auf GSK3- und Akt-Proteinexpression ..	62
3.2.5	Einfluss aktivierter IKK auf Akt Phosphorylierung.....	63
3.2.6	Einfluss aktivierter JNK auf Akt Phosphorylierung.....	64
3.2.7	Einfluss aktivierter IKK und JNK auf GSK3 Phosphorylierung.....	66
3.2.8	Einfluss aktivierter IKK und JNK auf die GLUT4 Translokation	69
3.2.9	Auswirkungen einer 18-stündigen Aktivierung der IKK auf Akt Phosphorylierung.....	70
3.2.10	Auswirkungen der aktivierten Kinasen IKK und JNK auf die Phosphorylierung des endogenen IRS-1 an Serin 307.....	71

3.2.11	Auswirkungen der aktivierten Kinasen IKK und JNK auf die Phosphorylierung von transient überexprimiertem IRS-1 an Serin 307	73
3.3	Untersuchung der Insulinresistenz im Zellmodell	76
3.3.1	Induktion der Insulinresistenz in H9c2-E2 Myoblasten	76
3.3.2	Effekte hoher Glucose- und Insulinkonzentrationen auf die Expression und Phosphorylierung des Insulinrezeptors	79
3.3.3	Effekte hoher Glucose- und Insulinmengen auf die IRS-1 Funktion	80
3.3.4	Auswirkungen der induzierten Resistenz auf die PDK1	81
3.3.5	Effekte hoher Glucose- und Insulinmengen auf die GSK3 Phosphorylierung 82	82
3.3.6	Effekte hoher Glucose- und Insulinmengen auf die GLUT4 Translokation	83
3.3.7	Inhibierung von Serinkinasen im Resistenzmodell	84
3.3.7.1	IKK	85
3.3.7.2	JNK	85
3.3.7.3	GSK3	86
3.3.7.4	mTOR	87
3.3.7.5	PKC	88
3.3.8	Aktivierung transient überexprimierter PKC ζ im Resistenzmodell	90
3.3.9	Inhibierung von Hsp90 im Resistenzmodell	92
3.3.10	Messung der Dephosphorylierungsrate im Resistenzmodell	94
4	DISKUSSION	96
4.1	In vitro Phosphorylierung	96
4.1.1	PKC ζ	96
4.1.2	IKK	98
4.2	Der Einfluss aktivierter Serinkinasen auf die Signaltransduktion im Zellmodell	102
4.3	Untersuchung der induzierten Insulinresistenz in einer Kardiomyoblasten-Zelllinie	110
5	ZUSAMMENFASSUNG	117

6	LITERATUR.....	118
7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	135
8	TABELLENVERZEICHNIS	137
9	DANKSAGUNG	138

ABKÜRZUNGEN

17-AAG	17-(Allylamino)-17-demethoxygeldanamycin
AI	Anisomycin
Akt	Proteinkinase B
AMPK	AMP aktivierte Protein Kinase
Av	Adenovirus
BIM	Bisindolylmaleimid
BSA	Rinderserumalbumin
CMV	Cytomegalievirus
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N, N, N', N'-tetraacetat
ERK	Extrazellulär regulierte Kinase
FCS	Fötales Kälberserum (auch Rinderserum)
GLUT	Glucosetransporter
GSK	Glycogensynthasekinase
GST	Glutathion-S-Transferase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSP	Hitzeschockprotein
IgG	Immunglobulin G
I κ B	Inhibitor von NF κ B
IKK	I κ B Kinase
IL-6	Interleukin-6
ID	Immunodetektion
IP	Immunopräzipitation
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
IR	Insulinrezeptor
JNK	c-Jun-NH ₂ -terminale Kinase
LY294002	Inhibitor der Phosphatidylinositol-3-Kinase
MAPK	Mitogen aktivierte Protein Kinase
MEKK	Mitogen aktivierte Protein Kinase Kinase Kinase (MEK-Kinase)
MOI	"multiplicity of infection" (Anzahl Viren pro Zelle)

mTOR	mammalian target of rapamycin
NFκB	Nukleärer Faktor κB
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PDK	Phospholipidabhängige Kinase
PH-Domäne	Pleckstrin homologe Domäne
PI3-K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B (entspr. Akt)
PKC	Proteinkinase C
PTB-Domäne	Phosphotyrosinbindende Domäne
PVDF	Polyvinylidendifluorid
pY	Phosphotyrosin
RCA	Replikationskompetente Adenoviren
RIPA	Radioimmunopräzipitationsassay
RT	Raumtemperatur
SEM	Standardabweichung der Mittelwerte
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH2-Domäne	Src-homologe Domäne
SIK	Salz-induzierbare Kinase
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin Tris Tris- (hydroxy-methyl)aminomethan
Triton X-100	t-Octylphenoxypolyethoxyethanol
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
üN	Über Nacht

1 EINLEITUNG

1.1 *Diabetes mellitus und Insulinresistenz*

Die „Zuckerkrankheit“ Diabetes mellitus ist eine Stoffwechselstörung, die sich durch chronisch erhöhten Blutzuckerspiegel auszeichnet und ihre Ursachen in mangelnder Insulinsekretion beziehungsweise gestörter Insulinwirkung hat (89). Da die Anzahl der Erkrankungen weltweit dramatisch zunimmt, stellt Diabetes eine der Hauptbedrohungen der menschlichen Gesundheit im 21. Jahrhundert dar (195). So liegt in Deutschland bei ca. 5% der Bevölkerung die Diagnose „Diabetes mellitus“ vor, die tatsächliche Anzahl der Erkrankungen ist aufgrund der hohen Dunkelziffer vermutlich doppelt so hoch (60).

Zu den Hauptformen der Diabetes-Erkrankungen zählen Typ 1 und Typ 2 Diabetes. Typ 1 Diabetes ist durch eine Zerstörung der insulinproduzierenden beta-Zellen der Bauchspeicheldrüse aufgrund einer Autoimmunreaktion charakterisiert. Da kein körpereigenes Insulin mehr gebildet werden kann, sind die betroffenen Patienten lebenslang auf eine exogene Zufuhr von Insulin angewiesen.

Über 90% der weltweiten Diabetes-Erkrankungen gehen auf den Typ 2 Diabetes zurück (195). Im Gegensatz zu Typ 1 Diabetes liegt in diesem Fall kein Insulinmangel vor. Der Pathomechanismus von Typ 2 Diabetes beruht auf einer Insulinresistenz, also mangelnder Wirkung des Insulins im peripheren Gewebe, die mit einer erhöhten kompensatorischen Insulinproduktion einhergeht (89). Zu den Hauptursachen zählen genetische Prädisposition (127) und Übergewicht (28). Falsche Ernährung und mangelnde körperliche Aktivität sind weitere Risikofaktoren (79). Obwohl Typ 2 Diabetes als „Altersdiabetes“ bekannt ist, ist diese Erkrankung inzwischen auch immer häufiger bei Kindern und Jugendlichen anzutreffen (1). Neuere Untersuchungen legen nahe, dass mit Adipositas assoziierte, chronisch inflammatorische Prozesse eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Insulinresistenz spielen (175). Die molekularen Grundlagen dieser Vorgänge sind zur Zeit dennoch weitgehend unbekannt. Ein bes-

seres Verständnis der Mechanismen, die zu der Resistenzentstehung beitragen, ist für die Entwicklung neuer Therapieformen unerlässlich.

1.2 Insulinsignaltransduktion

Das Peptidhormon Insulin besteht aus 51 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 5,8 kDa. Die Synthese der inaktiven Vorstufe, des Proinsulins, erfolgt in den Beta-Zellen der Langerhansschen Inseln in der Bauchspeicheldrüse. Nach einer Aktivierung mittels proteolytischer Spaltung wird das native Insulin in den sekretorischen Granula der Beta-Zellen gespeichert. Die Sekretion von Insulin wird durch erhöhte Glucosespiegel im Blut ausgelöst, wobei die freigesetzte Insulinmenge parallel zur Glucosekonzentration zunimmt. Die Hauptwirkung des Insulins besteht in der kurzfristigen Steigerung der Glucoseaufnahme und der Glycogensynthese in den Zielgeweben Muskel, Fettgewebe und Leber. Gleichzeitig wird die hepatische Gluconeogenese inhibiert. Damit bewirkt das Insulin eine rasche Senkung des Blutglucose-Spiegels und trägt entscheidend zu der Erhaltung der Glucose-Homöostase bei.

Durch die Bindung des Insulins an den Insulinrezeptor (IR) wird eine komplexe zelluläre Signalkaskade ausgelöst (für eine Übersicht siehe Abb. 2), wobei das Signal über eine Vielzahl von hochkonservierten Proteinen weitergeleitet wird. Der Insulinrezeptor gehört zu der Familie der Rezeptortyrosinkinasen und besteht aus zwei α - und zwei β -Untereinheiten, welche über Disulfidbrücken kovalent zu einem Heterotetramer verknüpft sind (128). Die α -Untereinheiten befinden sich im extrazellulären Raum und bilden die Insulinbindestelle, während die β -Untereinheiten die Zellmembran durchspannen und eine intrazelluläre Tyrosinkinase-Domäne enthalten (160;177). Die Bindung von Insulin an die α -Untereinheiten führt mittels Konformationsänderung zu einer Autophosphorylierung der β -Untereinheiten des Insulinrezeptors und damit zur Aktivierung der Tyrosinkinase-Domäne (177).

Der katalytisch aktive Insulinrezeptor phosphoryliert seinerseits eine Reihe nachgeschalteter Substrate. Zu den wichtigsten Adapterproteinen zählen die Mitglieder der Insulin Rezeptor Substrat Familie (IRS). Das erste Insulinrezeptorsubstrat (IRS-1) wurde bereits 1985 von M.F. White beschrieben (123;159;179). Inzwischen ist eine

Reihe verschiedener IRS Proteine bekannt (128). Insulinrezeptorsubstrate IRS-1 und IRS-2 sind dabei die am besten strukturell und funktionell charakterisierten Adapterproteine (Übersichtsartikel: (177;178;180;181)). Sie werden in nahezu allen Geweben exprimiert und vermitteln den Hauptanteil der Insulinantwort, wobei das IRS-1 insbesondere für die Insulinwirkung im Muskel und Fettgewebe und das IRS-2 in der Leber von Bedeutung sind (177;178;180). Das Vorkommen von IRS-3 beschränkt sich auf das Fettgewebe von Nagern (95). IRS-4 (94) wurde hauptsächlich in Thymus, Gehirn, Niere und Beta-Zellen nachgewiesen (165). IRS-5 wird bis auf Leber und Niere ubiquitär exprimiert, während die Expression von IRS-6 im Skelettmuskel am prominentesten ist (24).

Alle IRS Proteine verfügen über eine N-Terminale Pleckstrin Homologie Domäne (PH), eine Phospho-Tyrosin Bindende Domäne (PTB) und einen C-Terminalen Bereich, der sich durch viele potentielle Tyrosin- und Serin-Phosphorylierungsstellen auszeichnet (Abb. 1).

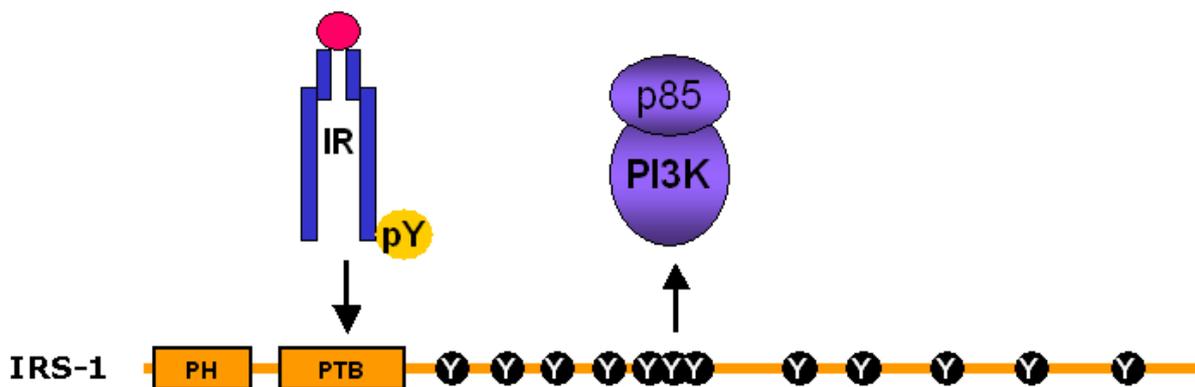


Abb. 1 Schematische Darstellung des Insulinrezeptorsubstrats 1

Modifiziert nach M.F. White, 2002

Die Interaktion der IRS Proteine mit dem Insulinrezeptor wird über die PH (22) und PTB (183) Domänen vermittelt. Dabei dirigiert die PH Domäne die Proteine durch die Interaktion mit Phospholipiden und PH Interagierenden Proteinen (PHIP) zu dem membranständigen Insulinrezeptor (23;49), während die PTB Domäne für die

Erkennung und Bindung des phosphorylierten NPXY Motives im aktivierten Insulinrezeptor von Bedeutung ist.

Der C-Terminale Bereich der IRS Proteine trägt zahlreiche konservierte YMXM und YXXM Motive. Diese werden von aktiviertem Insulinrezeptor an Tyrosin-Resten phosphoryliert und dienen anschliessend der Rekrutierung weiterer Signalproteine, die über eine src Homologie Domäne (SH2) verfügen. Das wichtigste Effektorprotein des IRS-1 stellt die Phosphatidylinositol-3'-Kinase (PI3-K) dar. Zu den SH2 Proteinen gehören neben der PI3-K zahlreiche weitere Adapter-Proteine: GRB-2, NCK, CRK, SHB u.a. (169;178). Für die Kopplung der PI3-K sind die Tyrosine 608 und 628 des IRS-1 von Bedeutung (46).

Die PI3-K besteht aus einer regulatorischen p85-Untereinheit und einer katalytischen p110 Untereinheit (133). Die regulatorische Untereinheit enthält SH2 Domänen, die an die phosphorylierten Erkennungssequenzen des IRS-1 binden und eine Aktivierung der katalytischen Untereinheit bewirken. Bislang wurden mehrere Isoformen der regulatorischen Untereinheit identifiziert, die über alternatives Spleissen der drei Gene p85 α , p85 β und p55 γ generiert werden (130). Für die Weiterleitung des Insulinsignals ist die ubiquitär exprimierte p85 α ausschlaggebend (143). Von der katalytischen Untereinheit, die eine 3'-Phosphorylierung von Phosphoinositiden vermittelt, sind vier Isoformen bekannt: p110 α , p110 β , p110 γ und p110 δ (25;168).

Das Hauptprodukt der PI3-K ist Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphat (PIP3), welches in der Lage ist an die PH Domänen von Proteinen zu binden und die zelluläre Lokalisation und Aktivität von weiteren Effektorproteinen zu regulieren. Für die Insulinsignalkaskade ist dabei die Aktivierung der Phospholipid-abhängigen Kinase (PDK) von grosser Bedeutung, da diese für die Signalweiterleitung zu Proteinkinase B (Akt) (143) und den atypischen Proteinkinase C Isoformen (aPCK) (152) verantwortlich ist.

Die Familie der Proteinkinasen C wird in drei Hauptgruppen unterteilt, die sich sowohl funktionell als auch strukturell unterscheiden. Die klassischen PKCs (cPKC: α , β und γ) sind durch die Bindung von Diacylglycerol (DAG) und Ca²⁺ stimulierbar, die neuen PKCs (nPKC: δ , ϵ , η und θ) sind DAG-sensitiv, aber Ca²⁺-insensitiv. Die atypi-

schen PKCs (aPKC: ζ , λ und ι) sind unabhängig von Ca^{2+} und DAG (Übersichtsartikel: (113;124)). Aktivierung der PKC ζ durch die PDK1 erfolgt über eine Phosphorylierung des Threonins 410 in der PKC ζ -Aktivierungsschleife (9). Eine Vielzahl neuerer Publikationen legt nahe, dass die atypischen PKCs eine wesentliche Rolle bei der Vermittlung des insulinabhängigen Glucosetransports spielen (10-15;86;150-152). So konnte die Beteiligung der aPKCs am Glucosetransport in Muskelzellen (11;14) und Fettzellen (13;150-152) dokumentiert werden (Übersichtsartikel: (48)).

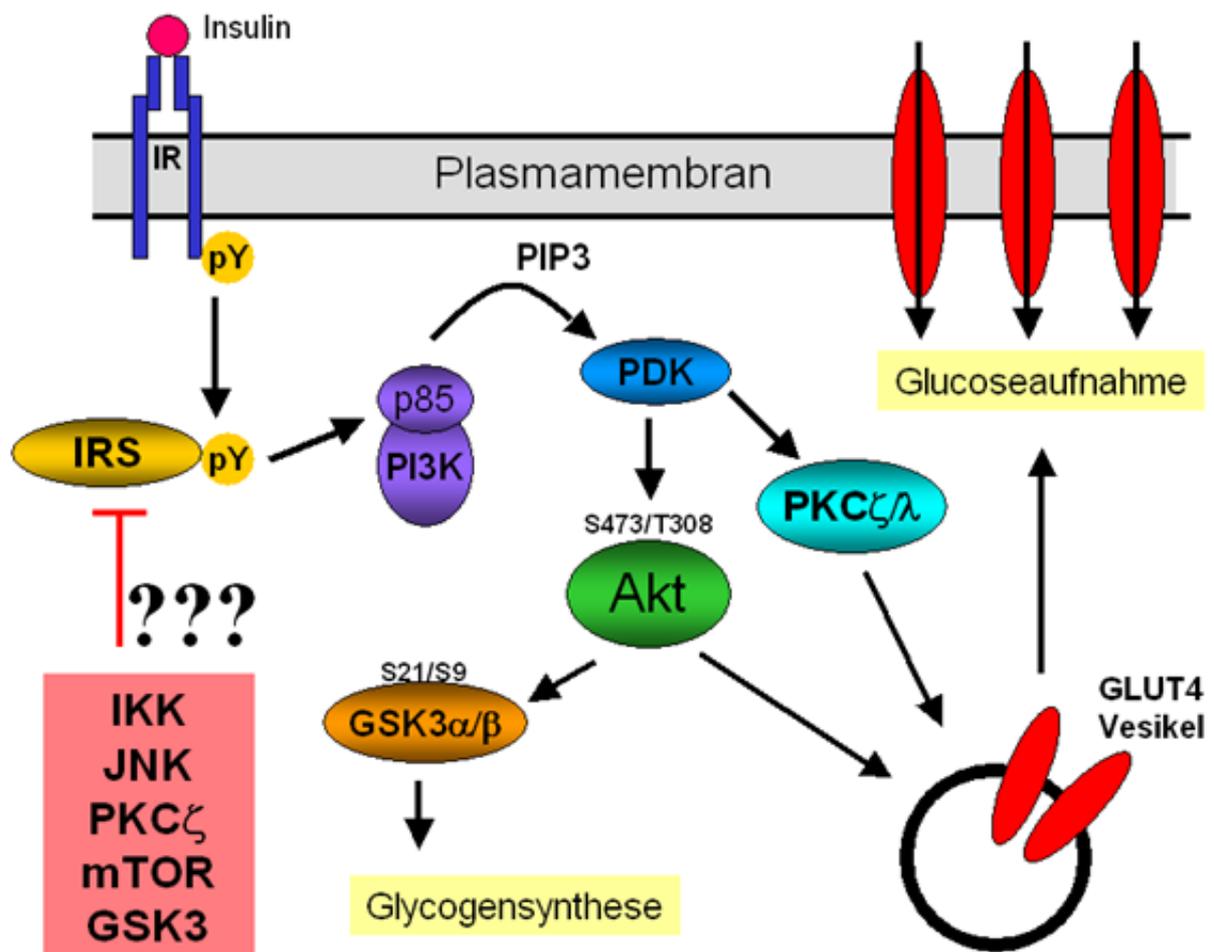


Abb. 2 Schematische Darstellung der Insulin-Signalkaskade

Proteinkinase B (Akt) ist ein weiteres Effektorprotein, dessen Aktivierung für die Stimulation des Glucosetransports von Bedeutung ist (171). Bislang wurden drei Akt-Isoformen beschrieben, die jeweils über eine N-Terminale PH Domäne, zentrale Kinase-Domäne und eine C-Terminale regulatorische Domäne verfügen (50). Dabei wird Akt1 insbesondere in Muskel und Leber exprimiert, während im Fettgewebe Akt2 dominiert (50). Neben der Insulinsignaltransduktion ist Akt ebenso für die Regulation der Zellteilung und der Apoptose verantwortlich (29;96).

Die insulinabhängige Aktivierung der Akt verläuft in mehreren Schritten. Zunächst bindet das nach einem Insulinstimulus in erhöhter Konzentration vorliegende PIP3 an die PH-Domäne von Akt. Dadurch wird einerseits eine Verlagerung der Akt zur Plasmamembran und somit eine Ko-Lokalisation mit der PDK1 bewirkt, und andererseits eine Konformationsänderung ausgelöst (155), die vermutlich eine Exposition des zuvor unzugänglichen Threonins 308 zu Folge hat (143). Die eigentliche Aktivierung der Akt findet mittels Phosphorylierung statt (92). An der Plasmamembran erfolgt die Phosphorylierung des in der Aktivierungsschleife der Kinase-Domäne liegenden Threonins 308 durch die PDK1. Zusätzlich wird die Akt an Serin 473 in der regulatorischen Domäne phosphoryliert, was zu einer Stabilisierung der aktiven Konformation beiträgt (50;182). Umstritten ist, ob das Serin 473 durch eine weitere PDK (PDK2) oder über eine Autophosphorylierung (164) modifiziert wird. Die einmal an der Plasmamembran aktivierte Akt kann anschliessend wieder in das Cytosol gelangen (5).

Die molekularen Mechanismen, welche eine insulinabhängige Glucoseaufnahme regulieren, sind zur Zeit noch weitgehend unklar. Neben der aPKC Isoformen scheint auch die aktivierte Akt eine insulinvermittelte Translokation des Glucosetransporters 4 (GLUT4) zur Plasmamembran zu vermitteln. So konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Kinase-inaktiven Mutanten der Akt die insulinabhängige Translokation der GLUT4-Vesikel im Myoblasten inhibiert (171), während eine konstitutiv aktive Mutante der Akt eine insulinunabhängige GLUT-4 Translokation in 3T3-L1 Adipocyten induzierte (91). 2002 wurde ein 160 kDa Protein (AS160) identifiziert, welches von Akt phosphoryliert werden kann und eine Rab GAP (GTPase aktivierendes Protein) Domäne trägt (85). Da eine Phosphorylierung von AS160 für die

insulininduzierte Translokation der GLUT4-Vesikel notwendig ist (139), könnte dieses Protein eine regulatorische Verbindung zwischen Akt und Glucosetransport darstellen.

Neben der Glucoseaufnahme reguliert Akt auch die Glycogensynthese. Zu den wichtigsten Substraten der Akt gehört die Glycogensynthase Kinase 3 (GSK3), ein Enzym das seinerseits die Aktivität der Glycogensynthase moduliert. Es existieren zwei Varianten der GSK3: α und β . Beide Isoformen werden ubiquitär exprimiert und enthalten eine hochkonservierte Kinase-Domäne, während sie sich ausserhalb dieser Region stark voneinander unterscheiden. Im Basalzustand ist die GSK3 aktiviert und inhibiert die Glycogensynthase (170). Durch Phosphorylierung am N-Terminus (Serin 21 der GSK3 α und Serin 9 der GSK3 β) kann GSK3 von der Akt inaktiviert werden, was eine Steigerung der zellulären Glycogensynthese zu Folge hat (Übersichtsartikel: (38;52)).

An der Terminierung des Insulinsignals sind eine Reihe von Faktoren beteiligt. Signallöschung erfolgt über Internalisierung des Insulinrezeptors und die endosomale Degradation des gebundenen Insulins, wobei der Rezeptor anschliessend wieder an die Zelloberfläche gelangt und weitergenutzt werden kann (40). Eine wichtige Rolle bei der Termination des Signals spielen Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTP) (27;154). Mehrere PTP sind in der Lage, den aktivierten Insulinrezeptor zu dephosphorylieren. Insbesondere PTP-1B scheint für die Inaktivierung des Insulinrezeptors ausschlaggebend zu sein (41). Neben dem Insulinrezeptor kann auch IRS-1 von der PTP-1B an Tyrosinresten dephosphoryliert werden (62). Eine weitere Phosphatase, die sowohl den Insulinrezeptor, als auch das IRS-1 inaktivieren kann, ist die SHP2 (7;27). Das Produkt der PI3-K, PIP3, wird von dem Tumorsupressorprotein PTEN hydrolysiert (108;121). Ebenso kann die Phospholipid-Phosphatase SHIP-2 am Abbau des PIP3 beteiligt sein (4;77;163). Proteinphosphatase 2A (PP2A) ist eine Serin/Threonin Phosphatase (196), die PKC λ und Akt inaktivieren kann (166). Auch PHLPP ("PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase") vermittelt eine dephosphorylierung der Akt (18;56). GSK3 β wird sowohl von der PP2A als auch PP2B dephosphoryliert (99).

Eine weitere Modulation der Signalkaskade erfolgt über eine konkurrierende Phosphorylierung des IRS durch Serinkinasen. So scheint einerseits eine basale Serinphosphorylierung des IRS-1/IRS-2 für seine Funktion notwendig zu sein, da eine vollständige Dephosphorylierung *in vitro* zu einer reduzierten Tyrosinphosphorylierbarkeit durch den IR führt (63). Positive Effekte einer Serinphosphorylierung des IRS-1 durch Akt konnten inzwischen demonstriert werden (125). Andererseits kann eine erhöhte Serinphosphorylierung des IRS-1 seine Tyrosinphosphorylierung vermindern, wodurch die Signalkaskade unterbrochen werden kann (Übersichtsartikel: (20;169;180)). Dieser physiologische Vorgang wird unter anderem durch Insulin selbst ausgelöst und dient mittels negativer Rückkopplung der Signalregulation. Die Signalinaktivierung kann autoregulatorisch (homolog) durch weiter stromabwärts in der Signalkaskade liegende Substrate erfolgen, oder auch heterolog durch Kinasen anderer, möglicherweise vernetzter, Signalwege vermittelt werden (97). Eine übermäßige Serinphosphorylierung des IRS-1 durch hyperaktivierte Serinkinasen kann eine Insulinresistenz zu Folge haben (125;132;144), die in weiterem Verlauf zum Typ-2 Diabetes führt. Es sind mehrere potentielle Mechanismen der inhibitorischen Wirkung von Serinphosphorylierung vorstellbar. Vermutlich stört eine Serinphosphorylierung des IRS-1 seine Interaktion mit dem Insulinrezeptor und/oder den stromabwärts liegenden SH2-Proteinen wie z.B. PI3-Kinase (3;43;114). Auch eine Beschleunigung der proteosomalen Degradation von IRS-1 durch Serinphosphorylierung wurde diskutiert (64;67;74;126;129;138;158;190).

1.3 Serinkinasen als potentielle Modulatoren des Insulinsignalweges

Es ist eine Vielzahl von Serin/Threonin Kinasen bekannt, die das IRS-1 *in vitro* oder *in vivo* phosphorylieren können. Dazu zählt die Casein Kinase II (162), GSK3 (44;63), Akt (125), PI3-K (93), cPKC (32), nPKC θ (102), aPKC ζ (111;134;147), AMP aktivierte Protein Kinase (AMPK) (82), Protein Kinase A (PKA) (184), extrazellulär regulierte Kinase (ERK2) (184), Salz-induzierbare Kinase (SIK2) (78), I κ B Kinase (IKK) (57), c-Jun NH₂-terminale Kinase (JNK) (2), mitogen aktivierte Protein Kinase (MAPK) (33), „mammalian Target of rapamycin“ (mTOR) (122) und vermutlich auch

Rho Kinase (19). Da in der aktuellen Literatur zum Teil widersprüchliche Berichte über die Relevanz dieser Kinasen für die Entstehung der Insulinresistenz vorliegen, ist eine genauere Untersuchung ihrer Auswirkungen auf die IRS-Funktion dringend notwendig.

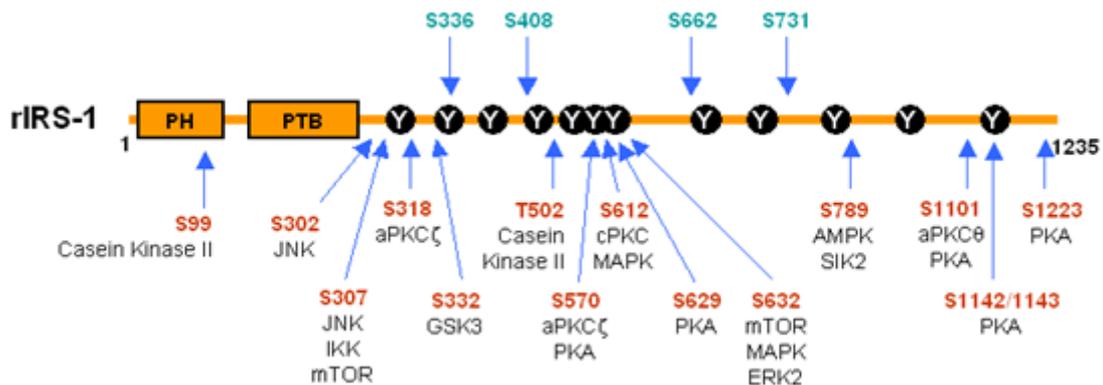


Abb. 3 Inhibitorische Serinphosphorylierung des IRS-1

Übersicht über *in vivo* und *in vitro* identifizierte inhibitorische Serin/Threonin Phosphorylierungsstellen des IRS-1 der Ratte. Rot: die beteiligten Kinasen wurden identifiziert; grün: Phosphorylierungsstelle wurde bislang keiner Kinasen zugeordnet.

Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung, dass hohe Aspirindosen zu einer Absenkung des Blutzuckerspiegels bei Patienten mit Typ-2 Diabetes führen (80). Es konnte am Tiermodell gezeigt werden, dass eine Aspirinbehandlung der Insulinresistenz vorbeugt und eine bestehende Insulinresistenz aufhebt (16;90;188). Untersuchungen haben ergeben, dass dieser Effekt zumindest partiell auf einer spezifischen Hemmung der I κ B-Kinase (IKK) beruht (59;80). IKK ist eine durch TNF α induzierbare inflammatorische Kinase (Übersichtsartikel: (69;87)), die aus zwei katalytischen Untereinheiten (α und β) sowie einer regulatorischen Untereinheit (IKK γ) besteht (110;193). IKK α und IKK β sind weitgehend homolog, wobei die katalytische Aktivität der IKK β höher (101) und für die IKK-Funktion essentiell ist (103;146). Eine direkte Interaktion von IKK und IRS-1 im Zellmodell wurde bereits nachgewiesen, ebenso eine durch IKK verursachte Phosphorylierung von IRS-1 an Serin 307 (57). Da nach Ausschalten dieses Serins durch eine Punktmutation immer noch eine unverändert hohe Phosphorylierung des mutierten IRS-1 durch die IKK *in*

in vitro gegeben ist, werden weitere, bisher noch nicht genauer identifizierte Serinreste als mögliche Phosphorylierungsstellen für die IKK postuliert (57). Falls sich derartige Phosphorylierungsstellen im Bindungsbereich der SH2-Proteine befinden, wäre eine durch die IKK bedingte gesteigerte Insulinresistenz mittels Störung der Signalweiterleitung vorstellbar (34).

Eine weitere Serinkinase, die im Zusammenhang mit dem „Aspirin-Effekt“ diskutiert wird, ist die c-Jun NH₂-terminale Kinase (JNK) (16;59). JNK ist eine Stress-aktivierte Protein Kinase, die unter anderem mittels TNF α und Anisomycin induziert werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass Abwesenheit der JNK zu einer Erhöhung der Insulinsensitivität führt (75). Desweiteren wurde beobachtet, dass eine verstärkte Serinphosphorylierung von IRS-1 mit erhöhter JNK-Aktivität einhergeht (157). Die IRS-1 Serine 307 und 302 wurden als Phosphorylierungsstellen der JNK identifiziert (2;176). Als möglicher Mechanismus der Insulinsignal-Inhibition durch das phosphorylierte Serin 307 wurde eine Störung der IR-IRS Bindung beschrieben (3).

Da eine durch Insulin, Anisomycin, TNF α oder Aminosäurezufuhr ausgelöste Serin 307 Phosphorylierung mit erhöhter Aktivität des „mammalian target of rapamycin“ (mTOR) assoziiert ist und mTOR mit dem IRS-1 direkt interagiert, wurde auch mTOR selbst als eine Serin 307 Kinase vorgeschlagen (26). Dabei kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass mTOR nur mittelbar über eine Aktivierung der JNK oder IKK an der Phosphorylierung des Serins 307 beteiligt ist. Desweiteren wurde eine mTOR-vermittelte, durch Rapamycin inhibierbare Phosphorylierung des Serins 632, welches in einem für mTOR spezifischem Phosphorylierungsmotiv liegt, dokumentiert (122). Auch hier konnte eine unmittelbare Phosphorylierung durch mTOR nicht eindeutig belegt werden.

Auch weitere Serinkinasen sind in der Lage, die Signaltransduktion über diesen Mechanismus zu stören. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die atypische Proteinkinase C zeta (PKC ζ) das IRS-1 an mehreren Serinresten phosphorylieren kann. Dazu zählen die Serine 612, 570, 493 (147) und 318 (111;174). Insbesondere die Phosphorylierung an Serin 570 trägt dazu bei, *in vitro* die Wechselwirkung von IRS-1 mit der zu den SH2-Proteinen gehörenden Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-

Kinase) zu schwächen (147). Da die PI3-Kinase zu den Schlüsselmolekülen der Insulinsignalkaskade zählt, wäre eine Insulinresistenz als Folge der übermäßigen Phosphorylierung von IRS-1 an Serin 570 denkbar.

Die inhibitorische Wirkung der IRS-1 Serinphosphorylierung auf die Insulinsignalkaskade wurde in den letzten Jahren ausgiebig untersucht. So konnte mehrfach gezeigt werden, dass gesteigerte IKK bzw. JNK Aktivität das Insulinsignal in 3T3-Adipocyten (54;58;65;70;74;98) und im Tiermodell (72;75;81;157;173) negativ moduliert.

Dennoch ist die Rolle dieser Kinasen bei der Entstehung der Insulinresistenz nicht endgültig geklärt. Aktuelle Studien an Patienten zeigen, dass vorhandene Mutationen des IKK β Genes keinen wesentlichen Einfluss auf die Entwicklung von Diabetes haben (109). Andere Berichte belegen, dass die Entwicklung von Insulinresistenz im Maus-Modell weitgehend unabhängig von der IKK erfolgt. Fehlende Expression der IKK β im Skelettmuskel bzw. eine generell um 50% reduzierte IKK β Expression schützen die Versuchstiere nicht vor einer induzierten Insulinresistenz (136). Ebenso wurde berichtet, dass eine Überexpression der JNK im Maus-Skelettmuskel nicht zu einer Zunahme der IRS-1 Phosphorylierung an Serin 307 oder einer Abnahme der Tyrosin-Phosphorylierung des IRS-1 führte (53). Ausserdem konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung der JNK für die durch oxidativen Stress verursachte Hemmung des insulinstimulierten Glucosetransports und der insulinstimulierten Glycogensynthese in L6 Muskelzellen nicht notwendig ist (21). Insbesondere in Muskelzellen ist eine inhibitorische Wirkung der Serinkinasen auf die Insulinsignalkaskade bislang nur unzureichend belegt.

1.4 Ziel der Arbeit

Die vorliegende Arbeit hat das Ziel, den Einfluss der IRS-1 Serinphosphorylierung auf die Insulinsignaltransduktion zu untersuchen. Auf molekularer Ebene soll zunächst *in vitro* die Fähigkeit der IKK zur IRS-1 Phosphorylierung überprüft werden. Gegebenenfalls sollen noch unbekannte Phosphorylierungsstellen innerhalb der PI3-K bindenden Domäne des IRS-1 charakterisiert werden.

Um die zelluläre Relevanz erhöhter Serinkinase-Aktivität im Muskel zu überprüfen, sollen ausgewählte Serinkinasen in einer Kardiomyoblasten-Zelllinie aktiviert beziehungsweise überexprimiert werden. Anschliessend sollen mögliche, daraus resultierende Veränderungen in der Weiterleitung des Insulinsignals untersucht werden.

Darüberhinaus soll ein zelluläres Resistenzmodell etabliert werden, welches eine Hemmung der Signalkaskade aufgrund der negativen Rückkopplung des Insulinsignals simuliert. Die an diesem Vorgang beteiligten Faktoren sollen identifiziert werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Allgemeine Chemikalien

17-(Allylamino)-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG)	Sigma, München
Acetornitril, Gradient Grade	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Sigma, München
Anisomycin	Sigma, München
ATP	Roche, Mannheim
BIM I (Bisindolylmaleimid I)	Calbiochem, San Diego, CA, USA
Dimethyldichlorsilan	Applichem, Darmstadt
GelCode Blue Stain Reagent	Pierce, Rockford, IL, USA
Geneticin G418	Invitrogen, Karlsruhe
Immobilon-P, Porengröße 0,45 µm	Millipore, Schwalbach
Inhibitoren der IKK, JNK, PKC α und GSK3	Sanofi-Aventis, Frankfurt
Insulin (aus Schweinepankreas)	Sigma, München
Milchpulver, fettarm	Applichem, Darmstadt
Okadainsäure	Sigma, München

PI3-Kinase Inhibitor (LY294002)	Biosource, Solingen
Phosphatidylserin	Sigma, München
Proteasen-Inhibitoren-Cocktail	Roche, Mannheim
Protein A Trisacryl (GF-2000)	Pierce, Rockford, IL, USA
Rapamycin	Cell Signaling Technology, Frankfurt
Restore Western Blot Stripping Buffer	Pierce, Rockford, IL, USA
Rinderserum Albumin (Fraktion V)	Applichem, Darmstadt
Rinderserum Albumin (reinst)	Behring, Marburg
Ro-31-8220 in Solution (PKC-Inhibitor)	Calbiochem, San Diego, CA, USA
TNF α (tumor necrosis factor- α)	Sigma, München
UptiLight HRP Chemiluminescenz-Substrat	Uptima, Montlucon, Frankreich

Soweit nicht anders aufgeführt, wurden alle weiteren Chemikalien von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (München), Roth (Karlsruhe) und Amersham (Freiburg) in *p.A.* Qualität bezogen.

2.1.2 Radiochemikalien

[γ - ³² P]-ATP Redivue (spezifische Aktivität > 5.000 Ci/mmol)	Amersham, Freiburg
Anti-Mouse Ig [¹²⁵ I] (Schaf Anti-Maus Ig, radioaktiv markiert)	Amersham, Freiburg

2.1.3 Antikörper

Anti-IRS-1 (Immunopräzipitation, Detektion des IRS-1 Fusionsproteins)	Polyklonales Kaninchen-Antiserum, gerichtet gegen einen rekombinanten Proteinabschnitt (AS 581-857) des IRS-1 der Ratte (120); (Dr. J. A. Maassen, Leiden, Niederlande)
Anti-IRS-1 (Immunodetektion)	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper (Upstate Biotechnology Inc., Lake Placid, NY, USA)
Anti-Phospho-IRS-1 (Ser307)	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper (Upstate Biotechnology Inc., Lake Placid, NY, USA)
Anti-Phospho-IRS-1 (Ser312)	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper (Biosource, Solingen)
Anti-Phospho-Tyrosin (PY99-HRP)	Monoklonaler Maus-Antikörper, Meerettich-Peroxidase gekoppelt (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA)
Anti-p85α	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper (Upstate Biotechnology Inc., Lake Placid, NY, USA)
Anti-PKCζ	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper (Upstate Biotechnology Inc., Lake Placid, NY, USA)
Anti-Phospho-PKCζ/λ (Thr410/403)	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper (Cell Signaling Technology, Frankfurt)
Anti-IRβ	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen die β -Untereinheit des Insulin-Rezeptors (Upstate Biotechnology Inc., Lake Placid, NY, USA)
Anti-Phospho-IR/IGF1R (pYpY1158/1162/1163)	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper (Biosource, Solingen)
Anti-Akt	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper (Cell Signaling Technology, Frankfurt)
Anti-Phospho-Akt (Thr308)	Monoklonaler Kaninchen-Antikörper, Klon 244F9 (Cell Signaling Technology, Frankfurt)

Anti-Phospho-Akt (Ser473)	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper (Cell Signaling Technology, Frankfurt)
Anti-IkBα	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper (Cell Signaling Technology, Frankfurt)
Anti-Phospho-IkBα (Ser32)	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper (Cell Signaling Technology, Frankfurt)
Anti-GSK3α/β	Monoklonaler Maus-Antikörper (Stressgen, Victoria, Canada)
Anti-Phospho-GSK3α/β (Ser21/9)	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper (Cell Signaling Technology, Frankfurt)
Anti-SAPK/JNK	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper (Cell Signaling Technology, Frankfurt)
Anti-phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)	Monoklonaler Maus-Antikörper, Klon G9 (Cell Signaling Technology, Frankfurt)
Anti-PDK1	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper (Cell Signaling Technology, Frankfurt)
Anti-Phospho-PDK1 (Ser241)	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper (Cell Signaling Technology, Frankfurt)
Anti-Hsp90	Monoklonaler Maus-Antikörper, Klon AC88 (Stressgen, Victoria, Canada)
Anti-β-Tubulin	Monoklonaler Maus-Antikörper (Calbiochem, San Diego, CA, USA)
Anti-c-Myc (Ab-1)	Monoklonaler Maus-Antikörper, Klon 9E10 (Calbiochem, San Diego, CA, USA)
Anti-Rab11	Monoklonaler Maus-Antikörper (Becton Dickinson, Heidelberg)

Anti-Rabbit IgG	Ziege anti-Kaninchen IgG (H + L), Meerrettich-Peroxidase gekoppelt (Promega, Mannheim)
Anti-Mouse IgG	Ziege anti-Maus IgG (H + L), Meerrettich-Peroxidase gekoppelt (Promega, Mannheim)
Anti-Mouse Ig [¹²⁵I]	Schaf Anti-Maus Ig, radioaktiv markiert mit [¹²⁵ I] (Amersham, Freiburg)

2.1.4 Enzyme

α -Thrombin, bovine	Upstate Biotechnology Inc., Lake Placid, NY, USA
IKK beta, active (rekombinant)	Upstate Biotechnology Inc., Lake Placid, NY, USA
IKK-Komplex (Aufreinigung aus HeLa Zellen)	wurde freundlicherweise von der Firma Aventis, Frankfurt zur Verfügung gestellt
MEKK1 (rekombinant, trunkeerte Form, enthält C-terminale katalytische Domäne)	wurde freundlicherweise von der Firma Aventis, Frankfurt zur Verfügung gestellt
Protein Kinase C (PKC) aus Rattengehirn	Calbiochem, San Diego, CA, USA
PKC ζ human, rekombinant	Calbiochem, San Diego, CA, USA
Trypsin, modifiziert, sequencing grade	Roche, Mannheim

Restriktionsenzyme *StuI*, *NotI*, *SaI*, *HinDIII* sowie T4 DNA Ligase wurden von NEB in Frankfurt bezogen. Die Pfu Turbo DNA-Polymerase und dNTP-Mix stammen von Stratagene (La Jolla, CA, USA). Die Anwendung erfolgte unter Verwendung der mitgelieferten Puffer nach Herstellerprotokoll.

2.1.5 Kit-Systeme

Adeno-X Rapid Titer Kit	Clontech, Mountain View, CA, USA
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad, München
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAfilter Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, La Jolla, CA, USA

2.1.6 Bakterienstämme

Zur Plasmidamplifikation wurden „One Shot TOP10 Chemically Competent *E. coli*“ der Firma Invitrogen (Karlsruhe) verwendet (Genotyp: $F^- mcrA \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC) \phi 80/lacZ\Delta M15 \Delta lacX74 recA1 araD139 \Delta(araleu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG$).

Zur Proteingewinnung wurden „BL21 CodonPlus-RP Competent Cells“ der Firma Stratagene, La Jolla, CA, USA eingesetzt (Genotyp: *E. coli* B $F^- ompT hsdS (r_B^- m_B^-) dcm^+ Tet^r gal endA Hte [argU proL Cam^r]$).

2.1.7 Adenoviren

Adenovirale Vektoren zur Überexpression der PKC ζ (Wildtyp) sowie „mock“-Kontrollvektoren wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Farese (University of South Florida College of Medicine, Tampa, Florida, USA) zur Verfügung gestellt (12).

2.1.8 Zellen und Zellkulturmedien

H9c2-E2 Zelllinie	Adhärenente Kardimyozyten der Ratte im Myoblastenstadium (American Type Culture Collection, Maryland, USA). Klon E2 überexprimiert stabil den humanen Insulinrezeptor (167)
HeLa Zelllinie	Adhärenente humane Cervix-Karzinom-Zelllinie
Hek 293	Adhärenente humane embryonale Nierenzellen-Linie

In der Zellkultur wurden folgende Grundmedien der Firma Invitrogen (Karlsruhe) eingesetzt:

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) (1X), liquid (Low Glucose), with L-Glutamine, 1000 mg/L D-Glucose, Sodium Pyruvate, 25 mM HEPES
- Dulbecco's Modified Eagle Medium:Nutrient Mix F-12 (D-MEM/F-12) (1X), liquid, 1:1, with L-glutamine and HEPES buffer
- PBS Dulbecco's (w/o sodium bicarbonate)
- Trypsin-EDTA (0.05% Trypsin, with EDTA 4Na) (1X)
- MEM Non-Essential Amino Acids Solution 10 mM (100X), liquid
- Penicillin-Streptomycin, liquid, contains 5,000 units of penicillin and 5,000 ug of streptomycin
- FCS

2.1.9 Nukleinsäuren

2.1.9.1 Oligonucleotide

Die folgenden Oligonucleotide wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) hergestellt.

PR1: 5'-TCG AGC TGC AGG CAT GCA-3'

PR2: 5'-AGC TTG CAT GCC TGC AGC-3'

PR3: 5'-ATA CGT GTC GAC ATG GCG AGC CCT CGG GAG AG-3'

PR4: 5'-ATA AGA ATG CGG CCG CCT ACT GAC GGT CCT CTG GCT G-3'

PR5: 5'-TCC AGG CCT GCC ACC ATG TAC CCA TAC GAC GTC-3'

PR6: 5'-TAC GTC GAC AGC GTA GTC TGG GAC GTC GTA TGG GTA-3'

PR7: 5'-TGG ATG TTG CCT TTA CTT CT-3'

PR8: 5'-TCA AAG AGG TCT GGC AAG TG-3'

PR9: 5'-CCT CGG TGG ACG GCA GCC CT-3'

PR10: 5'-GGT TCC GAA AGA GAA CTC AC-3'

PR11: 5'-CAA ACG GGG TAG GGG GCC AC-3'

PR12: 5'-AGC AGC AGC CCT TGC TGC AC-3'

PR13: 5'-TGG GGG GCC CAC AAG GAC CT-3'

PR14 5'-ATA TCC CAC CAG AAG GCC CCC TCG CAG TCC T-3'

PR15 5'-AGG ACT GCG AGG GGG CCT TCT GGT GGG ATA T-3'

PR16 5'-CCT ACC CAC CAG GAG GTG GCG CTG GAG GCC GAC TGC CCG GCT-3'

PR17 5'-AGC CGG GCA GTC GGC CTC CAG CGC CAC CTC CTG GTG GGT AGG-3'

PR18 5'-GGT GCT ACC ATG GGG ACA GCC CCG GCG CTG ACT GGA GAC-3'

PR19 5'-GTC TCC AGT CAG CGC CGG GGC TGT CCC CAT GGT AGC ACC-3'

2.1.9.2 Rekombinante Plasmide

pCMVbeta	Exprimiert <i>E. coli</i> Beta-Galactosidase unter der Kontrolle des Cytomegalovirus-Promotors (Clontech, Heidelberg, Germany)
mock pCMV	pCMVbeta-Derivat, hier wurde die Beta-Galactosidase-Sequenz mittels einer <i>NotI</i> -Restriktion deletiert (Leervektor)
pCMV GLUT4myc	pCMVbeta-Derivat, exprimiert GLUT4myc anstelle von Beta-Galactosidase (167)
pCMV HA hIRS-1	pCMVbeta-Derivat, enthält die vollständige cDNA Sequenz des humanen IRS-1 aus pGX-5X-3-hIRS-1 mit einem N-terminalen Hämagglutinin-Tag anstelle von Beta-Galactosidase (kloniert im Rahmen der vorliegenden Arbeit)
pGX-5X-3	Genbank Acc. Nr: U13858; Amersham, Freiburg
pGX-5X-3-hIRS-1	pGX-5X-3-hIRS-1 enthält die vollständige cDNA Sequenz des humanen IRS-1. Dieses Konstrukt wurde von der AG Prof. Dr. Jürgen Eckel für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.
pGX-5X-3-rIRS-1⁴⁴⁹⁻⁶⁶⁴	pGX-5X-3-rIRS-1 ⁴⁴⁹⁻⁶⁶⁴ enthält die Aminosäuren 449-664 des IRS-1 der Ratte (Dr. Zhihua Ran, DDFI).

2.2 Methoden

2.2.1 Transformation und Plasmidamplifikation in Bakterien

Für eine Transformation wurde ein Aliquot (50 µl) der chemisch kompetenten E.coli (Top10 bzw. BL21 CodonPlus) aufgetaut, 15 min auf Eis gekühlt und, nach Zugabe von 5 µl des Ligationsansatzes bzw. 50 ng Plasmid-DNA, weitere 30 min auf Eis gehalten. Nach definiertem Hitzeschock bei 42°C für 30 Sekunden wurde die Reaktion kurz auf Eis abgekühlt, in 250 µl SOC-Medium (Invitrogen, Karlsruhe) aufgenommen und 1 h bei 37°C unter Schütteln (220 rpm) inkubiert. Jeweils 50 und 200 µl der Bakteriensuspension wurden über Nacht auf Ampicillin-haltigem (100 µg/ml, Roche Molecular Biochemicals) LB-Agar (Gibco BRL, Luria Broth Base) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA

2.2.2.1 Analytische Präparation

Einzelkolonien wurden in 5 ml LB-Medium (Invitrogen, Karlsruhe) mit 100 µg/ml Ampicillin überimpft und über Nacht bei 37°C und 280 rpm inkubiert. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte aus 1,5 ml der LB-Kultur unter Verwendung des QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) entsprechend dem Herstellerprotokoll.

2.2.2.2 Präparative Plasmidisolierung

150 ml ampicillinhaltiges LB-Medium wurden mit einer E.coli Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C und 280 rpm inkubiert. Die präparative Isolierung erfolgte nach Herstellerprotokoll unter Einsatz des QIAfilter Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden).

2.2.3 Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

Die Konzentration der Nukleinsäuren wurde über photometrische Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm bestimmt. Die Reinheit der Präparation wurde anhand des Verhältnisses von OD 260 nm zu OD 280 nm beurteilt, dieses betrug typischerweise ca. 1,8.

2.2.4 Restriktion von DNA

Die Restriktionsanalyse der Nukleinsäuren wurde mit Enzymen von NEB (Frankfurt) in dem vom Hersteller mitgeliefertem Puffer im Verhältnis von 10 U / μg DNA im Gesamtvolumen von 20 μl für 1 h bei 37°C durchgeführt.

2.2.5 Auftrennung von DNA in nativen Agarose-Gelen

Zur Analyse von Plasmid-DNA wurden die Proben mit 1/10 Volumen Blaumarker (25% (w/v) Bromphenolblau, 1% SDS; 1mM EDTA; 30% (w/v) Glycerol) versehen und in 1%igen Agarosegelen (Biozym, Hamburg) elektrophoretisch aufgetrennt. Als Gel- und Laufpuffer diente dabei 1 x TAE (40 mM Tris-HCl pH 7,8; 0,114% (v/v) Essigsäure; 1 mM EDTA), zur Kontrolle wurde die 100 bp- und 1 kb-DNA-Leiter (NEB, Frankfurt) eingesetzt. Die horizontale Auftrennung erfolgte mit einer Feldstärke von 5 V/cm. Anschließend wurde das Gel für 15 min in einer wässrigen Ethidiumbromidlösung (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) gefärbt und unter UV-Licht (254 nm) detektiert und dokumentiert.

2.2.6 Ligation von Plasmid-DNA

Ligation von DNA-Fragmenten wurde mit 400 U T4 DNA Ligase (NEB, Frankfurt) im mitgeliefertem Reaktionspuffer für 1 h bei 37°C durchgeführt. Dabei wurden jeweils ca. 100 ng Vektor-DNA und 300 ng Insert-DNA in einem Endvolumen von 20 μl eingesetzt.

2.2.7 Ortspezifische Mutagenese

Folgende Mutanten des Fusionsproteins rIRS-1⁴⁴⁹⁻⁶⁶⁴ wurden mittels ortsspezifischer Mutagenese im Rahmen dieser Arbeit erzeugt: T534A, S560A und S293A. Die Mutagenese wurde mit dem „QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ der Firma Stratagene (La Jolla, CA, USA) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Als Primer dienten die Oligonucleotide PR 14/PR15 (T534A); PR16/PR17 (S560A) und PR18/PR19 (S293A). Als Vorlage in der DNA-Polymerase-Kettenreaktion (PCR) diente das Plasmid pGX-5X-3-rIRS-1⁴⁴⁹⁻⁶⁶⁴. Die Amplifikation durch die Pfu-Polymerase erfolgte im mitgelieferten Puffer unter folgenden Bedingungen: 30 s 95°C Denaturierung; 16 x (30 s 95°C Denaturierung; 1 min Bindung der Primer an die DNA: Annealing; 11 min DNA-Synthese: Elongation). Anschliessend wurde der Ansatz mit *DpnI* Endonuklease verdaut, um spezifisch die methylierte PCR-Vorlage (Plasmid pGX-5X-3-rIRS-1⁴⁴⁹⁻⁶⁶⁴) zu entfernen. Die verbleibende, neu synthetisierte und daher nicht-methylierte Plasmid-DNA wurde in *E. coli* transformiert.

2.2.8 DNA Sequenzierungen

DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma Qiagen (Hilden) durchgeführt. Alle neu hergestellten Plasmide wurden mittels DNA-Sequenzierung überprüft.

2.2.9 Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Nach Transformation von pGX-5X-3 beziehungsweise pGX-5X-3-rIRS-1⁴⁴⁹⁻⁶⁶⁴ (Wildtyp bzw. Mutante) in *E. Coli* BL21 CodonPlus wurden 8 ml 2x YTA-Medium (Tryptone 16 g/l; Hefeextrakt 10 g/l; NaCl 5 g/l; Ampicillin 100 mg/l) mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C und 280 rpm inkubiert. Die Kultur wurde anschliessend mit frischem 2x YTA-Medium 1:100 verdünnt und bei 30°C und 280 rpm bis zum Erreichen einer Dichte von OD₆₀₀=0,6 inkubiert. Die Expression der Proteine wurde durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 0,1 mM induziert. Nach 3 weiteren Stunden wurden die Bakterien bei 4°C für 10 min bei 7700 g pelletiert. Das Pellet wurde in 40 ml PBS (140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄ pH 7,3; mit Complete Protease-Inhibitor Coctail) re-

suspendiert und mit einem Sonikator durch Ultraschall aufgeschlossen. Nach Zugabe von Triton X-100 in einer Endkonzentration von 1% wurde das Lysat für 30 min bei Raumtemperatur solublisiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 12.000 g für 10 min bei 4°C, der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und mit 800 µl Glutathion-Sepharose 4G (50%, äquibriert mit PBS, Amersham, Freiburg) bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Die Sepharose wurde auf eine Säule geladen und mit dem 10fachen Volumen eiskaltem PBS gewaschen. Die Elution des GST bzw. der GST-Fusionsproteine erfolgte dreimal für 10 min mit jeweils 400 µl Elutionspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,00; 10 mM Glutathion, reduziert). Die Eluate wurden vereinigt und nach einer Proteinbestimmung bei -20°C aufbewahrt.

```

1  MSPILGYWKI  KGLVQPTRLL  LEYLEEKYEE  HLYERDEGDK  WRNKKFELGL
51  EFPNLPYYID  GDVKLTQSMA  IIRYIADKHN  MLGGCPKERA  EISMLEGAVL
101 DIRYGVSRIA  YSKDFETLKV  DFLSKLPEML  KMFEDRLCHK  TYLNGDHVTH
151 PDFMLYDALD  VVLYMDPMCL  DAFPKLVCFK  KRIEAIPQID  KYLKSSKYIA
201 WPLQGWAQTF  GGGDHPPKSD  LIEGRGIPRN  SRVDHTPPAR  GEEELSNYIC
251 MGGKGASTLT  APNGHYILSR  GGNGHRYIPG  ATMGTSPALT  GDEAAGAADL
301 DNRFRKRTHS  AGTSPTISHQ  KTPSQSSVVS  IEEYTEMPA  AYPPGGGSGG
351 RLPGYRHSAF  VPTHSYPEEG  LEMHHLERRG  GHHRPDSNL  HTDDGYMPMS
401 PGVAPVPSNR  KGNGDYMPMS  PKSVSAPQQI  INPIRRHPQR  VDPNGYMMMS
451 PSAAAS

```

Abb. 4 Aminosäuresequenz des wildtyp rIRS-1⁴⁴⁹⁻⁶⁶⁴ Fusionsproteins.

Grün: enthaltene Sequenz der Glutathion-S-Transferase; rot: Aminosäuren des IRS-1 der Ratte.

2.2.10 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentrationen wurden nach der Bradford-Methode mit dem Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, München) bestimmt. Der Test beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums einer sauren Coomassie Brilliant Blue G-250 Lösung von 465 nm auf 595 nm bei Bindung von Proteinen. Die Konzentrationsbestimmung wurde für jede Probe in drei Verdünnungen (für Lysate in der Regel 1:50, 1:100 und 1:200) und in Doppelbestimmung durchgeführt. Jeder Ansatz enthielt 800 µl wässrige Proteinlösung und 200 µl Bradford-Reagenz (Protein-Assay, Bio-Rad). Die Messung der Absorption bei 595 nm erfolgte in Mikrotiterplatten (Roth, Karlsruhe) gegen eine Standard-Proteinlösung aus Rinderserumalbumin mit der Konzentration von 1 mg/ml.

2.2.11 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen wurde das Multiphor II System von Amersham (Freiburg) verwendet. Die Proben wurden mit 6fach konzentriertem Laemmli-Probenpuffer (0,35 M Tris-HCl pH 6.8; 10,28% (w/v) SDS; 36% (w/v) Glycerin; 0,6 M DTT; 0,012% (w/v) Bromphenolblau) versetzt und 5 min bei 95°C im Heizblock denaturiert. Die Auftrennung erfolgte in 0,5 mm dicken, foliengebundenen SDS-Polyacrylamid Gelen (Grandient 8-18% bzw. 7,5-15%) in Kombination mit Pufferstreifen (ExcelGel SDS Buffer Strips, Amersham, Freiburg) in einer horizontalen Elektrophoresekammer bei 10°C, einer konstanten Stromstärke von 50 mA und einer variablen Spannung von maximal 600 V. Als Referenz diente dabei Prestained Protein Marker, Broad Range (6-175 kDa) von NEB (Frankfurt) sowie Biotinylated Protein Ladder Detection Pack (10-200 kDa) von Cell Signaling Technology (Frankfurt).

2.2.12 Coomassie-Färbung der Acrylamid-Gele

Die Färbung der im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurde mit dem GelCode Blue Stain Reagent (Pierce, Rockford, IL, USA) durchgeführt. Das Gel wurde zunächst 3 x 5 min in destilliertem Wasser gewaschen, 1 h mit dem Färbereagenz inkubiert und anschliessend für 30 bis 60 min in destilliertem Wasser gewaschen.

2.2.13 Transfer der Proteine auf Membranen

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden diese in einer Multiphor II NovaBlot Kammer im Semidry-Verfahren auf PVDF Membranen transferiert. Das dazu verwendete diskontinuierliche Puffersystem bestand aus 3 Pufferlösungen: Anodenlösung I (300 mM Tris; 20% (v/v) Methanol), Anodenlösung II (25 mM Tris; 20% (v/v) Methanol) und Kathodenlösung (40 mM 6-Aminohexansäure; 0,01% (w/v) SDS; 20 % (v/v) Methanol). Zuerst wurden 6 Filterpapiere in Anodenlösung I getränkt und auf die Anodengraphitplatte gelegt. Nach Ablösung des in Anodenlösung II äquilibriumierten Gels von der Trägerfolie erfolgte Aufbringung der in Methanol und Anoden-

puffer II voräquilibrierten PVDF-Membran sowie drei in Anodenlösung II getränkter Filterpapiere auf das Gel. Dieses Paket wurde kopfüber auf die in Anodenlösung getränkten Filterpapiere auf der Anodenplatte gelegt. Anschließend wurden 9 Filterpapiere in Kathodenlösung getränkt, auf den Stapel gelegt und der gesamte Blot mit der Kathodengraphitplatte abgedeckt. Der Proteintransfer erfolgte bei Raumtemperatur mit einer Stromstärke von $0,8 \text{ mA/cm}^2$, einer variablen Spannung bis zu 20 V und einer variablen Leistung bis zu 5 W für einen Zeitraum von 45 min.

2.2.14 Immunodetektion

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Blotmembranen nach dem Proteintransfer für 1 h in Blockierlösung (10 mM Tris / 0,1 M NaCl pH 7,5; 0,01% Tween; 5% Magermilchpulver bzw. 1% BSA) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreifachem Waschen in TBST (10 mM Tris / 0,1 M NaCl pH 7,5; 0,01% Tween) für jeweils 1 min folgte eine Inkubation mit den gewünschten Antikörperlösungen (nach Herstellerangaben) bei 6°C über Nacht. Nach erneutem dreimaligen Waschschrift in TBST für jeweils 5 min wurden die Membranen mit entsprechenden peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörpern (Promega, Mannheim) in TBST mit 5% Magermilchpulver für 1 h inkubiert. Dieser Schritt entfiel bei der Verwendung des PY99-Antikörpers, da dieser bereits als Peroxidase-Konjugat vorlag. Anschließend wurden die Membranen für 1 h mehrfach mit TBST gewaschen, 1 min in dem Uptilight Chemilumineszenz-Substrat (Uptima, Montlucon, Frankreich) inkubiert und an einer Lumi-Imager Station (Roche, Mannheim) mit Hilfe der dazugehörigen LumiA3 Software erfasst und quantifiziert.

2.2.15 Strippen von Blotmembranen

Zur Entfernung der gebundenen Antikörper von der Blotmembran wurde Restore Western Blot Stripping Buffer (Pierce, Rockford, IL, USA) verwendet. Die bereits detektierte Membran wurde 30 min bei RT in der Lösung inkubiert, für 1 h mehrfach mit TBST gewaschen und konnte anschließend für eine erneute Detektion eingesetzt

werden. Gestrippte Membranen wurden für eine Redetektion mit Anti-Tubulin Antikörper zur Normierung der tatsächlichen Proteinmenge eingesetzt.

2.2.16 Tryptische Spaltung von Proteinen im SDS-Gel

Zur Generierung von tryptischen Peptiden für folgende HPLC-Analysen wurden die phosphorylierten Fusionsproteine nach einer elektrophoretischen Auftrennung mittels SDS-PAGE im SDS-Gel mit Trypsin gespalten. Dazu wurde die entsprechende Bande nach erfolgter Visualisierung durch Coomassie-Färbung aus dem Gel ausgeschnitten und für 10 min bei 30°C im Waschpuffer (50 mM NH_4HCO_3 pH 7,8) entfärbt. Nach Entfernung des Waschpuffers folgte eine dreimalige Inkubation in Waschpuffer/Acetonitril (1:1) für jeweils 10 min bei 30°C. Anschliessend wurde die entfärbte Gelbande unter Vakuum in einer SpeedVac getrocknet. Die getrocknete Gelbande wurde mit einer Trypsinlösung (Roche, Mannheim; 0,1 mg/ml in 0,1 mM HCl) im Verhältnis von 30 ng Trypsin auf 1 μg Protein getränkt und nach 15 min mit Waschpuffer bedeckt. Nach einer Inkubation bei 37°C über Nacht wurden die Peptide durch eine Beschallung für 20 min im Ultraschallbad aus dem Gel eluiert. Die Elution im Ultraschallbad wurde zweimal nach jeweils erneuter Zugabe von Waschpuffer/Acetonitril (1:1) wiederholt. Die Überstände wurden zusammengeführt und unter Vakuum in der SpeedVac eingeeengt.

2.2.17 HPLC-Analyse tryptischer Peptide

Die durch proteolytische Spaltung gewonnenen Peptide wurden mittels HPLC (High Performance Liquid Chromatography) an einem Gold System (Beckmann, Krefeld) analysiert. Für eine Chromatographie wurden jeweils die tryptischen Peptide aus 12,8 μg bzw. 51,2 μg (0,25 bzw. 1 nmol) des zuvor unter Zugabe von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ phosphorylierten IRS-1 Fusionsproteins eingesetzt. Die aus dem Gel eluierten Peptide wurden dazu in Laufpuffer A aufgenommen (20 mM Ammoniumacetat, pH 7,0) und mit einer Flussrate von 0,5 ml/min über eine Anionenaustauschersäule (Nucleogel SAX 8/46; 50 x 4,6 mm, Macherey-Nagel, Düren) aufgetrennt. Die Elution erfolgte durch das Anlegen eines zweistufigen linearen Gradienten der Laufpuffer A und B

(Laufpuffer B: 1 M Kaliumdihydrogenphosphat, pH 4,0): 0-10 min: 0% B; 10-50 min: 10% B; 50-125 min: 50% B. Die Radioaktivität der gesammelten 0,5 ml-Fractionen wurde mittels Messung der Cerenkov-Strahlung bestimmt.

In Abb. 5 ist das charakteristische Elutionsprofil tryptischer Peptide des in dieser Arbeit eingesetzten IRS-1 Fusionsproteins nach einer vorausgegangenen Phosphorylierung mittels PKC ζ dargestellt.

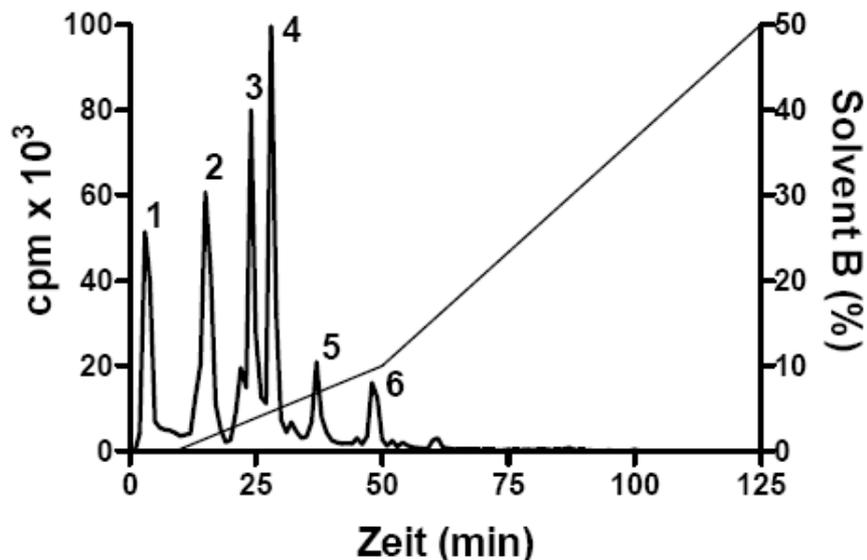


Abb. 5 Zweidimensionale Auftrennung tryptischer Peptide des IRS-1 Fusionsproteins nach einer Phosphorylierung mit PKC ζ .

Quelle: Inaugural-Dissertation „Molekulare Mechanismen der Insulinresistenz: Serinphosphorylierung von IRS-1“ M.R. Sommerfeld, 2004

2.2.18 *In vitro* Phosphorylierung des IRS-1 Fusionsproteins

2.2.18.1 PKC ζ und PKC aus Rattengehirn

Jeweils 0,5 μ g der PKC (rekombinante PKC ζ beziehungsweise PKC-Aufreinigung aus Rattengehirn) wurden in 20 μ l Phosphorylierungspuffer (20 mM HEPES pH 7,4; 1 mM DTT; 10 mM MgCl₂; 1,7 mM CaCl₂; 0,6 μ g/ μ l Phosphatidylserin; 50 μ M ATP) für 30 min bei 30°C zusammen mit 1 μ g des IRS-1 Fusionsproteins (Wildtyp oder Mutante) inkubiert. Als Inhibitoren wurden Bisindolylmaleimid I (Isoformen α , β und γ) in einer Konzentration von 1 mM sowie ein Pseudosubstratpeptid (PKC ζ) in einer

Konzentration von 400 μM eingesetzt. Gestoppt wurde die Reaktion durch Zugabe von Laemmli-Probenpuffer und Erhitzen auf 95°C. Die Proben wurden mittels SDS-Page aufgetrennt und für eine Immunodetektion bzw. HPLC aufgearbeitet.

2.2.18.2 IKK Komplex

Jeweils 8 μl der IKK-Aufreinigung aus HeLa-Zellen wurden mit 1 μg (für anschließende Detektion über SDS-Gele) beziehungsweise 12,8 μg (für Detektion mittels HPLC) des IRS-1 Fusionsproteins für 1 h bei 30°C inkubiert. Das Reaktionsvolumen betrug 20 μl , der Phosphorylierungspuffer bestand aus 50 mM HEPES; 10 mM MgCl_2 ; 10 mM β -Glycerophosphat; 0,01% NP-40; 5 mM DTT; 200 μM Na-Orthovanadat; 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Okadainsäure; 25 μM ATP und 20 μCi [γ - ^{32}P]-ATP. Durch Zugabe des Laemmli-Probenpuffers wurde die Reaktion gestoppt. Auftrennung der Proben erfolgte in 8-18% Gradient SDS-Gelen. Nach Coomassie-Färbung (s. 2.2.12) folgte eine autoradiographische Auswertung der SDS-Gele im Phospho-Imager (FUJIX BAS 1000 Bioimage System).

2.2.18.3 MEKK1

Die Phosphorylierung erfolgte wie in 2.2.18.2 beschrieben. Es wurden jeweils 2 μl der MEKK1-Aufreinigung eingesetzt.

2.2.18.4 IKK β

Die Phosphorylierung erfolgte wie in 2.2.18.2 beschrieben. Es wurden jeweils 8 μl (0,8 μg) der rekombinanten IKK β eingesetzt.

2.2.19 Bestimmung des Phosphateinbaus

Die Quantifizierung der eingebauten Radioaktivität erfolgte durch Messung der Cerenkov-Strahlung im Tritium-(^3H) Fenster des β -Szintillationszählers. Das in dieser Arbeit verwendete Isotop ^{32}P kann auf diese Weise mit einer Effizienz von ca. 50% detektiert werden.

2.2.20 Zellkultur

2.2.20.1 H9c2-E2

Bei der Zelllinie H9c2-E2 handelt es sich um adhärent wachsende Kardiomyozyten der Ratte im Myoblastenstadium, die aufgrund einer stabil integrierten Genkopie konstitutiv den humanen Insulinrezeptor exprimieren (167). Die Zellen wurden in DMEM (Dulbecco's modified Eagles's medium) supplementiert mit 10% fötalem Kälberserum (FCS), 1% nicht-essenziellen Aminosäuren (NEAA), Streptomycin (100 mg/ml), Penicillin (100 units/ml) und G418 (600 µg/ml; Sigma, München) in 175-cm² Zellkulturflaschen bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Alle verwendeten Grundmedien stammten von Invitrogen (Karlsruhe). Die Zellen wurden alle 3-4 Tage passagiert, das Medium wurde jeweils nach 2-3 Tagen gewechselt. Die Ablösung subkonfluenten Zell-Monolayer erfolgte nach einmaligem Waschen mit 10 ml PBS durch Trypsinierung mit 5 ml Trypsin-EDTA für 3 min bei 37°C. Anschliessend wurden die Zellen in 10 ml Kulturmedium aufgenommen und für 5 min bei 100 g pelletiert. Das Zellpellet wurde in vorgewärmten Kulturmedium resuspendiert, die Anzahl lebender Zellen wurde nach einer Trypanblau-Färbung (0,5% w/v Trypanblau) mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden bis maximal zur 40. Passage in Kultur gehalten.

2.2.20.2 HEK 293

Die adhärente humane embryonale Nierenzellen-Linie HEK 293 exprimiert stabil das Adenovirus 5 E1 Gen, so dass sie zur Vermehrung und Titration von replikationsdefizienten rekombinanten Adenoviren mit einer E1-Deletion eingesetzt werden kann. Es wurden nur sehr frühe Passagen (<10) verwendet. Die allgemeine Zellkultur erfolgte analog zu den H9c2-E2 Zellen, als Kulturmedium wurde „DMEM-Nutrient Mix F12“ supplementiert mit 10% FCS, Streptomycin (100 mg/ml) und Penicillin (100 units/ml) eingesetzt.

2.2.20.3 HeLa

Hierbei handelt es sich um eine adhärent wachsende, humane Cervix-Karzinom-Zelllinie. Diese Zellen wurden für den RCA-Test (Test auf rekombinationskompetente Adenoviren nach Fallaux et al., (47)) eingesetzt. Die allgemeine Zellkultur erfolgte analog zu den H9c2-E2 Zellen, als Kulturmedium wurde DMEM supplementiert mit 10% FCS verwendet.

2.2.21 Transiente Transfektion

Zur Transfektion von H9c2-Zellen wurde das nicht-liposomale Transfektionsreagenz FuGENE6 (Roche, Mannheim) eingesetzt. Es handelt sich um ein transientes Transfektions-Protokoll, bei dem die transfizierte DNA nicht stabil in das Genom integriert und nicht repliziert wird. Diese Transfektionsmethode wurde zur Überexpression von HA IRS-1 und GLUT4myc benutzt. Für die Expression von HA IRS-1 wurden in einer 6-well-Platte pro well $1,5 \times 10^5$ Zellen ausplattiert und 24 h kultiviert. Jeweils 2 µg DNA und 3 µl FuGENE6 wurden in 100 µl DMEM für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschliessend direkt in die 6-well-Platte pipettiert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen gewaschen und lysiert. Für die Überexpression von GLUT4myc wurden jeweils $3,5 \times 10^4$ Zellen pro well in einer 12-well-Platte ausplattiert und 24 h kultiviert. Transfektion erfolgte in dem Fall mit 0,5 µg DNA und 1,5 µl FuGENE6. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen zur Bestimmung der GLUT4-Translokation eingesetzt.

2.2.22 Adenovirale Überexpression

Die eingesetzten rekombinanten Adenoviren wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Farese (University of South Florida College of Medicine, Tampa, Florida, USA) (12) zur Verfügung gestellt. Sie basieren auf dem Adeno-X System der Firma Becton Dickinson (Heidelberg), welches auf das Adenovirus 5 Genom zurückgreift. Der adenovirale Vektor ist replikationsdefizient, da durch eine Deletion von E1 und E3 die essentiellen frühern Gene („early genes“) nicht exprimiert werden. HEK 293 Zellen enthalten das zur Replikation und Transkription der adeno-

viralen DNA notwendige Ad5 E1 Gen, so dass sie zur Produktion von funktionsfähigen Adenoviruspartikeln eingesetzt werden können. Bei Zelllinien, die kein Ad5 E1 Gen enthalten, führt das rekombinante Adenovirus zu einer transienten Infektion, die nicht lytisch verläuft. Das adenovirale Genom liegt dann in episomaler Form im Zellkern den Wirtszellen vor, wird aber nicht repliziert und nicht transkribiert. Das eingefügte Zielgen wird unabhängig davon konstitutiv unter der Kontrolle des Cytomegalovirus-Promotors (P_{CMVIE}) exprimiert.

2.2.22.1 Virusamplifikation

Zur Amplifikation der PKC ζ -exprimierenden adenoviralen Konstrukte bzw. der „leeren“ Kontroll-Adenoviren wurde die Helferzelllinie HEK 293 verwendet. Subkonfluente (ca. 50-70% Konfluenz) Zellmonolayer in T75 Zellkulturflaschen wurden nach erfolgreichem Mediumwechsel mit jeweils 100 μ l der adenovirushaltigen Überstände angeimpft. Nach 3 bis 4 Tagen in Kultur zeigten ca. 50% der Zellen cytopathische Effekte (Ablösen von der Oberfläche). Zu diesem Zeitpunkt wurden die verbleibenden Zellen durch Abspülen mit der Pipette abgelöst und die Zellsuspension für 5 min bei 1500 g pelletiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml PBS aufgenommen und mittels drei Gefrier-Auftau-Zyklen in Flüssigstickstoff und 37°C-Wasserbad aufgeschlossen. Die Zellaliquots wurden nach jedem Auftauen auf einem Vortex resuspendiert. Die Lysate wurden erneut zentrifugiert, um Zelltrümmer zu pelletieren. Der virushaltige Überstand wurde bei -20°C gelagert.

2.2.22.2 Virustiterbestimmung

Der Virustiter wurde mit dem Adeno-X Rapid Titer Kit (Becton Dickinson; Heidelberg) ermittelt. HEK 293 Zellen wurden in der Zelldichte von 5×10^5 Zellen pro Well in einer 12-well-Platte ausplattiert und mit jeweils 100 μ l einer seriellen Verdünnung des Virusamplifikats (10^{-2} bis 10^{-6} pro ml) infiziert. Nach 48 h wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen in der 12-well-Platte an der Luft getrocknet. Es folgte eine Fixierung mit jeweils 1 ml Methanol für 10 min bei -20°C. Nach dreimaligem Waschen (PBS, 1% BSA) wurden die Zellen 1 h mit 0,5 ml Anti-Hexon Antikörperverdünnung (1:1000 in PBS, 1% BSA) bei 37°C inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen folgte eine weitere einstündige Inkubation mit peroxidase-gekoppeltem Anti-Maus

Antikörper (1:500 in 0,5 ml PBS, 1% BSA) bei 37°C. Anschliessend wurden die Zellen erneut dreimal gewaschen und für 10 min in 500 µl DAB-Substrat inkubiert, welches eine Braunfärbung der infizierten Zellen bewirkte. Nach Entfernung des Substrats und Zugabe von je 1 ml PBS wurden die gefärbten Zellen unter einem Lichtmikroskop mit 20x Objektiv ausgezählt. Es wurden nur Wells ausgewertet, die zwischen 5 und 50 gefärbte Zellen pro Sichtfeld beinhalten. Die Titerzahl wurde wie folgt bestimmt: (Anzahl infizierter Zellen pro Sichtfeld) x 573 / (0,1 ml) x (Verdünnungsfaktor). Dabei ist 573 die Anzahl der Sichtfelder pro Well und 0,1 ml das zugegebene Volumen der Virusverdünnung.

2.2.22.3 RCA-Test

Der RCA-Test basiert auf der von Fallaux et al. (47) beschriebenen Methode. Um das Virusamplifikat auf replikationskompetente Viren zu testen, wurden subkonfluente (ca. 50-70% Konfluenz) Monolayer von HeLa- bzw. HEK 293 Zellen in T75 Zellkulturflaschen verwendet. Diese wurden nach zweimaligem Waschen in PBS mit 1 ml der Amplifikatverdünnung mit einer MOI (multiplicity of infection) von ca. 10 Viren pro Zelle für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschliessend wurde der Überstand abgenommen und die Zellen mit Kulturmedium versorgt. Die Kultur und Beobachtung der infizierten Zellen erfolgte für 10 Tage, dabei wurden die Zellen täglich auf das Auftreten von cytopathischen Effekten (Ablösen von der Oberfläche) untersucht. Die HEK-Zellen dienten dabei als Positivkontrolle, sie zeigten schon nach wenigen Tagen die typischen Anzeichen der Virusreplikation (Ablösen der Zellen). Die Virusamplifikate wurden als replikationsdefizient angesehen, wenn die infizierten HeLa-Zellen über den Zeitraum von 10 Tagen keinerlei cytopathische Effekte aufwiesen.

2.2.22.4 Infektion von H9c2-Zellen

Jeweils 1×10^5 Zellen pro well einer 6-well-Platte wurden 24 h nach der Aussaat mit dem gewünschten Virusamplifikat in einer MOI von 50 Viren pro Zelle infiziert. 24 h nach der Infektion wurden die Zellen für weitere Experimente verwendet.

2.2.23 Behandlung der Zellen und Herstellung von Zellysaten

Für die Stimulations- und Inhibitionsexperimente wurden subkonfluente Zellmonolayer der Zelllinie H9c2 in 6- beziehungsweise 12-Well-Platten verwendet. Nach gewünschter Behandlung wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und mit einem universalem Lysispuffer (Roche, Mannheim) für 5 min solubliert. Die aufgeschlossenen Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Boden der Platte gelöst und für 10 min bei 4°C und 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge pelletiert. Die Überstände wurden einem Proteintest nach Bradford unterzogen und für Western Blot Analysen verwendet.

2.2.24 Immunopräzipitation von Proteinen aus Zellysaten

Subkonfluente Zellmonolayer wurden nach gewünschter Behandlung zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und mit 400 µl (für 10 cm Petrischalen) beziehungsweise 150 µl (für Wells der 6-Well-Platten) RIPA (50 mM Tris-HCl [pH 7.4]; 1% Nonidet P-40; 0.25% Na-Deoxycholat; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM Na₃VO₄; 1 mM NaF und Protease-Inhibitor Complete™) solubliert. Die aufgeschlossenen Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Boden der Platte gelöst, in Eppendorf-Gefäße überführt und für 2 h bei 4°C in einem Überkopfschüttler inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 4°C für 15 min wurden die Überstände einer Proteinbestimmung nach Bradford unterzogen und mit PBS auf eine Proteinkonzentration von 1 µg/ml eingestellt. Zur präzipitation wurden jeweils 10 µl des Anti-IRS-1 Antikörpers pro 1000 µl Lysat eingesetzt. Die Lysate wurden mit dem präzipitierenden Antikörper bei 4°C im Überkopfschüttler über Nacht inkubiert. Im Anschluss wurden die Immunokomplexe mit 40 ml Protein A-Trisacryl pro 1000 µl Lysat für 2 h bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert um eine Adsorption an die Trägerpartikel zu erreichen. Die Immunopräzipitate wurden schließlich durch Zentrifugieren bei 4°C und 14.000 rpm für 10 sec pelletiert und drei Mal mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschliessend wurden die Präzipitate mit 6fach konzentriertem Laemmli-Probenpuffer (0,35 M Tris-HCl pH 6.8; 10,28% (w/v) SDS; 36% (w/v) Glycerin; 0,6 M DTT; 0,012% (w/v) Bromphenolblau) versetzt und 10 min bei 95°C im Heizblock denaturiert. Die Überstände wurden mittels Western Blot analysiert.

2.2.25 Bestimmung der Translokation von GLUT4

Die Bestimmung der GLUT4-Translokation basiert auf der Methode von Kanai et al. (84). Die transiente Transfektion erfolgte wie unter 2.2.14 beschrieben. Die Zellen wurden jeweils mit pCMV GLUT4myc oder einem „leeren“ pCMV Kontrollvektor transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 2 h im DMEM mit 1% BSA inkubiert und anschliessend mit Transportpuffer (134 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 800 nM MgSO₄, 20 mM HEPES) gewaschen. Es folgte eine Inkubation mit beziehungsweise ohne 1 µM Insulin im Transportpuffer bei 37°C für 30 min. Nach Absaugen des Überstands wurden die Zellen für 30 min mit 2% Paraformaldehyd bei Raumtemperatur fixiert, vier Mal mit PBS gewaschen und 1 h in PBS mit 5% Magermilchpulver blockiert. Anschliessend wurden die fixierten Zellen mit dem Anti-Myc Antikörper (1:200 in PBS, 5% Magermilchpulver) für 2 h inkubiert, vier Mal mit PBS 5% Magermilchpulver gewaschen und mit einem Anti-Maus-¹²⁵J sekundären Antikörper für 1 h inkubiert (0,1 µCi/Well). Nach Waschschritten mit PBS 5% Magermilchpulver, PBS und PBS mit 0,05% Tween 20 wurden die Zellen 1 h mit 1% SDS solubilisiert. Die Radioaktivität der Proben wurde in einem γ-Counter (1282 Compu-gamma CS, Wallac Oy, Turku, Finnland) bestimmt.

2.2.26 Auswertung der Daten und Statistik

Die statistischen Berechnungen der Signifikanzen wurden mit ANOVA, Fisher's PLSD Test erhoben. Zur Datenanalyse dienten die Computerprogramme StatView (SAS Institute, Cary, NC, USA) und Prism (GraphPad, San Diego, CA). Die Daten wurden als Mittelwerte ± SEM (Standardabweichung der Mittelwerte) von mindestens drei unabhängigen Experimenten dargestellt, die Signifikanzgrenze wurde mit p<0,05 festgelegt.

3 ERGEBNISSE

3.1 *In Vitro* Phosphorylierung

Bereits vor Beginn dieser Arbeit konnte in unserer Arbeitsgruppe eine *in vitro* Phosphorylierung von einem GST/IRS-1 Fusionsprotein durch die PKC ζ gezeigt werden. Das verwendete Fusionsprotein umfasst die Aminosäuren 449 bis 664 des IRS-1 der Ratte und enthält somit die für die Bindung der SH2-Proteine essentielle IRS-1 Domäne (Abb. 6). Nach tryptischer Spaltung des unter Zugabe von [γ - 32 P]ATP *in vitro* phosphorylierten Fusionsproteins wurden die resultierenden Phosphopeptide über eine Anionenaustauschersäule aufgetrennt.

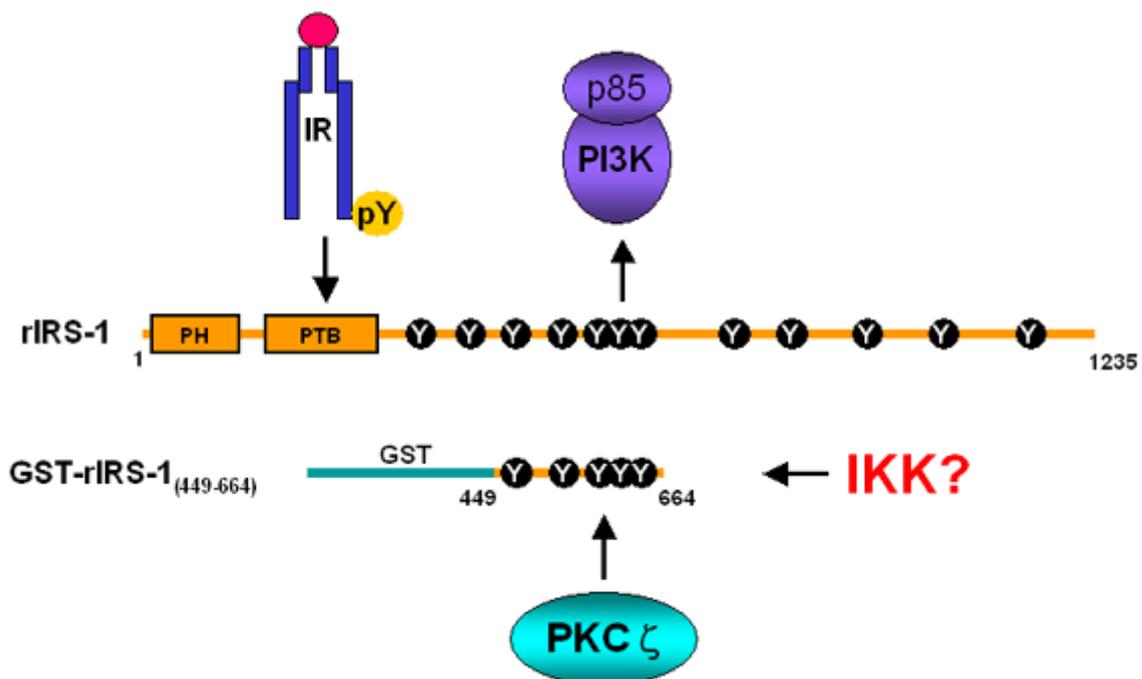


Abb. 6 Serinphosphorylierung von IRS-1

Schematische Darstellung des verwendeten IRS-1 Fusionsproteins

Die Radioaktivität der gesammelten Fraktionen wurde durch Messung der Cerenkov-Strahlung bestimmt (Abb. 5). Nach weiterer Aufreinigung mittels Umkehrphasen-HPLC erfolgte eine massenspektrometrische Auswertung der Proben. Dabei konnte eine Phosphorylierung des IRS-1 Fusionsproteins an Serin 570 (Peak 4) und Serin

498 (Peak 5 und 6) gezeigt werden, wobei das Serin 570 mit ca. 20% des Gesamt-Phosphateinbaus eine Haupt-Phosphorylierungsstelle darstellt. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die *in vitro* Phosphorylierung des Fusionsproteins mittels PKC ζ seine Fähigkeit zur Bindung der PI3-Kinase deutlich mindert. Durch Punktmutation von S570 zu Alanin konnte dieser Effekt deutlich verringert, aber nicht vollständig aufgehoben werden (147).

3.1.1 Generierung und Untersuchung von IRS-1 Mutanten

Ausgehend von diesen Daten wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit zunächst die Mutationsanalyse des IRS-1 fortgeführt, um die Frage nach weiteren Phosphorylierungsstellen innerhalb des IRS-1 Fusionsproteins zu klären. So enthielt beispielsweise das im Peak 3 detektierte tryptische IRS-1 Peptid TPSQSSVVSIEEYTEMMPAAYPPGGGSGGR ebenfalls ca. 20% der eingebauten Radioaktivität, was als Hinweis auf eine zweite Hauptphosphorylierungsstelle gelten kann. Da in diesem Fall mittels Massenspektrometrie keine Zuordnung der Phosphorylierungsstelle gelang, wurden anhand einer Konsensussequenz der PKC ζ das Threonin 534 und Serin 560 als aussichtsreiche Kandidaten bestimmt und zu Alanin mutiert. Ebenfalls zu Alanin mutiert wurde das durch die Massenspektrometrie als Phosphorylierungsstelle identifizierte Serin 498. Die aufgereinigten mutierten Proteine wurden nach einer *in vitro* Phosphorylierung mittels Autoradiographie und Anionenaustausch-Chromatographie analysiert. Es konnte jedoch keine Abnahme der eingebauten Radioaktivität festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

3.1.2 PKC ζ phosphoryliert IRS-1 Fusionsprotein an Ser570 – Validierung spezifischer Antiseren

Desweiteren wurden mehrere Antiseren gegen die Phosphoform von Serin 570 getestet. Hierzu wurde das IRS-1 Fusionsprotein mit der rekombinanten PKC ζ und einer PKC-Präparation aus dem Gehirn der Ratte, die hauptsächlich die konventionellen PKC-Isoformen α , β und γ enthält, *in vitro* phosphoryliert (Abb. 7).

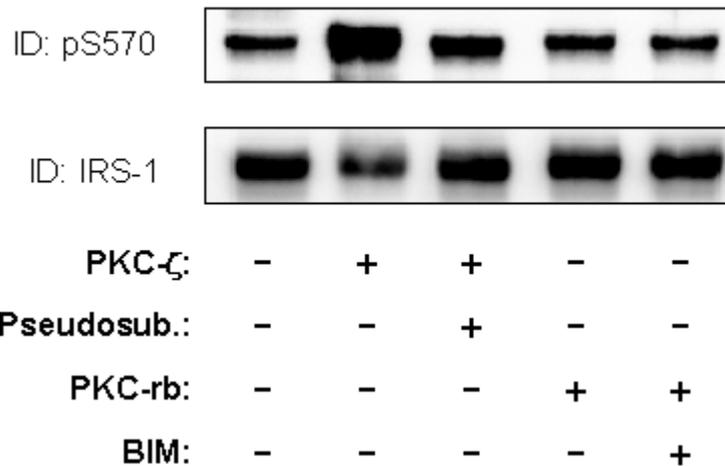


Abb. 7 Spezifische Phosphorylierung des IRS-1 Fusionsproteins durch die PKC ζ

Abb. 1 Jeweils 1 μ g des IRS-1 Fusionsproteins wurde *in vitro* für 30 min bei 30°C mit rekombinanter PKC ζ bzw. einer PKC-Aufreinigung aus Rattengehirn wie in 2.2.18.1 beschrieben phosphoryliert. Als Inhibitor der PKC wurde ein Pseudosubstratpeptid in einer Konzentration von 400 μ M eingesetzt, zur Inhibierung der PKC-Isoformen α , β und γ diente 1 mM BIM (Bisindolylmaleimid I). Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proben erfolgte eine Immunodetektion mit einem spezifischen Antiserum gegen die phosphorylierte Form des IRS-1 Serins 570 sowie einem IRS-1 Antiserum. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment.

Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proben mittels SDS-PAGE und Western Blot wurden die Membranen mit den verfügbaren Seren inkubiert. Nach erfolgter Chemilumineszenzdetektion konnte ein spezifisches Antiserum gegen das phosphorylierte Serin 570 identifiziert werden. Dabei gelang der Nachweis, dass das Serin 570 spezifisch durch die PKC ζ , jedoch nicht durch die Isoformen α , β und γ phosphoryliert wird (siehe Abb. 7).

3.1.3 IKK-Komplex phosphoryliert IRS-1 Fusionsprotein *in vitro*

Um die Rolle der inflammatorischen Serinkinase IKK bei der Entstehung von Insulinresistenz zu überprüfen, wurden *in vitro* Phosphorylierungsassays mit dem IRS-1 Fusionsprotein geplant. Für den Kinase-Assay wurde das IKK-Enzym an seiner nicht-katalytischen γ -Untereinheit aus Lysaten humaner Skelettmuskelzellen sowie Kardiomyoblasten der Ratte nativ präzipitiert und im Phosphorylierungspuffer unter Zugabe von [γ - 32 P]ATP mit dem IRS-1 Fusionsprotein inkubiert. Als Positivkontrolle

diente das rekombinante I κ B-Protein, ein natürliches Substrat der IKK. Es konnte qualitativ eine Phosphorylierung von beiden Substratproteinen durch den IKK-Komplex beobachtet werden, wobei I κ B stärker phosphoryliert wurde als das IRS-1 Fusionsprotein (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der geringen Menge der präzipitierbaren Kinase erwies sich diese Methode jedoch für weitere, hohe Kinaseaktivität voraussetzende *in vitro* Experimente zur Phosphorylierungsstellen-Suche als ungeeignet.

Da die Kinase-Assays mit präzipitiertem Enzym erste Hinweise auf eine direkte Interaktion und Phosphorylierung von IRS-1 durch die IKK ergaben, wurde nach weiteren Enzymquellen gesucht. Seitens der Firma Aventis wurde für diese Arbeit eine IKK-Aufreinigung aus HeLa-Zellen bereitgestellt. In der IKK-Präparation ist zur Aktivierung der IKK eine rekombinante trunkierte Form der MAPKK-Kinase (MEKK1) enthalten, weshalb eine mögliche Einwirkung der MEKK1 auf das Substrat bei folgenden Experimenten berücksichtigt werden musste.

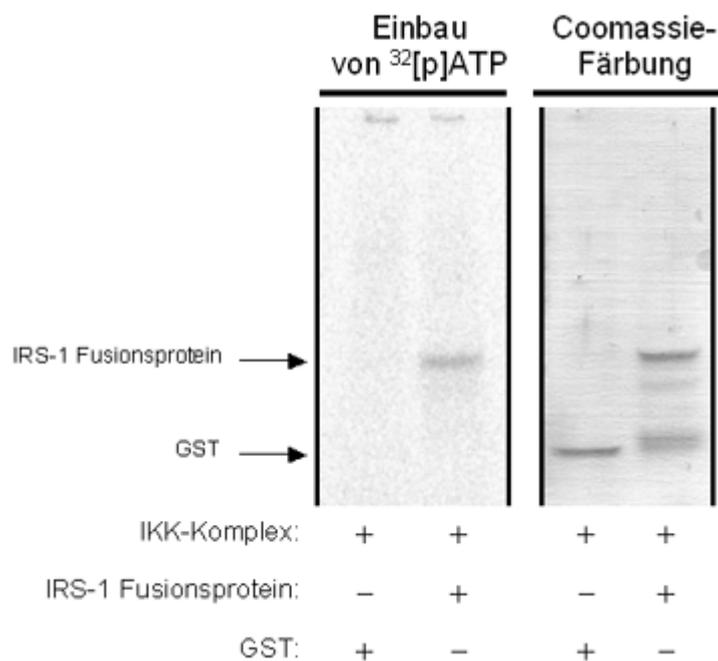


Abb. 8 *In vitro* Phosphorylierung des IRS-1 Fusionsproteins mit IKK-Komplex

Jeweils 1 μ g des GST/IRS-1 Fusionsproteins bzw. reines GST wurde für 1 h bei 30°C mit 8 μ l der IKK-Aufreinigung aus HeLa-Zellen wie in 2.2.18.2 beschrieben phosphoryliert. Nach Auftrennung der Proben mittels SDS-PAGE erfolgte Visualisierung der Proteine mittels einer Coomassie-Färbung sowie eine autoradiografische Detektion der inkorporierten Radioaktivität.

Mit der IKK-Präparation wurde basierend auf der für die PKC ζ verwendeten Methode eine *in vitro* Phosphorylierung des IRS-1 Fusionsproteins durchgeführt. Dabei konnte eine deutliche spezifische Phosphorylierung des IRS-1 Fragments, nicht aber des GST-Anteils des Fusionsproteins belegt werden (Abb. 8).

Im Elutionsprofil der folgenden HPLC konnten wiederholt drei distinkte Peaks mit hohem Radioaktivität-Einbau sowie ein weiterer kleinerer Peak identifiziert werden (Abb. 9). Die Peaks entsprachen den für eine Phosphorylierung des IRS-1 Fusionsproteins mittels PKC ζ zuvor identifizierten Peaks 1, 3, 5 und 6. Peaks 2 und 4, die bei Phosphorylierung mit der PKC ζ deutlich erkennbar waren (s. dazu Abb. 5), fehlten in diesem Profil.

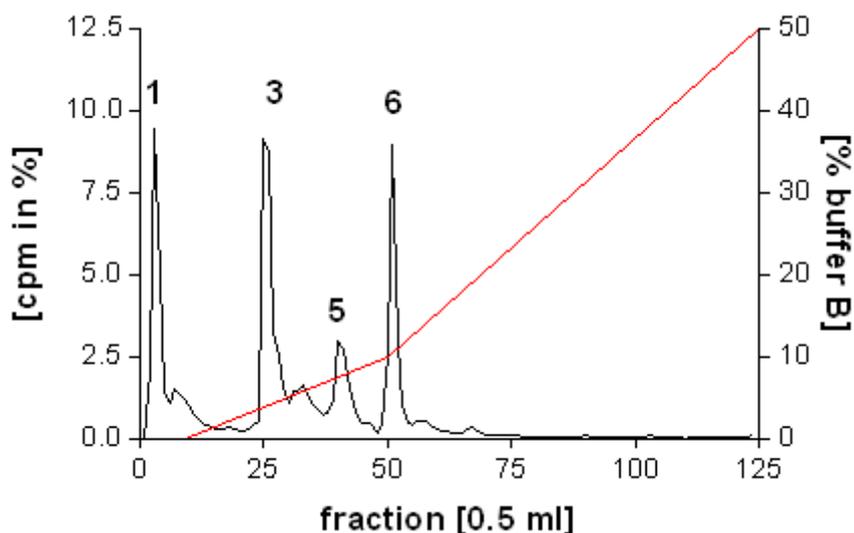


Abb. 9 HPLC-Profil nach Phosphorylierung mittels IKK-Komplex

51,2 μg (1 nmol) des IRS-1 Fusionsproteins wurden mit insgesamt 32 μl der IKK-Aufreinigung aus HeLa-Zellen wie in 2.2.18.2 beschrieben unter Zugabe von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ *in vitro* phosphoryliert. Nach einer proteolytischen Spaltung wurden die tryptischen Peptide mittels HPLC über eine Anionenaustauschersäule eluiert (s. dazu 2.2.17). Die Radioaktivität der gesammelten Fraktionen wurde mittels der Messung von Cerenkov-Strahlung bestimmt.

3.1.4 MEKK1 phosphoryliert IRS-1 Fusionsprotein *in vitro*

Um den möglichen Einfluss der in IKK-Präparation enthaltenen trunkierten MEKK1 auf das Fusionsprotein zu untersuchen, wurden auch hier *in vitro* Phosphorylierungsassays durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die rekombinante

MEKK1 in der Lage ist, das rekombinante IκB Protein und das IRS-1 Fusionsprotein, nicht aber den GST-Anteil zu phosphorylieren (Abb. 10).

Die folgende Analyse der tryptischen Peptide mittels HPLC ergab ein Elutionprofil, das sich stellenweise mit dem Profil der IKK deckt (Abb. 11). So wurden auch hier die Peaks 1 und 3 detektiert, es konnte ebenfalls ein kleinerer Peak 6 gezeigt werden. Aufgrund dieser Überlagerung der Elutionsprofile von IKK-Komplex und MEKK1 an Peak 1 und 3 kann nicht bestimmt werden, ob IKK einen Anteil an dem hohen Phosphateinbau in diesen Peaks hat.

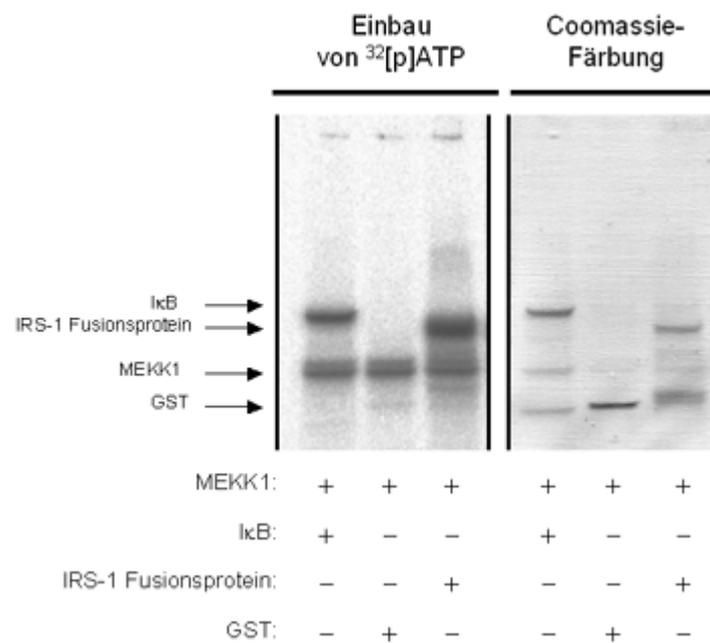


Abb. 10 *In vitro* Phosphorylierung des IRS-1 Fusionsproteins mit MEKK1

Jeweils 1 µg des rekombinanten IκB, des GST/IRS-1 Fusionsproteins bzw. reines GST wurde für 1 h bei 30°C mit 8 µl der rekombinanten MEKK1 wie in 2.2.18.3 beschrieben phosphoryliert. Nach Auftrennung der Proben mittels SDS-PAGE erfolgte Visualisierung der Proteine mittels einer Coomassie-Färbung sowie autoradiografische Detektion der inkorporierten Radioaktivität.

Die hohe Phosphorylierung von Peak 6 durch die IKK-Präparation kann hingegen vermutlich nicht ausschliesslich der MEKK1 zugeschrieben werden. Hier ist ein deutlicher Anteil der IKK an der Gesamtphosphorylierung zu erwarten. Ebenso scheint die Phosphorylierung an Peak 5 grösstenteils der IKK zu entspringen. Die MEKK1 hingegen phosphoryliert bevorzugt die im Peak 1 und 3 eluierenden Peptide.

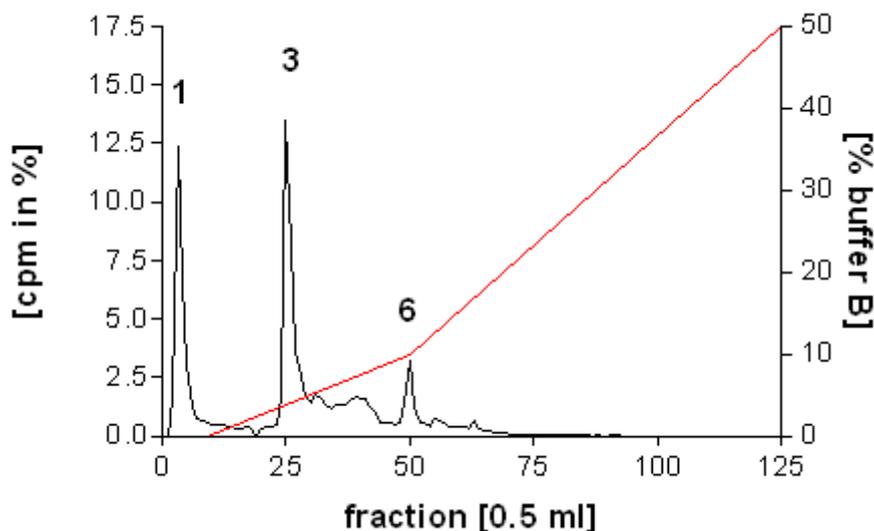


Abb. 11 HPLC-Profil nach Phosphorylierung mittels MEKK1

51,2 µg (1 nmol) des IRS-1 Fusionsproteins wurden mit insgesamt 32 µl der rekombinanten MEKK1 wie in 2.2.18.3 beschrieben unter Zugabe von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ *in vitro* phosphoryliert. Nach einer proteolytischen Spaltung wurden die tryptischen Peptide mittels HPLC über eine Anionenaustauschersäule eluiert (s. dazu 2.2.17). Die Radioaktivität der gesammelten Fraktionen wurde mittels der Messung von Cerenkov-Strahlung bestimmt.

3.1.5 IKKbeta phosphoryliert IRS-1 Fusionsprotein *in vitro*

Um eindeutige Ergebnisse zu erhalten, wurden die Untersuchungen mit einer inzwischen käuflich erhältlichen rekombinanten aktiven IKK β -Untereinheit wiederholt. Es konnte eine klare Phosphorylierung des rekombinanten I κ B Proteins und des IRS-1 Fusionsproteins durch die IKK β demonstriert werden. Auch in diesem Fall wurde der GST-Anteil nicht phosphoryliert.

Die folgende Analyse mittels IE-HPLC ergab ein Elutionsprofil, das erwartungsgemäss dem Profil nach einer Phosphorylierung mit der IKK-Präparation abzüglich der Peaks des MEKK1-Anteiles entsprach. So verursachte die rekombinante IKK β eine deutliche Phosphorylierung an Peak 5 und 6, sowie eine etwas geringere Phosphorylierung in Höhe der Peaks 1 und 3.

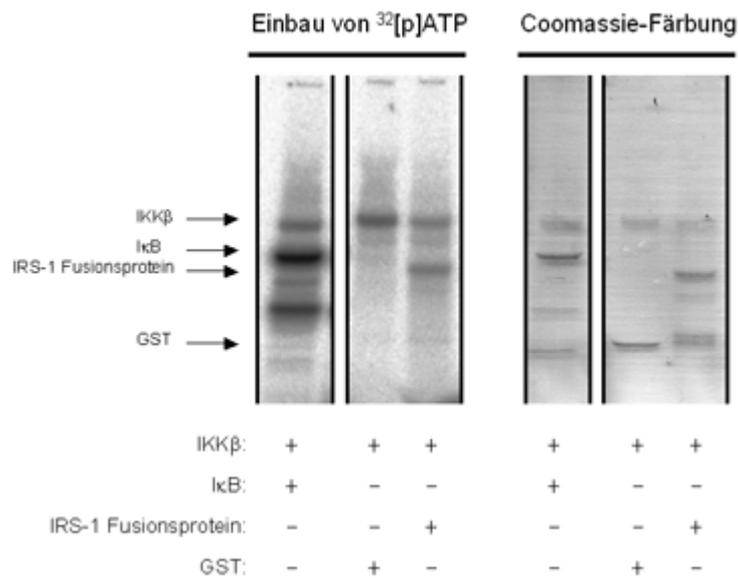


Abb. 12 *In vitro* Phosphorylierung des IRS-1 Fusionsproteins mit IKKβ

Jeweils 1 µg des rekombinanten IκB, des GST/IRS-1 Fusionsproteins bzw. reines GST wurde für 1 h bei 30°C mit 0,8 µg der rekombinanten aktiven IKKβ wie in 2.2.18.4 beschrieben phosphoryliert. Nach Auftrennung der Proben mittels SDS-PAGE erfolgte Visualisierung der Proteine mittels einer Coomassie-Färbung sowie autoradiografische Detektion der inkorporierten Radioaktivität.

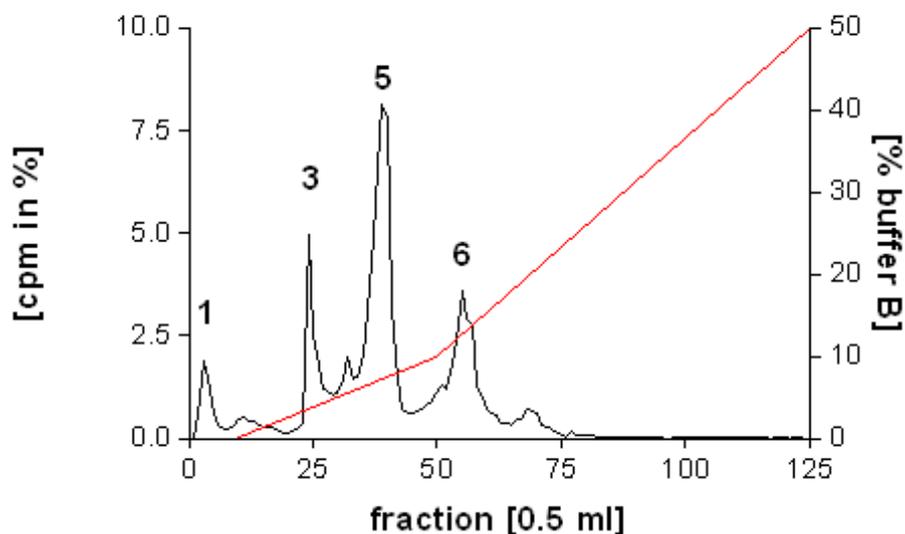


Abb. 13 HPLC-Profil nach Phosphorylierung mittels IKKβ

51,2 µg (1 nmol) des IRS-1 Fusionsproteins wurden mit insgesamt 3,2 µg der rekombinanten aktiven IKKβ wie in 2.2.18.4 beschrieben unter Zugabe von [γ-32P]-ATP *in vitro* phosphoryliert. Nach einer proteolytischen Spaltung wurden die tryptischen Peptide mittels HPLC über eine Anionenaustauschersäule eluiert (s. dazu 2.2.17). Die Radioaktivität der gesammelten Fraktionen wurde mittels der Messung von Cerenkov-Strahlung bestimmt.

Tabelle 1 Zuordnung der bekannten tryptischen Peptide des IRS-1 Fusionsproteins

Die Zuordnung der HPLC-Peaks und der in den entsprechenden Fraktionen identifizierter Peptide basiert auf der Analyse der IRS-1 Phosphorylierung durch die PKC ζ (Inaugural-Dissertation „Molekulare Mechanismen der Insulinresistenz: Serinphosphorylierung von IRS-1“ M.R. Sommerfeld, 2004). Gelb markiert wurden die Peaks, die im HPLC-Profil nach einer Phosphorylierung des Fusionsproteins mit IKK β ebenfalls vorkommen. Das Peptid KGNGDYMPMSPK wurde bisher als einziges keinem Peak des Elutionsprofils zugeordnet. Da es eine potentielle Phosphorylierungsstelle enthält, wurde es dennoch in die Tabelle aufgenommen. Potentielle Phosphorylierungsstellen der IKK β wurden durch Unterstreichung hervorgehoben.

Peptid	Enthaltene IRS - 1 Sequenz	Peak	Vorkommen im IKK β Profil?
A	PPARGE E ELSNYICMGGK	2+4	nein
B	GASTLTAPNGHYILSR	2	nein
C	YIPGAT <u>M</u> GT <u>S</u> PAL <u>T</u> GDEAAGAADLDNR	5+6	ja
D	<u>T</u> HSAG <u>T</u> SPT <u>I</u> SHQK	1	ja
E	<u>I</u> PSQSSVVSIEEY <u>T</u> EMMPAAAYPPGGG <u>S</u> GGR	3	ja
F	LPGYRHS A FPVTHSYPEEGLEMHHLER	4	nein
G	<u>S</u> V <u>S</u> APQQIINPIR	1	ja
H	VDPNGYMMMSPSAAAS	2	nein
?	KGNGDYMPM <u>S</u> PK	?	?

Da bei früherer Analyse der Phosphorylierung des Fusionsproteins durch PKC ζ den einzelnen Peaks des Elutionsprofils bestimmte tryptische Peptide zugeordnet werden konnten (Tabelle 1), kann vermutet werden, welche Peptide durch die IKK phosphoryliert werden. Anhand der damaligen massenspektrometrischen Daten ist bekannt, dass im Peak 5 und 6 vor allem das Peptid YIPGATMGTS~~P~~ALTGDEAAGAADLDNR eluiert, während Peak 1 in erster Linie das Peptid THSAGTSPTISHQK enthält. Im Peak 3 wurde die Sequenz IPSQSSVVSIEEYTEMMPAAAYPPGGGSGGR gefunden. Die Peptide GEEELSNYICMGGKGASTLTAPNGHYILSR, VDPNGYMMMSPSAAAS und GGHRPDSSNLHTDDGYMPMSPGVAPVPSNRKNG (Peak 2) sowie LPGYRHS~~A~~FPVTHSYPEEGLE-MHHLERR (Peak 4) dagegen scheinen weder durch die IKK, noch durch die MEKK1 phosphoryliert zu werden.

3.1.6 Externe massenspektrometrische Analyse der Phosphorylierungsstellen

Aufgrund der hohen Anzahl an Serinen und Threoninen in den vermuteten Zielsequenzen sowie unter Berücksichtigung der Tatsache, dass noch weitere bisher keinem Peak zugeordnete IRS-1 Peptide ebenfalls als Phosphat-Träger in Frage kommen, wurde in diesem Fall von einer Mutationsanalyse abgesehen. Stattdessen wurde im Rahmen einer Kooperation mit der Firma Aventis eine massenspektrometrische Untersuchung der phosphorylierten Proben vorgenommen. Hierfür wurden nicht-radioaktive *in vitro* Phosphorylierungen des IRS-1 Fusionsproteins mit rekombinanter IKK β wie in 2.2.18.4 beschrieben durchgeführt, wobei das Verhältnis von Kinase und Substrat zwischen 1:1 und 1:16 variiert wurde. Die massenspektrometrische Untersuchung dieses Probenmaterials wurde durch Herrn Dr. Jochen Kruip und Herrn Dr. Carsten Corvey geleitet.

Eine MALDI-MS Analyse Phosphatase-behandelter und unbehandelter Proben (Abb. 14) ergab eine 80 Da Verschiebung des Peptides mit dem Molekulargewicht 1531,6 Da (THSAGTSPTISHQK; Peptid D aus dem Peak1 der HPLC). Das weist auf eine Abspaltung von Phosphat hin und bestätigt die HPLC Befunde, wonach in diesem Peptid eine Phosphorylierung zu erwarten ist.

Zusätzlich wurde im MALDI-Spektrum der *in vitro* phosphorylierten Probe ein Peak detektiert, welcher im Vergleich-Spektrum der nicht-phosphorylierten Probe fehlte (Abb. 15). Dieser Peak bei 3018,31 Da entspricht rechnerisch dem Phosphopeptid YIPGATMGTSALTGDEAAGAADLDNRFR (3018,3663 Da; Peptid C aus dem HPLC-Peak 5+6). Auch hier bestätigt die massenspektrometrische Analyse die aus den HPLC-Profilen abgeleiteten Vermutungen über eine Phosphorylierung innerhalb dieses Peptides.

Trotz darauffolgender weitergehender MS/MS Analysen konnte die genaue Lage der Phosphorylierungsstellen nicht zweifelsfrei identifiziert werden.



Abb. 14 MALDI-Analyse: Vergleich *in vitro* phosphorylierter und dephosphorylierter tryptischer Peptide des IRS-1 Fusionsproteins

Die Analyse wurde von Dr. Carsten Corvey geleitet. Oben: Spektrum der *in vitro* phosphorylierten Probe. Unten: Spektrum der gleichen Probe nach Behandlung mit Phosphatase. Das Signal bei 1531,5799 Da (phosphorylierte Probe) und 1451,7289 Da (dephosphorylierte Probe) wurde grün gekennzeichnet.

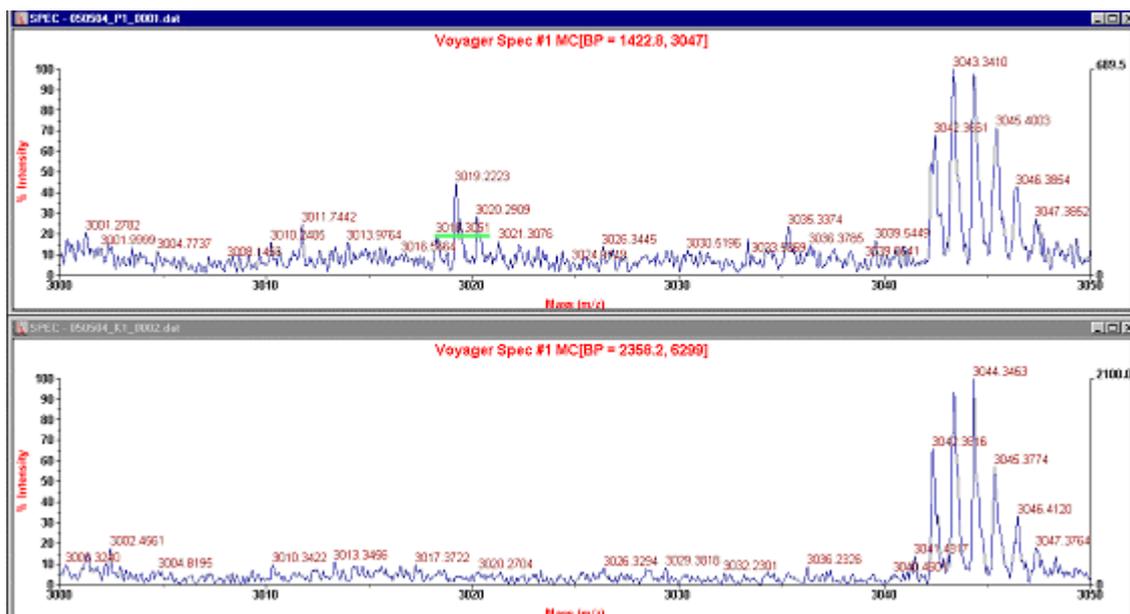


Abb. 15 MALDI-Analyse: Vergleich *in vitro* phosphorylierter und unphosphorylierter tryptischer Peptide des IRS-1 Fusionsproteins

Die Analyse wurde von Dr. Jochen Kruij geleitet. Oben: Spektrum der *in vitro* phosphorylierten Probe. Unten: Spektrum einer nicht phosphorylierten Kontrolle. Das nur in der phosphorylierten Probe vorkommende Signal bei 3019,2229 Da wurde grün gekennzeichnet.

3.2 Einfluss aktivierter Serinkinasen auf die Insulinsignaltransduktion im Zellmodell

Erhöhte Aktivität von Serinkinasen wurde wiederholt mit gestörter Insulinsignal-Weiterleitung in Verbindung gebracht. Insbesondere im Tiermodell und in Fettzellen konnte ein Zusammenhang zwischen gesteigerter Aktivität von IKK und JNK und einer Hemmung des Insulinsignals gezeigt werden (16;58;70;72;75). Es ist bislang jedoch ungeklärt, inwiefern dieser Mechanismus auch in den für die Insulinwirkung hochrelevanten Muskelzellen eine Rolle spielt.

Um zu prüfen, ob die Aktivierung von Serinkinasen auch in Muskelzellen Auswirkungen auf die Insulinsignalkaskade hat, wurde die Zelllinie H9c2 als Modell ausgewählt. Es handelt sich hierbei um embryonale Myoblasten aus dem Rattenherz. Der Klon H9c2-E2 exprimiert stabil den humanen Insulinrezeptor, was eine deutliche Ansprechbarkeit dieser Zellen auf Insulin zu Folge hat und eine genaue Untersuchung der Insulinrezeptor-vermittelten Signalkaskade ermöglicht.

Als Kandidaten-Kinasen wurden IKK und JNK ausgewählt, da sie im Gegensatz zu Kinasen wie PKC ζ und GSK3 selbst kein integraler Bestandteil der Insulinsignalkaskade sind und somit möglicherweise als Auslöser einer pathologischen Signalhemmung in Frage kommen. Konstitutive Expression dieser Kinasen in H9c2-E2 Zellen wurde im Vorexperiment bestätigt (Daten nicht gezeigt).

3.2.1 Aktivierung der IKK und JNK

Um den Einfluss von IKK und JNK auf die Weiterleitung des Insulinsignals untersuchen zu können, wurde zunächst nach geeigneten Möglichkeiten zur selektiven Aktivierung dieser Kinasen gesucht. Als Auslöser wurden TNF α und Anisomycin getestet (Abb. 17). Aktivierte IKK phosphoryliert den Inhibitor von NF κ B (I κ B), was zu seiner Ubiquitinierung und proteosomaler Degradation führt. Dadurch wird der nukleäre Faktor κ B freigesetzt.

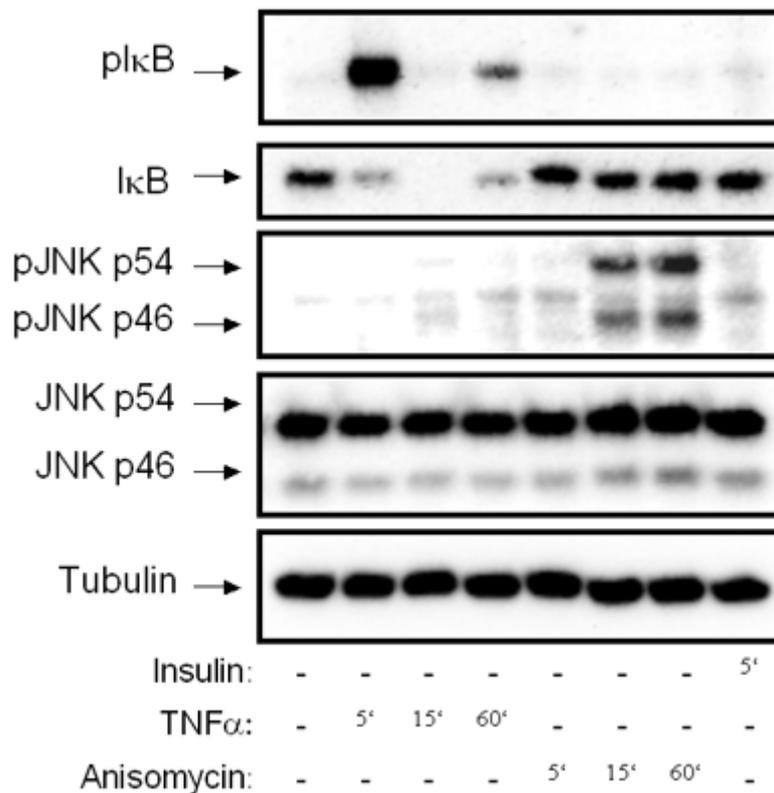


Abb. 16 Aktivierung der IKK und JNK in Kardiomyoblasten

Subkonfluente Monolayer der H9c2-E2 Zelllinie wurden mit PBS gewaschen und für 1 h in DMEM inkubiert. Während dieser serumfreien Inkubation wurden die Zellen für 5, 15 und 60 min mit jeweils 2,5 nM TNF α , 1 ng/ml Anisomycin oder 100 nM Insulin behandelt. Jeweils 5 μ g der Zelllysate wurden mittels SDS-Page aufgetrennt und mit Hilfe spezifischer Antikörper immunodetektiert. Dargestellt ist das Ergebnis eines repräsentativen Experimentes.

Eine Behandlung mit 2,5 nM TNF α führte bereits nach 5 Minuten zu einer prominenten Phosphorylierung des natürlichen Substrats der IKK, I κ B. Nach 15 Minuten konnte ein vollständiger Abbau des I κ B beobachtet werden, was für eine maximale Aktivierung der IKK spricht. Umgekehrt wurde die JNK nicht durch TNF α aktiviert, wie ihre fehlende Phosphorylierung anzeigt. Eine Behandlung mit 1 ng/ml Anisomycin führte dagegen zu einem dramatischen Anstieg der JNK Phosphorylierung nach 15 und 60 Minuten, was als Anzeichen gesteigerter Aktivität gedeutet wird. Dabei blieb sowohl die Phosphorylierung als auch die Menge des I κ B trotz Anisomycin-Behandlung unverändert, was für eine hohe Selektivität des Anisomycins spricht. Weder TNF α noch Anisomycin führten zu einer Veränderung der JNK-Proteinmenge. Ein 5-minütiger Stimulus mit 100 nM Insulin führte zu keinerlei Änderungen in der Phosphorylierung und Proteinmenge von I κ B und JNK.

3.2.2 Einfluss aktivierter IKK und JNK auf die insulinvermittelte Tyrosinphosphorylierung von IRS-1

Nach einer Behandlung mit $\text{TNF}\alpha$ für 15 bzw. 60 Minuten wurden die Myoblasten einem 5-minütigen Insulinstimulus unterzogen. Das zelluläre IRS-1 wurde anschließend aus den Lysaten präzipitiert und auf eine Veränderung der insulinvermittelten Tyrosinphosphorylierung untersucht. Zur Quantifizierung der Tyrosinphosphorylierung diente die parallel detektierte Menge des präzipitierten IRS-1. Sowohl die basale als auch insulinstimulierte Tyrosinphosphorylierung des IRS-1 blieb nach der $\text{TNF}\alpha$ Behandlung weitgehend unverändert (Abb. 17). Es wurde kein signifikanter Unterschied zu der unbehandelten Kontrolle festgestellt.

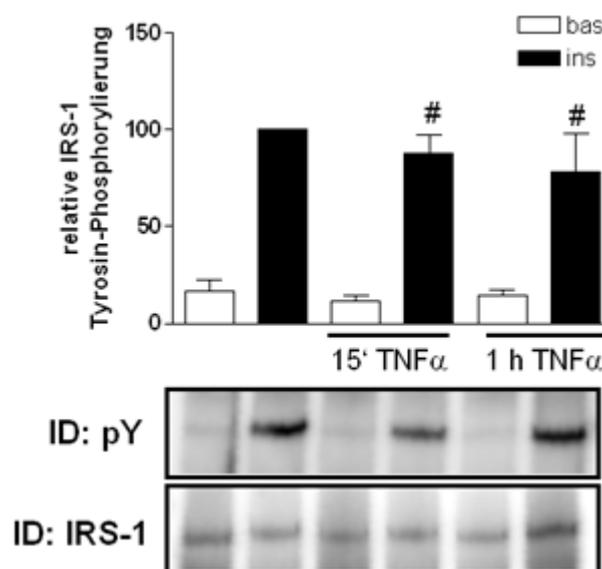


Abb. 17 Auswirkungen aktivierter IKK auf die Tyrosinphosphorylierung von IRS-1

Subkonfluente Monolayer der H9c2-E2 Zelllinie wurden mit PBS gewaschen und für 1 h in DMEM inkubiert. Während dieser serumfreien Inkubation wurden die Zellen für 15 beziehungsweise 60 min mit 2,5 nM $\text{TNF}\alpha$ behandelt. Die zusätzliche Insulinstimulation wurde 5 min vor Ende des Inkubationszeitraums mit 100 nM Insulin durchgeführt. Nach einer Solubilisierung mit RIPA Puffer wurden jeweils 400 μg der Zellysate für eine Immunopräzipitation mit Anti-IRS-1 Antikörper über Nacht bei 4°C eingesetzt. Die Immunokomplexe wurden für 2 h bei Raumtemperatur mit Protein A-Trisacryl inkubiert. Die Präzipitate wurden mit PBS gewaschen, mit Laemmli-Probenpuffer denaturiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Immunodetektion mit Anti-Phosphotyrosin Antikörper (PY99) und Anti-IRS-1 Antikörper folgte die Quantifizierung der IRS-1 Tyrosinphosphorylierung mit der Lumilmager Software. Dabei wurde der insulinstimulierte Kontrollwert gleich 100% gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus 4 unabhängigen Experimenten sowie ein repräsentativer Immunoblot. bas = basal; ins = insulinstimuliert; # = kein signifikanter Unterschied.

Eine Behandlung der Zellen mit Anisomycin führte nach 15 Minuten zu keiner Änderung der IRS-1 Tyrosinphosphorylierung (Abb. 18). Nach einstündiger Anisomycin-Behandlung konnte ebenfalls keine deutliche Abnahme der insulinvermittelten Tyrosinphosphorylierung von IRS-1 beobachtet werden. Im Verlauf von 3 Experimenten konnte bestätigt werden, dass eine 15-minütige und einstündige Aktivierung der JNK die basale und insulinvermittelte Tyrosinphosphorylierung des IRS-1 nicht beeinflusst.

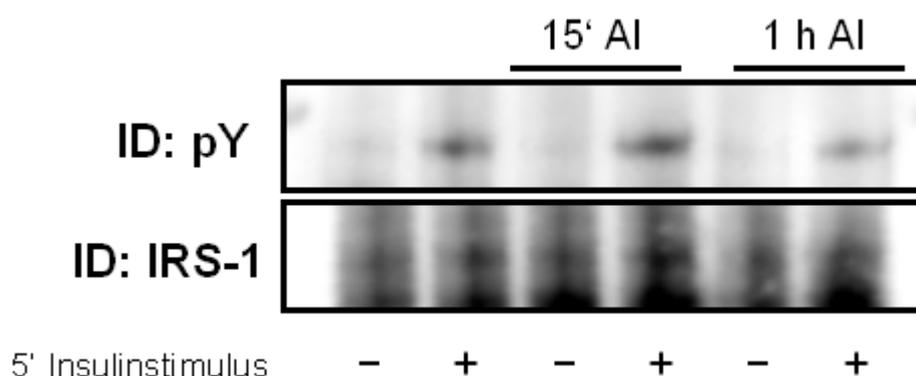


Abb. 18 Auswirkungen aktivierter JNK auf die Tyrosinphosphorylierung von IRS-1

Stimulation der Kardiomyoblasten und Präzipitation von IRS-1 wurden wie in Abb. 17 beschrieben durchgeführt, wobei statt TNF α 1 ng/ml Anisomycin zur Aktivierung der JNK eingesetzt wurde. Die Präzipitate wurden mit PBS gewaschen, mit Laemmli-Probenpuffer denaturiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Immunoblot mit Anti-Phosphotyrosin Antikörper (PY99) und Anti-IRS-1 Antikörper folgte die Detektion der IRS-1 Tyrosinphosphorylierung mittels Lumilmager. AI = Anisomycin. Das Experiment wurde drei Mal reproduziert.

3.2.3 Einfluss aktivierter IKK und JNK auf die Interaktion von IRS-1 und PI3-K

Die Untersuchung der Tyrosinphosphorylierung von IRS-1 erlaubt keine definitive Aussage über seine Aktivität. Eine gestörte Signalweiterleitung ist auch trotz unverminderter Tyrosinphosphorylierung vorstellbar, wenn beispielsweise eine akute Serinphosphorylierung des IRS-1 die Bindung der PI3 Kinase beeinträchtigt. Aus diesem Anlass wurden Kopräzipitationsanalysen des IRS-1 durchgeführt. Die im IRS-1 Präzipitat gebundene Menge der PI3-K Unterheit p85 α sollte dabei zur Bestimmung der Funktionalität von IRS-1 nach einer Aktivierung der IKK dienen.

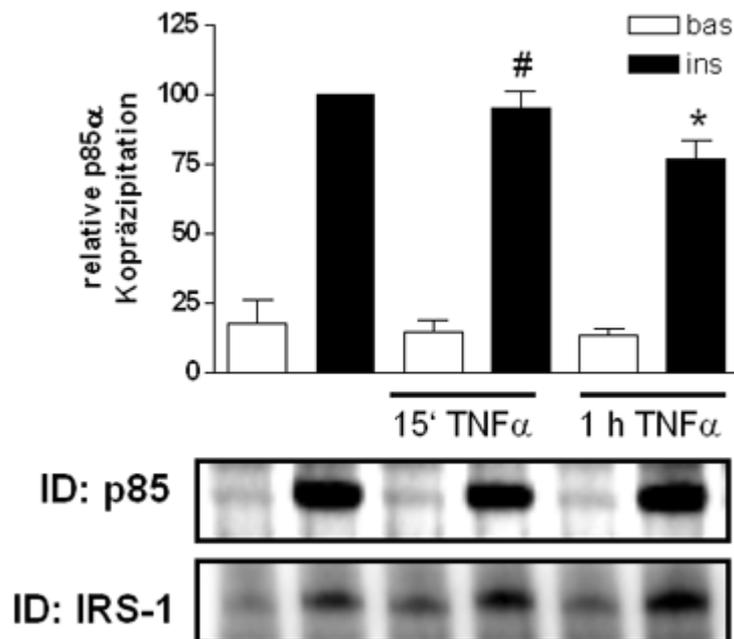


Abb. 19 Einfluss aktivierter IKK auf die IRS-1/PI3-K Interaktion

Stimulation der Kardiomyoblasten und Präzipitation von IRS-1 wurden wie in Abb. 17 beschrieben durchgeführt. Nach Immunodetektion mit Anti-p85 α Antikörper und Anti-IRS-1 Antikörper folgte die Auswertung mit dem Lumilmager. Interaktion zwischen IRS-1 und PI3-Kinase wurde anhand der mit IRS-1 kopräzipitierten Menge der p85 α Untereinheit bestimmt. Dabei wurde der insulinstimulierte Kontrollwert gleich 100% gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus 5 unabhängigen Experimenten sowie ein repräsentativer Immunoblot. bas = basal; ins = insulinstimuliert; * = $p < 0,05$; # = kein signifikanter Unterschied.

Wie in Abb. 19 gezeigt, hat eine 15-minütige Aktivierung der IKK keinen Einfluss auf die Interaktion von IRS-1 und PI3-K. Nach einer einstündigen TNF α Behandlung zeichnet sich eine Abnahme der p85 α Bindung ab. Diese Reduktion ist zwar signifikant, aber dennoch geringfügig, da die nach Insulinstimulus kopräzipitierte p85 α Menge lediglich um 20% abnimmt. Ein Hauptanteil des Insulinsignals kann offenbar dennoch an die PI3 Kinase weitergeleitet werden.

Ein entsprechendes Experiment nach Aktivierung der JNK mit Anisomycin zeigte ähnliche Auswirkungen auf die Bindung der PI3-Kinase (Abb. 20). Im Verlauf mehrerer Experimente konnte bestätigt werden, dass eine 15-minütige Aktivierung der JNK

keinen Einfluss auf die Bindung zwischen IRS-1 und PI3-Kinase hat, während eine einstündige JNK-Aktivierung tendenziell zu einer geringfügigen Abnahme der IRS-1/PI3-Kinase Interaktion führt.

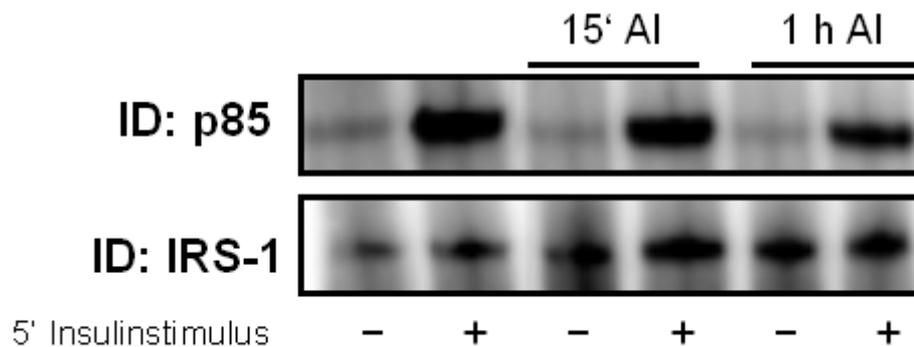


Abb. 20 Einfluss aktivierter JNK auf die IRS-1/PI3-K Interaktion

Stimulation der Kardiomyoblasten und Präzipitation von IRS-1 wurden wie in Abb. 17 beschrieben durchgeführt, wobei statt TNF α 1 ng/ml Anisomycin zur Aktivierung der JNK eingesetzt wurde. Nach Immunoblot mit Anti-p85 α Antikörper und Anti-IRS-1 Antikörper folgte die Detektion mit dem Lumilmager. AI = Anisomycin. Das Experiment wurde drei Mal reproduziert.

3.2.4 Einfluss aktivierter IKK und JNK auf GSK3- und Akt-Proteinexpression

Da die Aktivierung von IKK und JNK nach einer Stunde zu einer leichten Reduktion der Signalweiterleitung an die PI3-Kinase führte, sollten die Auswirkungen dieses Effekts auf die stromabwärts liegenden Signalproteine erfolgen. Zunächst wurde geprüft, ob eine Behandlung mit TNF α bzw. Anisomycin die Proteinexpression von Akt und GSK3 beeinflusst. Die nach unterschiedlicher Vorbehandlung in Zellysaten vorhandene Menge dieser Proteine wurde in einem Westernblot ermittelt (Abb. 21).

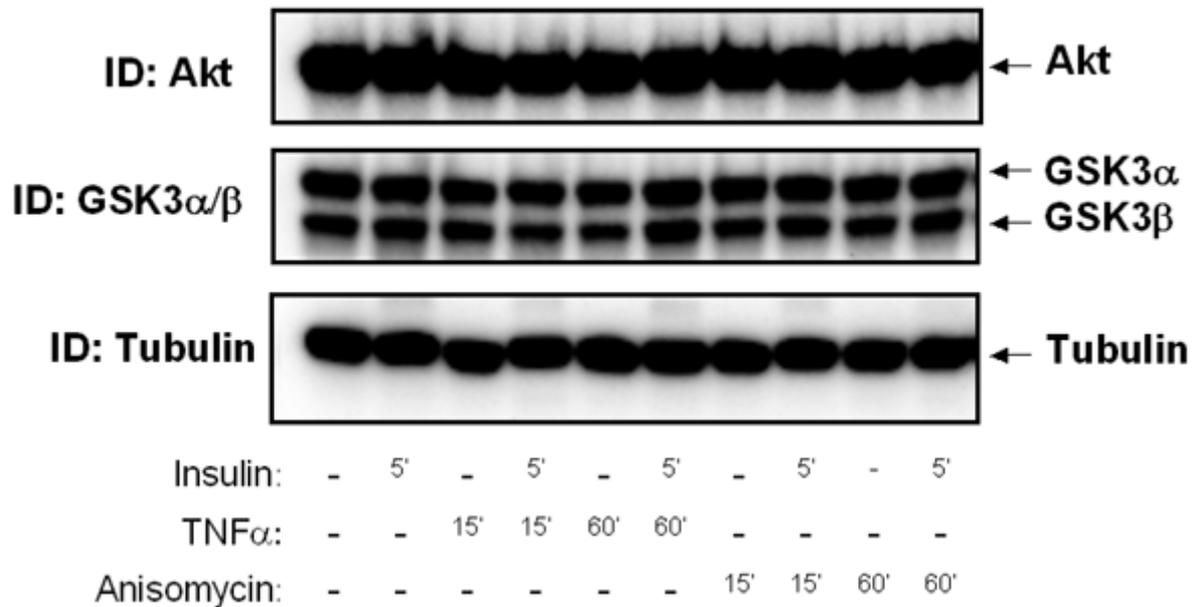


Abb. 21 Aktivierung der IKK und JNK hat keinen Einfluss auf die Expression von Akt und GSK3

Stimulation der Kardiomyoblasten mit 2,5 nM TNF α , 1 ng/ml Anisomycin und 100 nM Insulin erfolgte wie in Abb. 17 beschrieben. Jeweils 5 μ g der Zellysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und einer Immunodetektion mit spezifischen Anti-GSK3, Anti-Akt und Anti-Tubulin Antikörpern unterzogen. Dargestellt ist ein repräsentativer Immunoblot. Das Ergebnis wurde fünf Mal reproduziert.

Die Expression von Akt, GSK3 α und GSK3 β blieb nach 5-minütiger Behandlung mit Insulin sowie 15-minütiger und einstündiger TNF α - bzw. Anisomycin-Behandlung unverändert und korrelierte mit der Tubulinexpression. Ein kurzfristiger Einfluss aktivierter JNK und IKK auf die Proteinmenge dieser Effektoren kann somit ausgeschlossen werden.

3.2.5 Einfluss aktivierter IKK auf Akt Phosphorylierung

Die Proteinkinase B (Akt) stellt ein zentrales Molekül der Insulinsignalkaskade dar und vermittelt insulinabhängig sowohl die Translokation von GLUT4 Vesikeln zur Plasmamembran, als auch die Synthese von Glycogen. In aktivem Zustand liegt eine Phosphorylierung der Akt an Serin 473 und Threonin 308 vor.

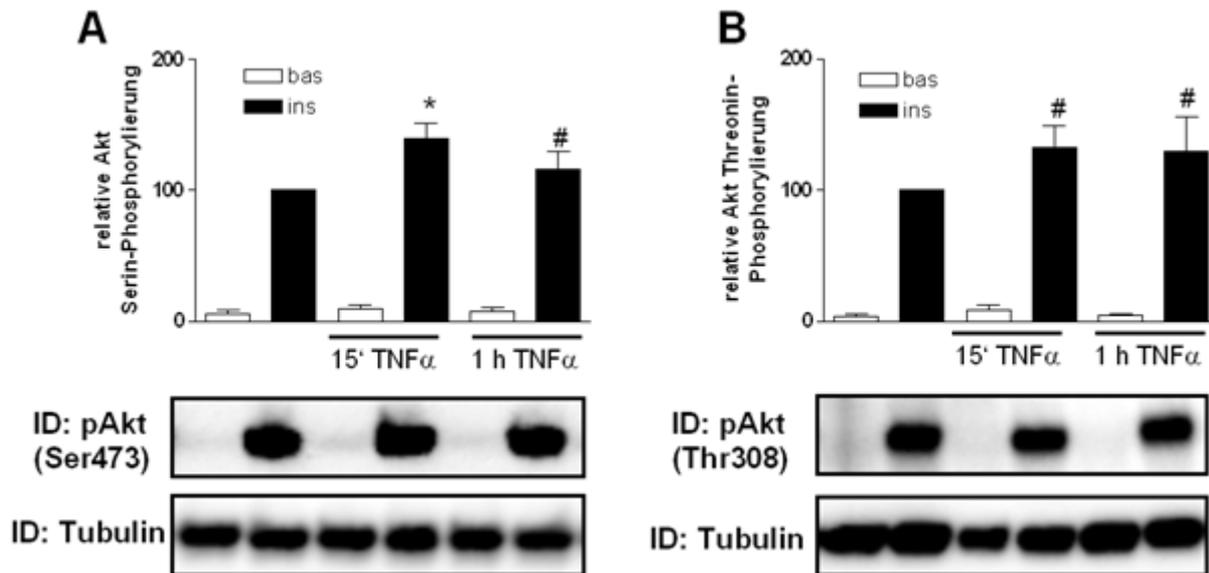


Abb. 22 Einfluss aktiver IKK auf die Akt Phosphorylierung

H9c2-E2 Zellen wurden mit 2,5 nM TNF α (A) bzw. 1 ng/ml Anisomycin und 100 nM Insulin wie in Abb. 10 beschrieben behandelt. Jeweils 5 μ g der Zellysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und einer Immunodetektion mit spezifischen Anti-Phospho-Akt Ser473 (A) und Anti-Phospho-Akt Thr308 (B) sowie Anti-Tubulin Antikörpern unterzogen. Bei der Auswertung wurde die Tubulin-Detektion zur Normierung der Daten verwendet. Der insulinstimulierte Kontrollwert wurde jeweils gleich 100% gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus 3 bis 7 unabhängigen Experimenten sowie jeweils ein repräsentativer Immunoblot. bas = basal; ins = insulinstimuliert; * = $p < 0,05$; # = kein signifikanter Unterschied.

Der 5-minütige Insulinstimulus bewirkte eine dramatische Zunahme der Akt Phosphorylierung an Serin 473 und Threonin 308. Diese insulinvermittelte Phosphorylierung konnte durch die aktivierte IKK nicht vermindert werden. Nach 15-minütiger TNF α -Behandlung wurde sogar eine signifikante Zunahme der insulinabhängigen Akt Phosphorylierung an Serin 473 um ca. 30% beobachtet. Die unter IKK-Einfluss auftretende geringfügige Reduktion der PI3-Kinase Aktivierung vermag demnach nicht die Signalweiterleitung an die Akt zu verhindern.

3.2.6 Einfluss aktivierter JNK auf Akt Phosphorylierung

In einem Initialexperiment konnte eine unverändert hohe insulinabhängige Serinphosphorylierung der Akt nach Anisomycin-Behandlung beobachtet werden (Abb. 23). Eine darauffolgende ausführliche Untersuchung bestätigte die anfängliche Vermutung, dass eine Aktivierung der JNK keineswegs zu verminderter

Serinphosphorylierung von Akt führt. Es konnte gezeigt werden, dass eine 15-minütige Anisomycin-Behandlung sogar zu einem leichten Anstieg der insulinvermittelten Serinphosphorylierung von Akt führt.

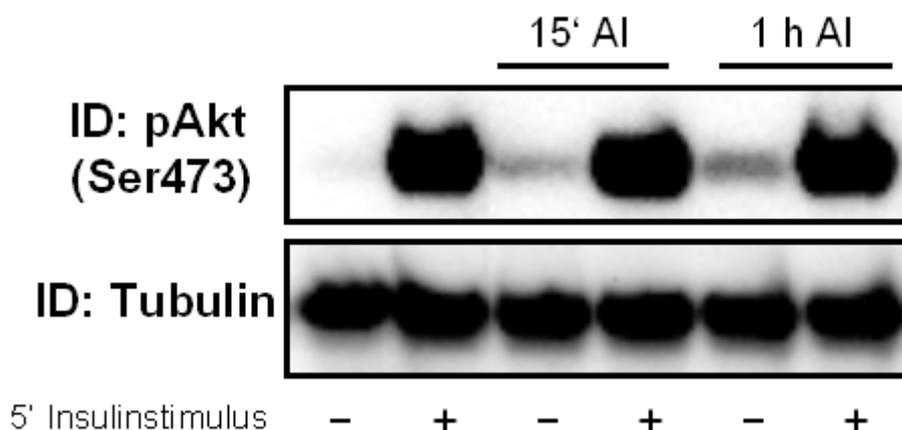


Abb. 23 Einfluss aktivierter JNK auf die Serinphosphorylierung von Akt

H9c2-E2 Zellen wurden wie in Abb. 17 beschrieben behandelt, wobei statt $\text{TNF}\alpha$ 1 ng/ml Anisomycin zur Aktivierung der JNK eingesetzt wurde. Der Insulinstimulus erfolgte mit 100 nM Insulin. Jeweils 5 μg der Zellysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und einer Immunodetektion mit spezifischen Anti-Phospho-Akt Ser473 und Anti-Tubulin Antikörpern unterzogen. AI = Anisomycin. Das Experiment wurde drei Mal reproduziert.

Von diesen Daten ausgehend wurde der Einfluss einer Anisomycin-Behandlung auf die Threoninphosphorylierung von Akt nach untersucht. Dabei konnte nach einem Insulinstimulus ein deutlicher Anstieg der Akt Phosphorylierung an Threonin beobachtet werden. In Einklang mit den Befunden zu Serinphosphorylierung wurde auch die insulinvermittelte Threoninphosphorylierung der Akt durch eine Aktivierung der JNK nicht verhindert. Auch hier konnte nach 15-minütiger Anisomycin-Behandlung eine signifikante Zunahme der insulinabhängigen Akt Phosphorylierung um ca. Faktor 2 nachgewiesen werden (Abb. 24).

Die Aktivierung der JNK hat demnach keine negative Auswirkung auf die Insulinsignal-Weiterleitung auf der Ebene von Akt. Die beobachtete geringfügige Abnahme der insulinabhängigen PI3-K/IRS-1 Interaktion nach einstündiger Anisomycin-Behandlung scheint demnach die Aktivierung von Akt nicht zu verhindern.

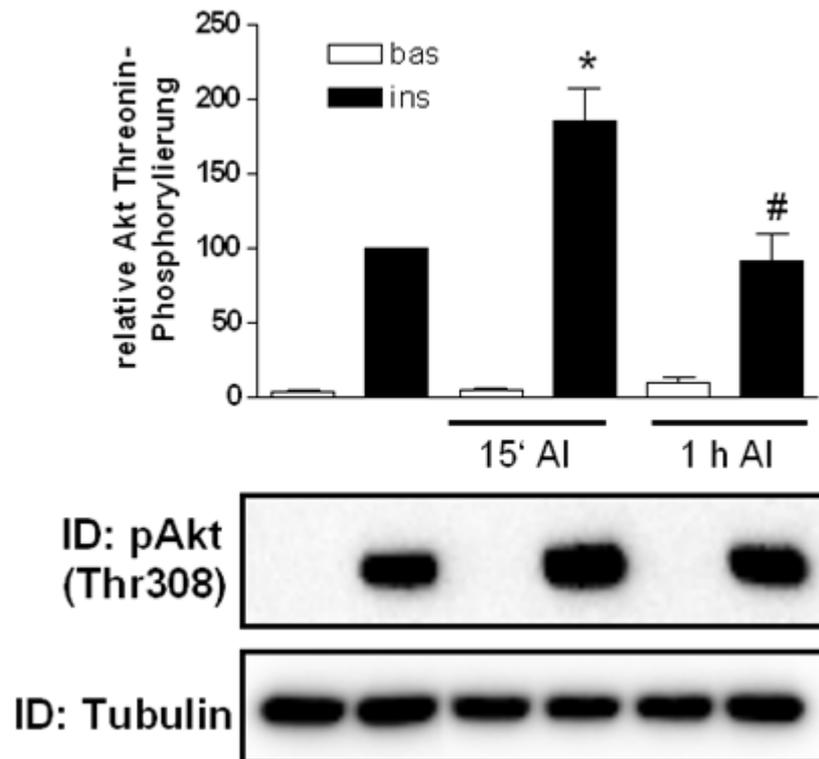


Abb. 24 Einfluss aktivierter JNK auf die Threoninphosphorylierung von Akt

H9c2-E2 Zellen wurden wie in Abb. 17 beschrieben behandelt, wobei statt $\text{TNF}\alpha$ 1 ng/ml Anisomycin zur Aktivierung der JNK eingesetzt wurde. Der Insulinstimulus erfolgte mit 100 nM Insulin. Jeweils 5 μg der Zellysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und einer Immunodetektion mit spezifischen Anti-Phospho-Akt Thr308 und Anti-Tubulin Antikörpern unterzogen. Bei der Auswertung wurde die Tubulin-Detektion zur Normierung der Daten verwendet. Der insulinstimulierte Kontrollwert wurde gleich 100% gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus 4 bis 6 unabhängigen Experimenten sowie ein repräsentativer Immunoblot. AI = Anisomycin; bas = basal; ins = insulinstimuliert; * = $p < 0,05$; # = kein signifikanter Unterschied.

3.2.7 Einfluss aktivierter IKK und JNK auf GSK3 Phosphorylierung

Um zu prüfen, ob die aktivierten Serinkinasen eine Unterbrechung der Signalweiterleitung zwischen Akt und Glycogensynthase auslösen, wurde die Aktivität der GSK3 untersucht. Im Basalzustand ist die GSK3 aktiv und inhibiert die Glycogensynthase. Nach einem Insulinstimulus wird sie von der Akt phosphoryliert und damit in inaktiven Zustand versetzt, was eine gesteigerte Glycogensynthase zu Folge hat. Der Phosphorylierungszustand von GSK3 diente in den nachfolgenden Experimenten zur Bestimmung der Akt-vermittelten Aktivierung der Glycogensynthase.

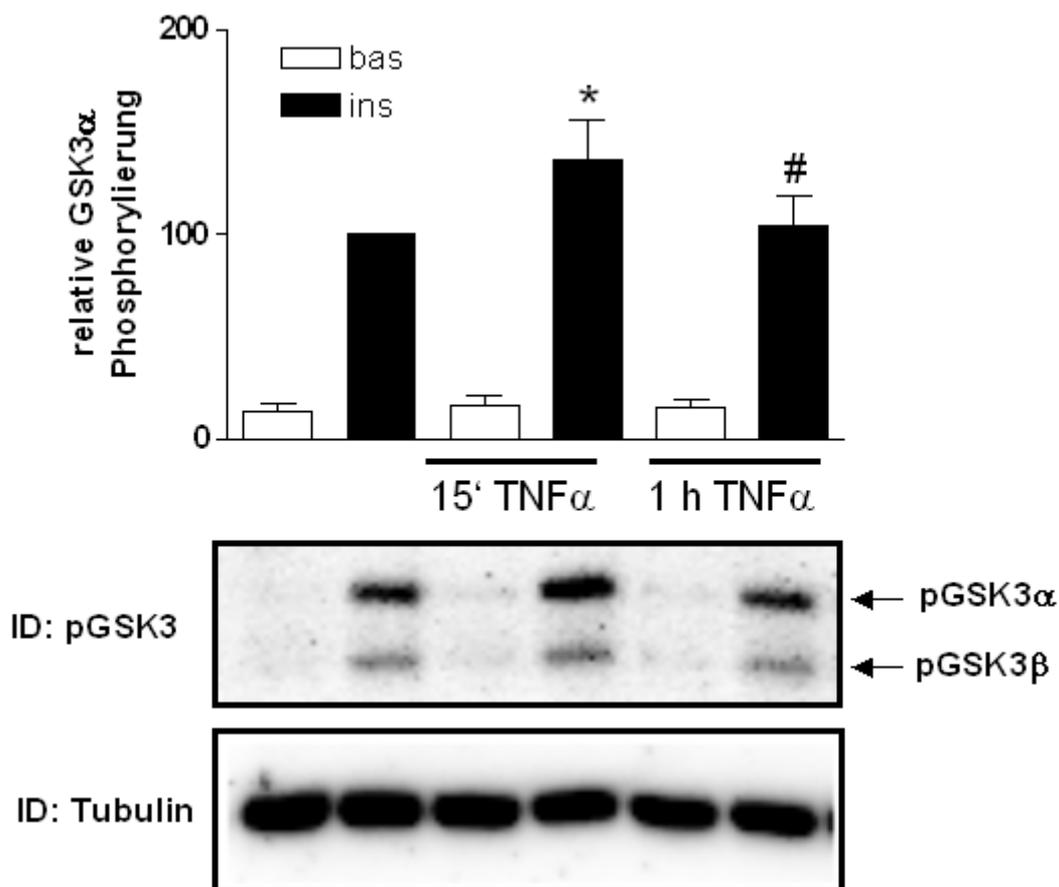


Abb. 25 Einfluss aktivierter IKK auf die Phosphorylierung von GSK3

H9c2-E2 Zellen wurden mit 2,5 nM TNF α und 100 nM Insulin wie in Abb. 17 beschrieben behandelt. Jeweils 5 μ g der Zellysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und einer Immunodetektion mit spezifischen Anti-Phospho-GSK3 und Anti-Tubulin Antikörpern unterzogen. Bei der Quantifizierung der Phosphorylierung von GSK3 α wurde die Tubulin-Detektion zur Normierung der Daten verwendet. Der insulinstimulierte Kontrollwert wurde gleich 100% gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus 4 bis 6 unabhängigen Experimenten sowie ein repräsentativer Immunoblot. bas = basal; ins = insulinstimuliert; * = $p < 0,05$; # = kein signifikanter Unterschied.

In Übereinstimmung mit Daten zur Akt Phosphorylierung wurde keine Verminderung der insulinabhängigen Phosphorylierung von GSK3 nach einer TNF α -Behandlung beobachtet (Abb. 25). Nach 15-minütiger Inkubation mit TNF α zeigte sich eine leicht gesteigerte Phosphorylierung von GSK3. Dieser signifikante Anstieg korreliert mit dem unter 3.2.5 gezeigten Anstieg der Akt Phosphorylierung.

Entsprechend konnte auch nach 15-minütiger Anisomycin-Behandlung eine signifikante Erhöhung der insulinvermittelten GSK3 Phosphorylierung gemessen werden (Abb. 26). Im Gegensatz dazu kam es nach einstündiger Anisomycin-Behandlung zu einer signifikanten Abnahme der GSK3 Phosphorylierung. Das ist umso bemerkenswerter, da die insulinabhängige Phosphorylierung der Akt zu diesem Zeitpunkt mit und ohne vorausgegangene JNK-Aktivierung unverändert hoch bleibt.

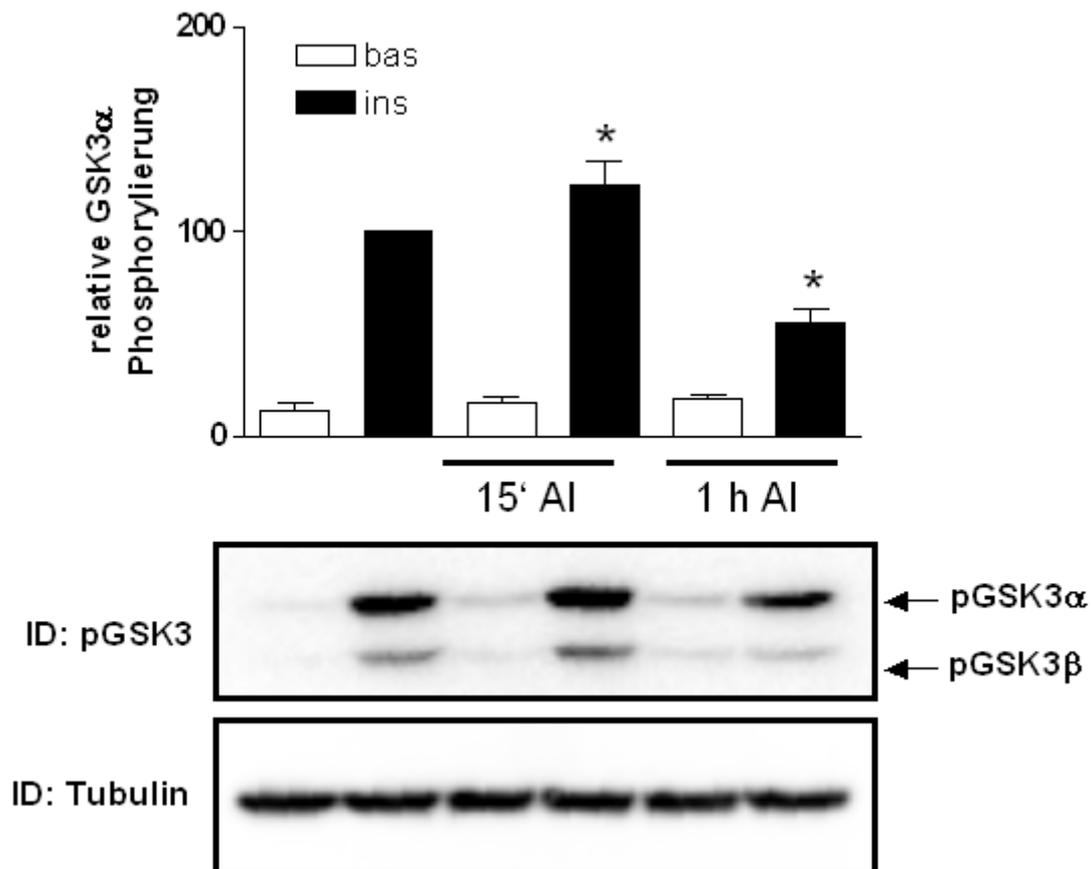


Abb. 26 Einfluss aktivierter JNK auf die Phosphorylierung von GSK3

H9c2-E2 Zellen wurden wie in Abb. 17 beschrieben behandelt, wobei statt $\text{TNF}\alpha$ 1 ng/ml Anisomycin zur Aktivierung der JNK eingesetzt wurde. Der Insulinstimulus erfolgte mit 100 nM Insulin. Jeweils 5 μg der Zellysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und einer Immunodetektion mit spezifischen Anti-Phospho-GSK3 und Anti-Tubulin Antikörpern unterzogen. Bei der Quantifizierung der Phosphorylierung von GSK3 α wurde die Tubulin-Detektion zur Normierung der Daten verwendet. Der insulinstimulierte Kontrollwert wurde gleich 100% gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus 4 bis 5 unabhängigen Experimenten sowie ein repräsentativer Immunoblot. AI = Anisomycin; bas = basal; ins = insulinstimuliert; * = $p < 0,05$.

3.2.8 Einfluss aktivierter IKK und JNK auf die GLUT4 Translokation

Durch Insulin wird eine vermehrte Glucoseaufnahme ausgelöst. Diesem Vorgang liegt eine erhöhte Translokation von GLUT4 zur Plasmamembran zugrunde. Da die H9c2 Zellen nur über geringe Mengen dieses insulinabhängigen Glucosetransporters verfügen, ist eine Bestimmung der Translokation sehr schwierig. Um eine eindeutige Messung zu ermöglichen wurde zuvor eine transiente Transfektion der Zellen mittels FuGene6 durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde von Herrn Matthias Uhlig ein Vektor zur Verfügung gestellt, der eine Expression des GLUT4myc unter der Kontrolle des Cytomegalovirus-Promotors erlaubt. Der myc-Tag dient dabei der Kennzeichnung des überexprimierten Glucosetransporters.

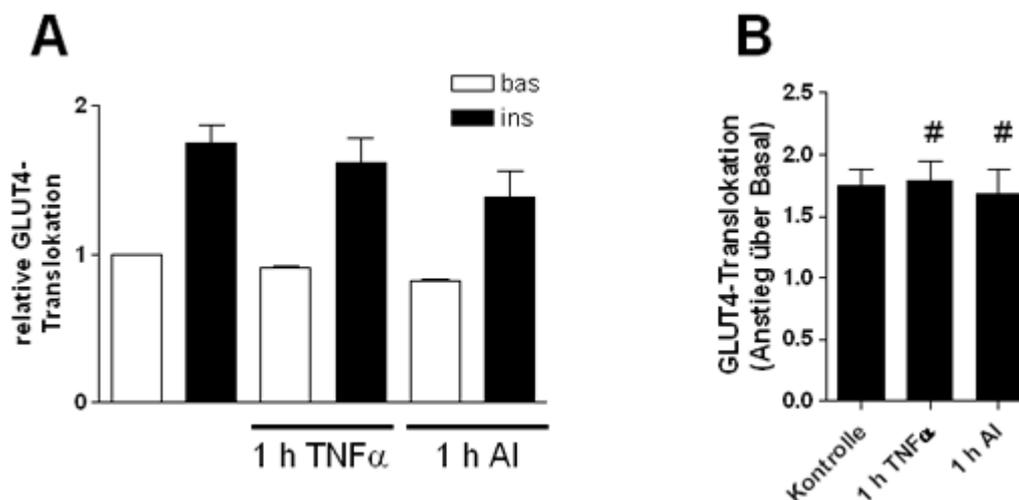


Abb. 27 Translokation von rekombinantem GLUT4 zur Plasmamembran

Jeweils $3,5 \times 10^4$ H9c2-E2 Zellen wurden in 12-Well-Platten mittels FuGENE6 mit $0,5 \mu\text{g}$ pCMV GLUT4myc transient transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen eine Stunde lang mit $2,5 \text{ nM}$ TNF α beziehungsweise 1 ng/ml Anisomycin inkubiert und weitere 30 min mit $1 \mu\text{M}$ Insulin stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit 2% Paraformaldehydlösung fixiert, 1 h in PBS mit 5% Magermilchpulver blockiert und für 2 h mit einem Anti-Myc Antikörper (1:200) inkubiert. Es folgte eine einstündige Inkubation mit dem sekundären Anti-Maus [^{125}J] Antikörper ($0,1 \mu\text{Ci}$ pro Well). Nach Solubilisierung in 1% SDS wurde die Radioaktivität der Proben im γ -Counter bestimmt. (A) Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten, als Referenz dient der unbehandelte Basalwert. (B) Die gleichen Daten in einer anderen Darstellungsweise: hier wurde der insulinabhängige Anstieg der GLUT4-Translokation als das Vielfache des jeweiligen Basalwertes aufgetragen. AI = Anisomycin; bas = basal; ins = insulinstimuliert; # = kein signifikanter Unterschied zu Kontrolle.

Da die Aktivierung des Vesikeltransports erst nach 30 min ihr Maximum erreicht, wurde der Insulinstimulus entsprechend ausgedehnt. Aus diesem Grund wurde auf eine Erhebung der Daten zu Auswirkungen der 15-minütigen IKK- und JNK Aktivierung verzichtet, es wurden nur die Folgen einer einstündigen Kinasenaktivierung ermittelt. Nach transienter Transfektion konnte ein klarer, insulinabhängiger Anstieg der Menge von membranständigem GLUT4 um nahezu Faktor 2 gezeigt werden. Nach einstündiger Behandlung mit TNF α bzw. Anisomycin wurde eine geringfügige Reduktion der Mengen des membranständigen GLUT4 im basalen und insulinstimulierten Zustand beobachtet (Abb. 27 A). Diese Abnahme war jedoch nur unter Anisomycin-Behandlung signifikant. Die insulinvermittelte Translokation des GLUT4 blieb allerdings sowohl nach Aktivierung der IKK als auch der JNK unverändert. Eine Stimulation mit Insulin bewirkte einen Anstieg des membranständigen GLUT4 um 75% verglichen mit dem jeweiligen Basalzustand (Abb. 27 B).

3.2.9 Auswirkungen einer 18-stündigen Aktivierung der IKK auf Akt Phosphorylierung

In den vorausgegangenen Experimenten konnte nach einer Aktivierung der IKK keine Hemmung der insulinvermittelten Akt Phosphorylierung in der Myoblasten-Zelllinie beobachtet werden. Dennoch wäre es denkbar, dass die IKK nicht unmittelbar, sondern über Regelung der Aktivität oder Genexpression von weiteren unbekannten Faktoren einen inhibitorischen Einfluss auf die Insulinsignalkaskade ausübt. Daher sollte exemplarisch überprüft werden, ob eine über Nacht anhaltende TNF α -Behandlung Auswirkungen auf die Akt Phosphorylierung hat.

Da eine Inkubation mit hohen (2,5 nM) TNF α Konzentrationen langfristig zu einer Schädigung und Ablösung der Myoblasten führt, sollte zunächst ermittelt werden, welche minimale TNF α Konzentration zur Aktivierung der IKK ausreichend ist. Dazu wurden die Zellen verschiedenen TNF α Verdünnungen ausgesetzt. Eine Inkubation mit 2,5 nM 0,5 nM und 0,1 nM TNF α führte zu vollständigem Abbau des I κ B innerhalb von 30 min, während eine weitere Reduktion der TNF α Konzentration auf 0,02 nM bereits nur seinen partiellen Abbau zu Folge hatte (Abb. 28 A). Da die Inkubation mit 0,1 nM TNF α für 18 h zu keinen sichtbaren Änderungen der Viabilität

von H9c2-E2 Zellen führte, wurde diese Konzentration für die weiteren Experimente ausgewählt. Die Aktivierung der IKK über Nacht führte jedoch zu keiner Reduktion der insulinvermittelten Akt Phosphorylierung. Es konnte eine signifikante Steigerung der insulinabhängigen Serinphosphorylierung der Akt um ca. 80% nach 18stündiger Behandlung mit TNF α gezeigt werden (Abb. 28 B).

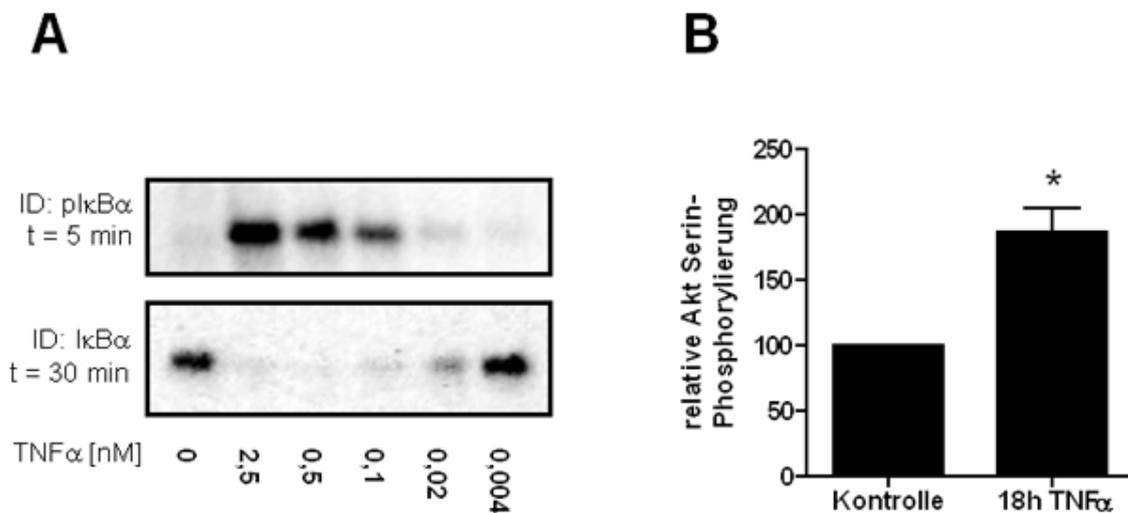


Abb. 28 Auswirkungen einer 18-Stündigen Aktivierung der IKK auf die Phosphorylierung der Akt

(A) H9c2-E2 Zellen wurden 5 min und 30 min mit verschiedenen TNF α Konzentrationen behandelt. Jeweil 5 μ g der Zellysate wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Anti-IkB beziehungsweise Anti-Phospho-IkB Antikörper detektiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment. (B) H9c2-E2 Zellen wurden über Nacht mit 0,1 nM TNF α behandelt, mit PBS gewaschen und für eine weitere Stunde im serumfreien DMEM inkubiert. Vor der Lyse erfolgte ein akuter Insulinstimulus mit 100 nM Insulin für 5 min. Jeweils 5 μ g der Zellysate wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und einer Immunodetektion mit spezifischen Anti-Phospho-Akt Ser473 und Anti-Tubulin Antikörpern unterzogen. Bei der Auswertung wurde die Tubulin-Detektion zur Normierung der Daten verwendet. Der insulinstimulierte Kontrollwert wurde gleich 100% gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus 4 unabhängigen Experimenten. bas = basal; ins = insulinstimuliert; * = $p < 0,05$.

3.2.10 Auswirkungen der aktivierten Kinasen IKK und JNK auf die Phosphorylierung des endogenen IRS-1 an Serin 307

Eine Phosphorylierung des IRS-1 an Serin 307 durch die IKK und JNK wurde mehrfach in der aktuellen Fachliteratur beschrieben. Um zu prüfen, ob eine Behandlung mit TNF α und Anisomycin eine Phosphorylierung dieses Serins in den Myoblasten bewirkt, wurden IRS-1 Präzipitate mit spezifischen Phospho-Antikörpern der Firmen

Upstate und Biosource untersucht. Als Positiv- und Negativkontrolle der Antikörper-Spezifität dienten dabei Zellysate, welche von der Firma Upstate zur Verfügung gestellt wurden.

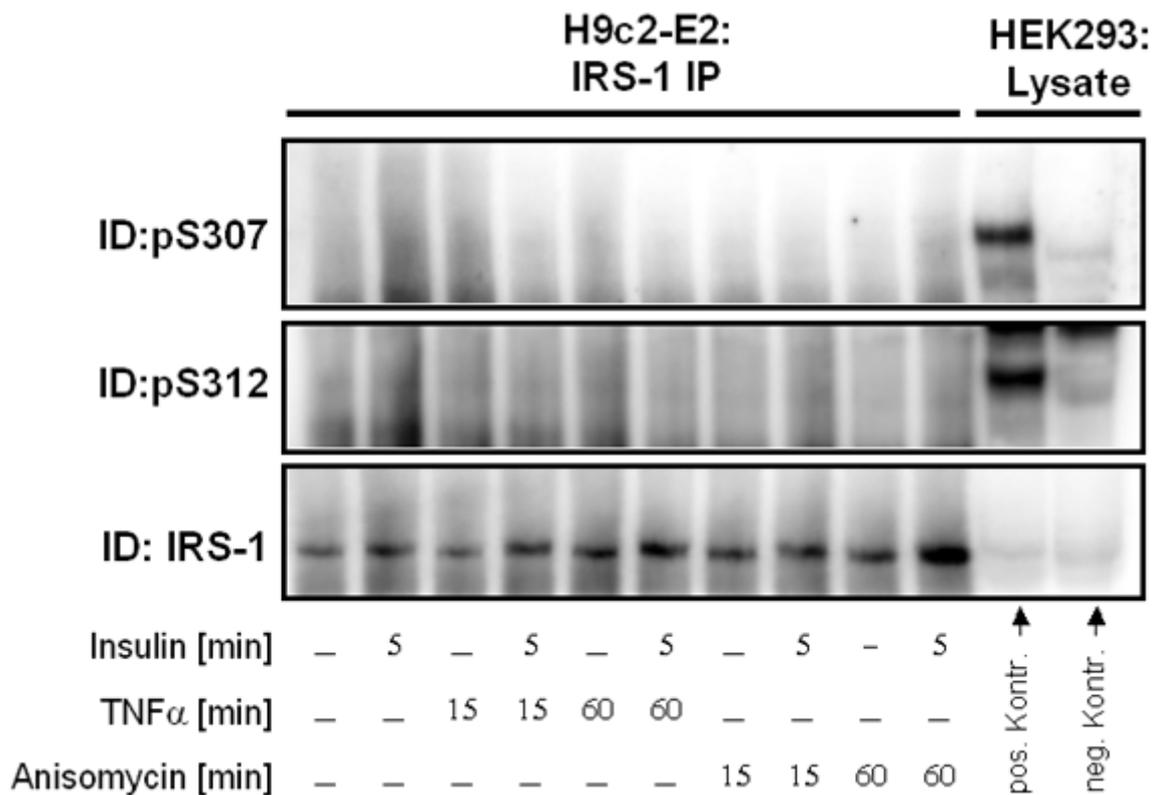


Abb. 29 Phosphorylierung des endogenen IRS-1 an Ser307

Immunopräzipitation von IRS-1 aus embryonalen Kardiomyoblasten erfolgte wie in Abb. 17 beschrieben. Zuvor wurden die Zellen jeweils mit 2,5 nM TNF α oder 1 ng/ml Anisomycin und 100 nM Insulin behandelt. Die Präzipitate wurden mit PBS gewaschen, mit Laemmli-Probenpuffer denaturiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Als positive und negative Kontrolle zur Verifizierung der Spezifität der Phospho-Serin Detektion dienten von der Firma Upstate freundlicherweise zur Verfügung gestellte HEK293-Kontroll-Lysate (jeweils 5 μ g). Die Immunodetektion der Serinphosphorylierung von IRS-1 erfolgte mit Antikörpern gegen Phospho-IRS-1 (Ser307) der Ratte (Upstate), humanes Phospho-IRS-1 (Ser312), welches dem Ser 307 der Ratte entspricht (Biosource) und IRS-1. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Immunoblot. Das Ergebnis wurde drei Mal reproduziert.

Trotz hochspezifischer Detektion der IRS-1 Phosphorylierung an Serin 307 in Kontrolllysaten konnte keine entsprechende Phosphorylierung des präzipitierten IRS-1 beobachtet werden. Weder die Aktivierung der IKK mit TNF α noch die Aktivierung der JNK mit Anisomycin führte zu einer detektierbaren Phosphorylierung an Serin 307 (Abb. 29).

3.2.11 Auswirkungen der aktivierten Kinasen IKK und JNK auf die Phosphorylierung von transient überexprimiertem IRS-1 an Serin 307

Da die zelluläre Expression von IRS-1 relativ niedrig ist, sollte zum Vergleich die Untersuchung der Phosphorylierung an Serin 307 nach einer transienten IRS-1 Überexpression vorgenommen werden. Zu diesem Zweck wurde zunächst ein Vektor kloniert, der das Hämagglutinin (HA) markierte humane IRS-1 unter der Kontrolle des Cytomegalovirus-Promotors exprimiert.

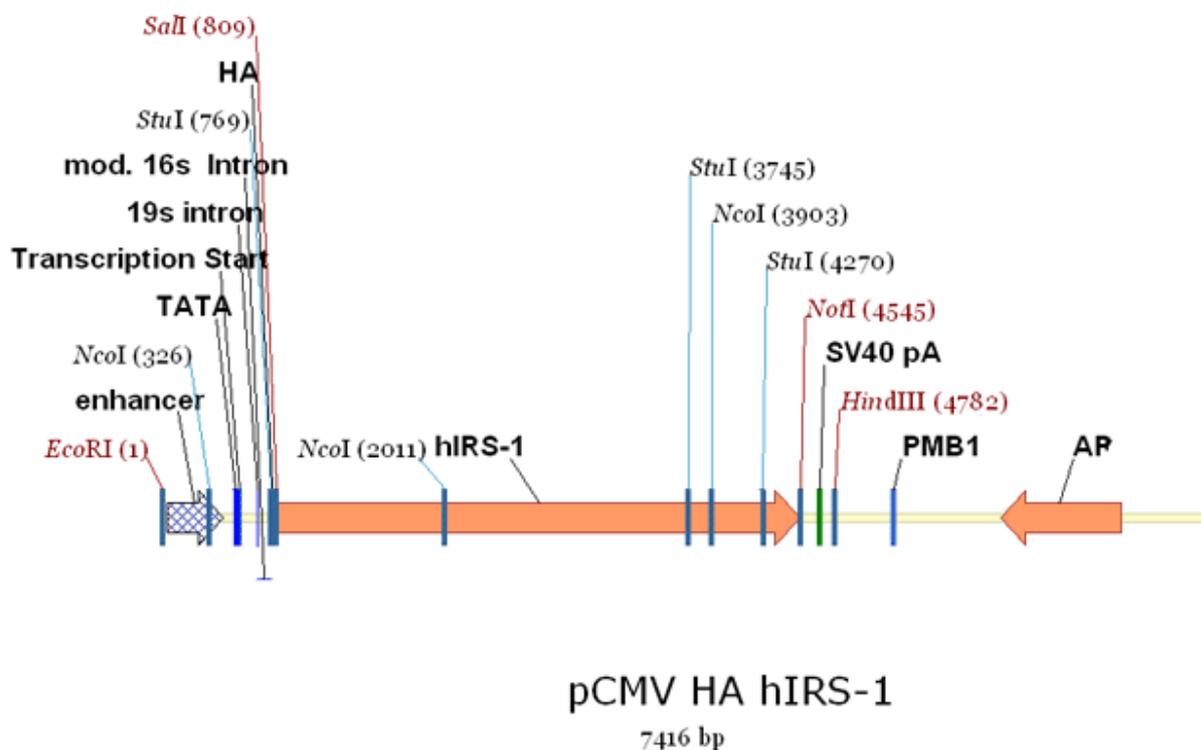


Abb. 30 Schematische Darstellung von pCMV HA hIRS-1

Als Grundlage diente der pCMVbeta Vektor (Clontech). Zunächst wurde eine stromabwärts der Polyadenylierungsstelle liegende *SalI* Restriktionsstelle entfernt. Dazu wurde ein aus den Oligonukleotiden PR1 und PR2 (siehe 2.1.9.1) bestehender Adapter, welcher eine Punktmutation in der *SalI* Restriktionsstelle enthält, anstelle des zuvor entfernten *SalI*-*HindIII* Fragmentes eingesetzt.

Die cDNA Sequenz des humanen Insulinrezeptorsubstrats 1 wurde mittels PCR mit Primern PR2 und PR3 (siehe 2.1.9.1) dem Plasmid pGX-5X-3-hIRS-1 entnommen und mit *SalI* sowie *NotI* geschnitten. Das HA-Fragment wurde über eine PCR, bei der die Oligonukleotide PR5 und PR6 (siehe 2.1.9.1) gleichzeitig als Primer und Vorlage (PCR template) dienten, generiert und anschliessend mit *StuI* und *SalI* geschnitten. Nach erfolgreicher Ligation beider Fragmente in der zuvor mit *StuI* und *NotI* geschnittenen Vektor wurde das Konstrukt in *E.coli* vermehrt und mittels Kontrollrestriktion sowie Sequenzanalyse mit Sequenzprimern PR7-PR13 (Qiagen) verifiziert. Die präparierte Plasmid-DNA wurde für die Transfektion eingesetzt. Im Vorexperiment konnte nach 24 h eine mehr als 100fache Überexpression des IRS-1 erreicht werden (Daten nicht gezeigt).

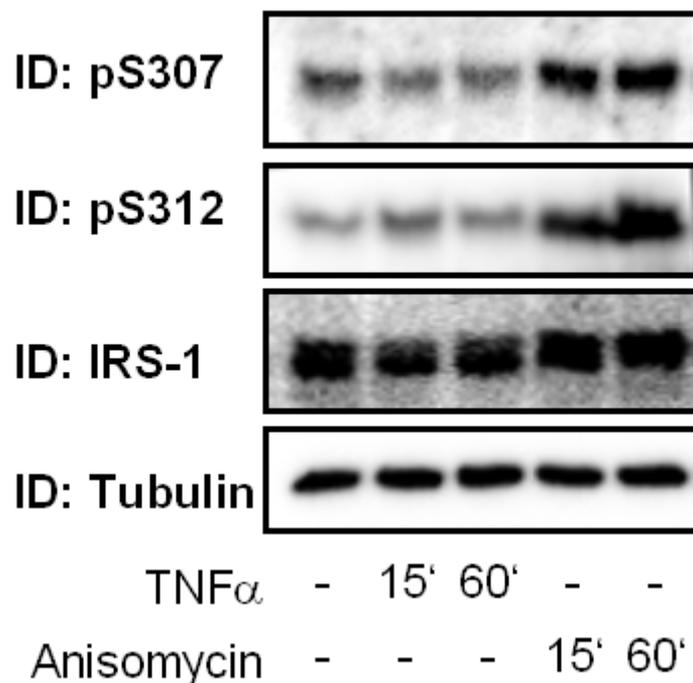


Abb. 31 Phosphorylierung von überexprimiertem IRS-1 an Ser307

Subkonfluente Monolayer der H9c2-E2 Zellen wurden in 6-Well-Platten mit 2 μ g pCMV HA-IRS-1 und 3 μ l FuGENE6 transient transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen mit 2,5 nM TNF α beziehungsweise 1 ng/ml Anisomycin für 15 und 60 min stimuliert. Jeweils 5 μ g der Zellysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit spezifischen Antikörpern gegen Phospho-IRS-1 (Ser307) der Ratte (Upstate), humanes Phospho-IRS-1 (Ser312), welches dem Ser 307 der Ratte entspricht (Biosource), Tubulin und IRS-1 immunodetektiert.

Nach transierter Überexpression des IRS-1 konnte in Zellysaten eine JNK vermittelte Phosphorylierung an Serin 307 mit beiden getesteten Antikörpern nachgewiesen werden. Eine TNF α vermittelte Serinphosphorylierung von IRS-1 an 307 konnte auch nach einer Überexpression nicht detektiert werden (Abb. 31).

3.3 Untersuchung der Insulinresistenz im Zellmodell

3.3.1 Induktion der Insulinresistenz in H9c2-E2 Myoblasten

Um die Inhibierung der Insulinsignalkaskade in Zellen untersuchen zu können, wurde zunächst in Zellkultur ein Modell zur Erzeugung der Insulinresistenz generiert. Hierzu wurden embryonale Myoblasten aus Rattenherz (Linie H9c2 Klon E2) verwendet, die stabil den Insulinrezeptor überexprimieren. Da eine Insulinresistenz mit erhöhten Glucose- und Insulinspiegeln im Blut einhergeht, wurden die Zellen mit 20,5 mM Glucose und/oder 100 nM Insulin über Nacht inkubiert. Anschliessend wurden die Zellen zweimal mit serumfreiem Medium gewaschen und 1 h serumfrei inkubiert, um die Dissoziation der gebundenen Insulinmoleküle vom Insulinrezeptor zu ermöglichen (Abb. 32). Die Signallöschung nach dem Waschen und einstündiger serumfreier Inkubation wurde gesondert bestätigt. Nach folgender 5-minütiger Stimulation mit 100 nM Insulin wurden die Zellen lysiert und die Aktivität der Insulinsignalkaskade anhand der Akt Phosphorylierung bestimmt.

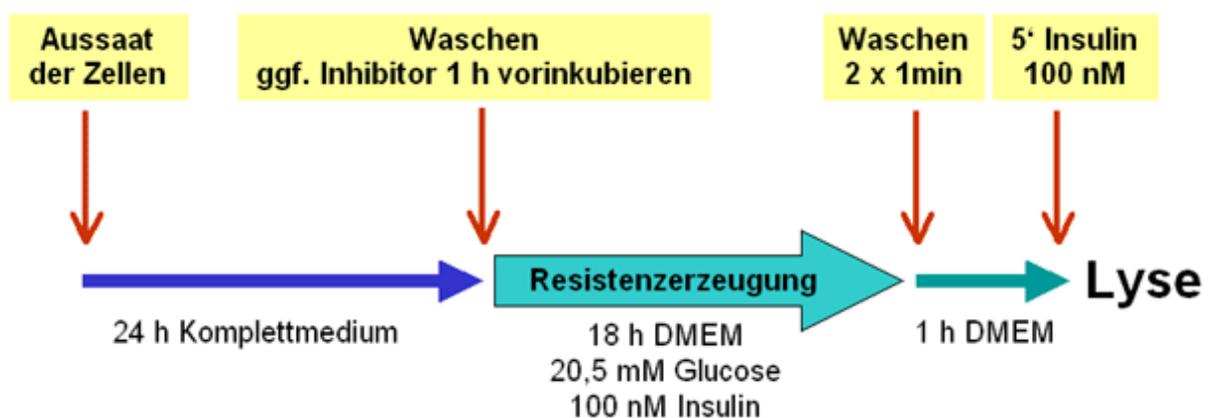


Abb. 32 Schematische Darstellung der Resistenzinduktion

Die Inkubation mit hohen Glucosekonzentrationen ergab eine Abnahme der Akt Phosphorylierung an Serin 473 um ca. 15-20% gegenüber unbehandelter Kontrolle, hohe Insulingabe über Nacht resultierte in einer Verminderung der Serinphosphory-

lierung um ca. 50%. Additiv ergab sich eine signifikante Abnahme der Akt Phosphorylierung um ca. 60%, wenn die Zellen beiden Substanzen in Kombination über Nacht ausgesetzt wurden (Abb. 33). Die zelluläre Expression der Akt wurde nicht beeinflusst.

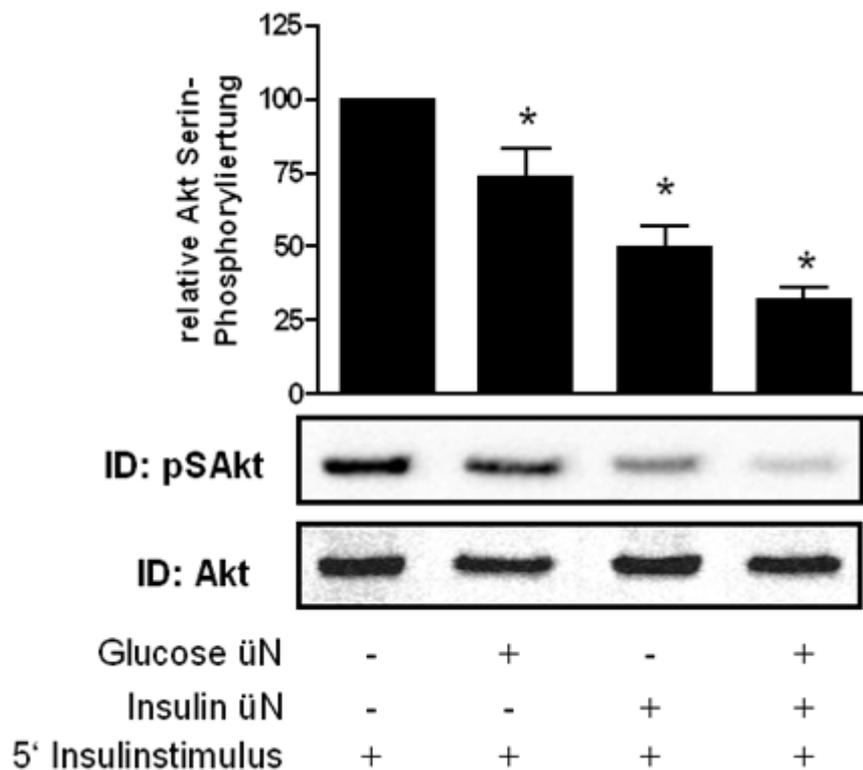


Abb. 33 Induktion der Insulinresistenz mit Glucose und Insulin

Zur Induktion der Insulinresistenz wurden H9c2-E2 Zellen über Nacht im serumfreien DMEM mit 100 nM Insulin und/oder 20,5 mM Glucose behandelt. Nach zweifachem Waschen mit PBS gefolgt von einer einstündigen serumfreien Inkubation in DMEM wurden die Zellen einem akuten Insulinstimulus mit 100 nM Insulin ausgesetzt. Aktivierung der Signalkaskade wurde ermittelt durch Bestimmung der Phosphorylierung von Akt in Zellysaten mittels SDS-PAGE und Immunoblot mit spezifischen Anti-Akt und Anti-Phospho-Akt (Ser 473) Antikörpern. Die Detektion von Akt bzw. Tubulin diente der Normierung. Die Quantifizierung der Akt Phosphorylierung wurde mit der Lumi-Imager Software durchgeführt. Der insulinstimulierte Kontrollwert wurde gleich 100% gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus 6 bis 10 unabhängigen Experimenten sowie ein repräsentativer Immunoblot. * = $p < 0,05$.

In einem weiteren Experiment wurden die Auswirkungen einer über-Nacht Behandlung mit Glucose und Insulin auf die Threoninphosphorylierung der Akt untersucht. Hier zeigte sich eine dramatische Reduktion der insulinstimulierten Akt Phosphorylierung an Threonin 308 um 80% (Abb. 34 A).

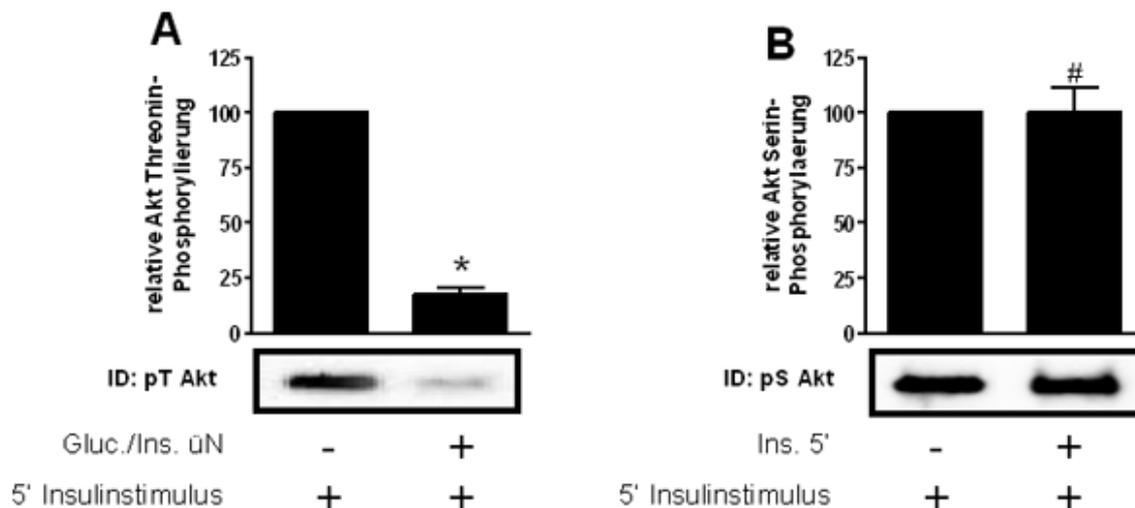


Abb. 34 Induktion der Insulinresistenz – Charakterisierung des Resistenzmodells

Die Induktion der Insulinresistenz mit 100 nM Insulin und 20,5 mM Glucose sowie die Aufarbeitung der Proben erfolgte wie in Abb. 33 beschrieben. Zur Detektion der Threoninphosphorylierung von Akt wurde Anti-Phospho-Akt (Thr308) Antikörper verwendet. Die Detektion von Tubulin diente der Normierung. Die Quantifizierung der Akt Phosphorylierung wurde mit der Lumi-Imager Software durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus 5 unabhängigen Experimenten sowie ein repräsentativer Immunoblot. * = $p < 0,05$. (B) Hier wurde erst 5 min vor Ablauf der serumfreien über Nacht Inkubation 100 nM Insulin zugegeben. Nach zweifachem Waschen mit PBS gefolgt von einer einstündigen serumfreien Inkubation in DMEM wurden die Zellen einem akuten Insulinstimulus mit 100 nM Insulin ausgesetzt. Die Aktivierung der Signalkaskade wurde ermittelt durch Bestimmung der Phosphorylierung von Akt in Zellysaten mittels SDS-PAGE und Immunoblot mit spezifischem Anti-Phospho-Akt (Ser473) Antikörper. Die Detektion von Tubulin diente der Normierung. Die Quantifizierung der Akt Phosphorylierung wurde mit der Lumi-Imager Software durchgeführt. Der insulinstimulierte Kontrollwert wurde gleich 100% gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus 6 unabhängigen Experimenten sowie ein repräsentativer Immunoblot. # = kein signifikanter Unterschied.

Um eine vollständige Löschung des akuten Insulinsignals nach dem einstündigen Waschschrift zu überprüfen, wurden die Zellen nach einer 18-stündigen serumfreien Inkubation einem 5-minütigem Insulinstimulus ausgesetzt, anschliessend zweimal mit DMEM gewaschen und nach einer weiteren einstündigen serumfreien Inkubation einem erneuten Insulinstimulus ausgesetzt. Die insulinvermittelte Serinphosphorylierung von Akt wurde verglichen. Nach einstündigem Waschen war die Akt Phosphorylierung in unbehandelter und kurzzeitig mit Insulin behandelte Probe vergleichbar (Abb. 34 B). Demnach genügt das einstündige Waschen, um eine Signallöschung und eine erneute vollständige Ansprechbarkeit der Signalkaskade auf der Ebene von Akt zu erreichen.

3.3.2 Effekte hoher Glucose- und Insulinkonzentrationen auf die Expression und Phosphorylierung des Insulinrezeptors

Eine gesteigerte Internalisierung des aktivierten Insulinrezeptors zählt zu den physiologischen Mechanismen der Signalabschaltung. Eine Reduktion der Rezeptormenge in den untersuchten Zellen erschien aufgrund der stabilen Überexpression des Insulinrezeptors unwahrscheinlich. Um dennoch eventuelle Auswirkungen der Resistenzinduktion auf die Expression des Insulinrezeptors zu überprüfen wurden die Lysate der behandelten Zellen einem Immunoblot mit Anti-Insulinrezeptor Antikörper unterzogen (Abb. 35). Es konnte gezeigt werden, dass die Rezeptorexpression auch nach 18-stündiger Inkubation mit Glucose und Insulin unverändert blieb.

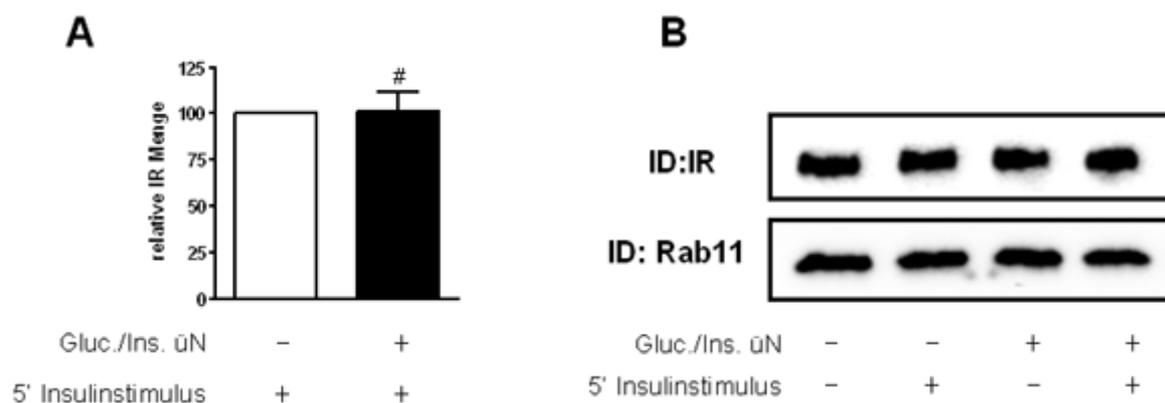


Abb. 35 Expression des Insulinrezeptors

(A) Die Induktion der Insulinresistenz mit 100 nM Insulin und 20,5 mM Glucose sowie die Aufarbeitung der Proben erfolgte wie in Abb. 33 beschrieben. Jeweils 5 µg der Zellysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und einer Immunodetektion mit spezifischem Anti-IR Antikörper unterzogen. Bei der Quantifizierung der Insulinrezeptor-Expression wurde die Detektion von konstant exprimierten Proteinen wie Tubulin bzw. Rab11 zur Normierung der Daten verwendet. Der insulinstimulierte Kontrollwert wurde gleich 100% gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM aus 4 unabhängigen Experimenten sowie ein repräsentativer Immunoblot. * = $p < 0,05$; # = kein signifikanter Unterschied.

Die insulinvermittelte Phosphorylierbarkeit des Insulinrezeptors wurde ebenfalls untersucht. Hierfür wurde ein Antikörper eingesetzt, der selektiv an den an Tyrosinen 1158, 1162 und 1163 phosphorylierten Insulinrezeptor bindet. Aufgrund hoher Homologie dieser Region bindet der Antikörper ebenfalls an den aktivierten IGF1 Rezeptor. Da die zelluläre Menge des IGF1 Rezeptors im Vergleich zu dem stabil

überexprimierten Insulinrezeptor extrem gering ist, wurde sie bei der Auswertung vernachlässigt. Die gemessene unverändert hohe insulinabhängige Rezeptorphosphorylierung wurde als Aktivierung des Insulinrezeptors gewertet (Abb. 36).

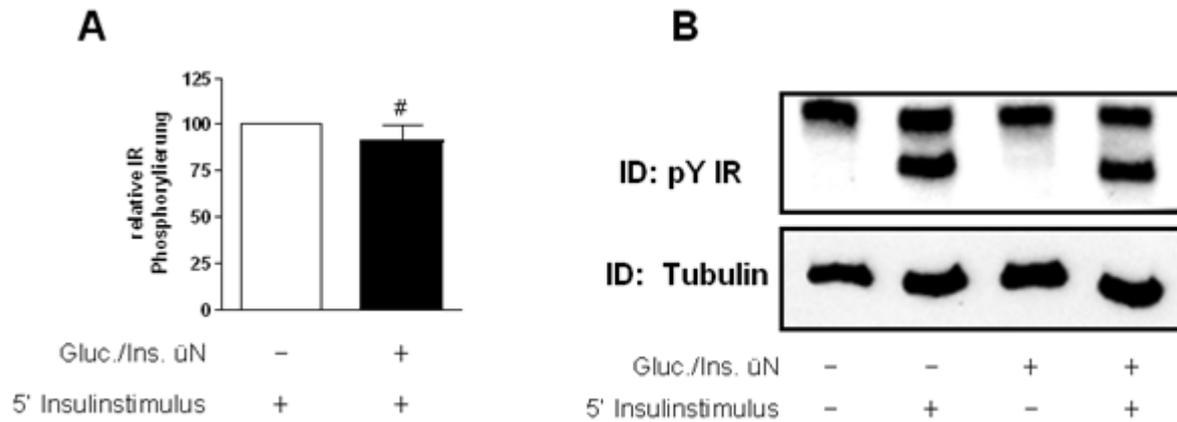


Abb. 36 Insulinabhängige Phosphorylierung des Insulinrezeptors

(A) Die Induktion der Insulinresistenz mit 100 nM Insulin und 20,5 mM Glucose sowie die Aufarbeitung der Proben erfolgte wie in Abb. 33 beschrieben. Jeweils 5 μ g der Zellysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und einer Immunodetektion mit Anti-Phospho-IR/IGF1R (pYpYpY1158/1162/1163) Antikörper unterzogen. Bei der Quantifizierung der Rezeptor-Phosphorylierung wurde die Detektion von Tubulin zur Normierung der Daten verwendet. Der insulinstimulierte Kontrollwert wurde gleich 100% gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus 5 unabhängigen Experimenten sowie ein repräsentativer Immunoblot. # = kein signifikanter Unterschied.

3.3.3 Effekte hoher Glucose- und Insulinmengen auf die IRS-1 Funktion

Im Zusammenhang mit der Insulinresistenz wurde wiederholt eine reduzierte Tyrosinphosphorylierung des Insulinrezeptorsubstrats und eine gestörte Aktivierung der PI3 Kinase beschrieben. Um zu prüfen, ob die mittels Glucose und Insulin induzierte Insulinresistenz bereits auf der Ebene des Insulinrezeptorsubstrats beginnt, wurde das IRS-1 mit einem spezifischen Antikörper aus Lysaten von behandelten und unbehandelten Zellen präzipitiert und hinsichtlich seiner Tyrosinphosphorylierung sowie kopräzipitierter Menge der p85 α Untereinheit untersucht. Dabei konnte eine unverändert hohe insulinabhängige Tyrosinphosphorylierung des IRS-1 gezeigt werden (Abb. 37 A). Die Menge der kopräzipitierten p85 α Untereinheit der PI3-Kinase

nahm dagegen nach der Resistenzinduktion geringfügig, aber signifikant um ca. 10% ab.

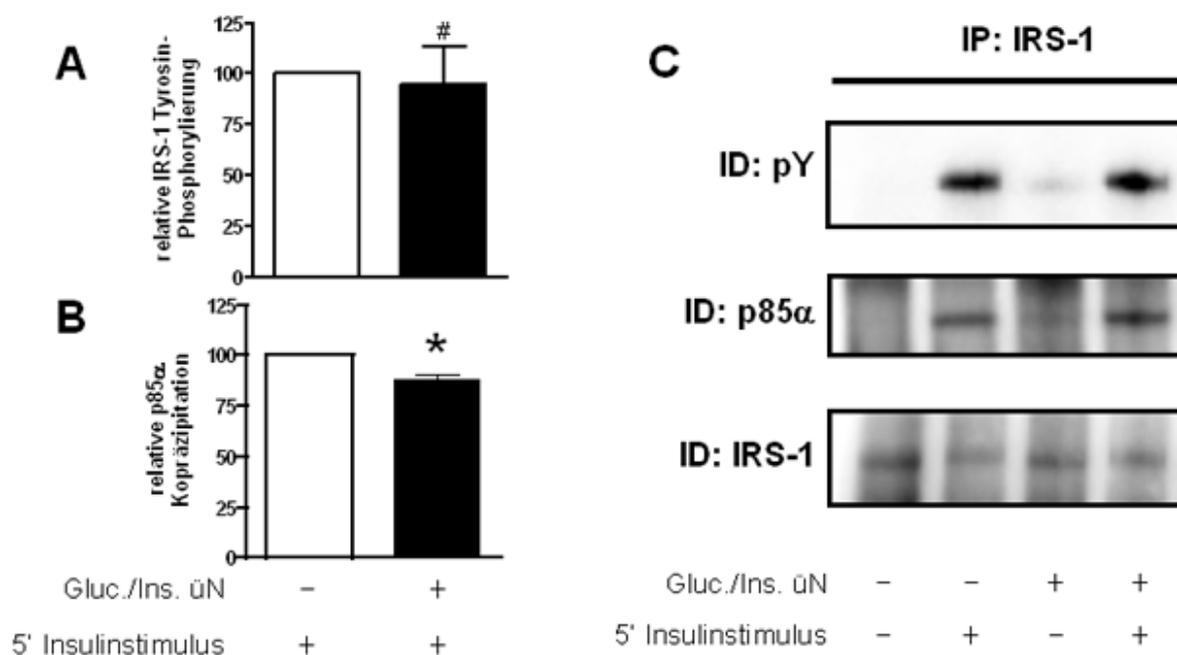


Abb. 37 Signalweiterleitung auf der Ebene von IRS-1

Die Induktion der Insulinresistenz mit 100 nM Insulin und 20,5 mM Glucose erfolgte wie in Abb. 33 beschrieben. Nach einer Solubilisierung mit RIPA Puffer wurden jeweils 400 µg der Zellysate für eine Immunopräzipitation mit Anti-IRS-1 Antikörper über Nacht bei 4°C eingesetzt. Die Immunokomplexe wurden für 2 h bei Raumtemperatur mit Protein A-Trisacryl inkubiert. Die Präzipitate wurden mit PBS gewaschen, mit Laemmli-Probenpuffer denaturiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. (A) Nach der Immunodetektion mit Anti-Phosphotyrosin Antikörper (PY99) und Anti-IRS-1 Antikörper folgte die Quantifizierung der IRS-1 Tyrosinphosphorylierung mit der Lumilmager Software. Dabei wurde der insulinstimulierte Kontrollwert gleich 100% gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM aus 4 unabhängigen Experimenten. # = kein signifikanter Unterschied. (B) Nach der Immunodetektion mit Anti-p85α Antikörper und Anti-IRS-1 Antikörper folgte die Auswertung mit dem Lumilmager. Die Interaktion zwischen IRS-1 und PI3-Kinase wurde anhand der mit IRS-1 kopräzipitierten Menge der p85α Unter-einheit bestimmt. Dabei wurde der insulinstimulierte Kontrollwert gleich 100% gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM aus 4 unabhängigen Experimenten. * = p<0,05. (C) Ein repräsentativer Immunoblot dient der Veranschaulichung der unter (A) und (B) gezeigten Daten.

3.3.4 Auswirkungen der induzierten Resistenz auf die PDK1

Um die Auswirkungen der Resistenzinduktion auf die Weiterleitung des Insulinsignals zur Akt untersuchen zu können, wurde die Aktivität der Signalkaskade auf der Ebene der Phosphatidylinositol-abhängigen Kinase überprüft. PDK1 liegt in der Signalkaskade unmittelbar stromaufwärts der Akt und ist für ihre Aktivierung verantwortlich. Es

konnte keine Veränderung der PDK1 Phosphorylierung nach der Resistenzinduktion beobachtet werden (Abb. 38). Auch die Expression der PDK1 blieb konstant (Daten nicht gezeigt).

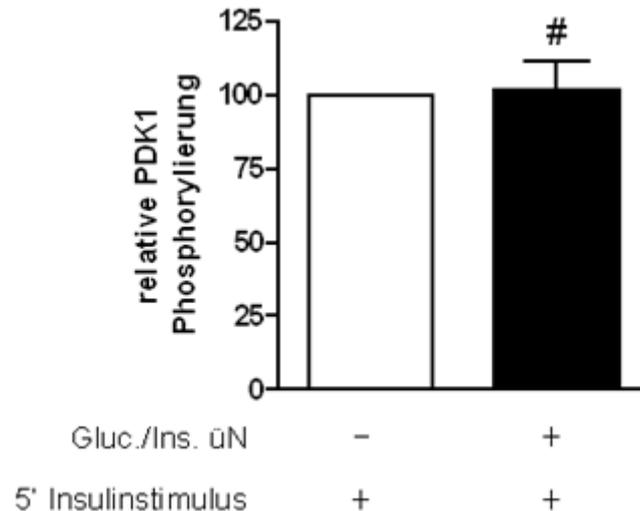


Abb. 38 Unveränderte PDK1 Phosphorylierung nach Resistenzinduktion

Die Induktion der Insulinresistenz mit 100 nM Insulin und 20,5 mM Glucose sowie die Aufarbeitung der Proben erfolgte wie in Abb. 33 beschrieben. Jeweils 5 µg der Zellysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und einer Immunodetektion mit Anti-Phospho-PDK1 und Anti-PDK1 Antikörper unterzogen. Der insulinstimulierte Kontrollwert wurde gleich 100% gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM aus 5 unabhängigen Experimenten. # = kein signifikanter Unterschied.

3.3.5 Effekte hoher Glucose- und Insulinmengen auf die GSK3 Phosphorylierung

Als nächstes sollte erforscht werden, ob die auf der Akt-Ebene erstmalig auftretende Insulinresistenz die stromabwärts liegenden Signalwege beeinträchtigt. Um die Auswirkung der mittels Glucose und Insulin induzierten Resistenz auf die Glycogensynthese zu untersuchen wurde die Phosphorylierung der GSK3 gemessen. Die basale GSK3 Phosphorylierung blieb auch nach der Resistenzinduktion unverändert, während die insulinabhängige GSK3 Phosphorylierung nach der 18stündigen Behandlung mit Glucose und Insulin deutlich abnahm. Verglichen mit unbehandelter Kontrolle konnte hier ein Rückgang um 50% beobachtet werden. Die Expression der GSK3α und GSK3β blieb dabei unverändert (Abb. 39).

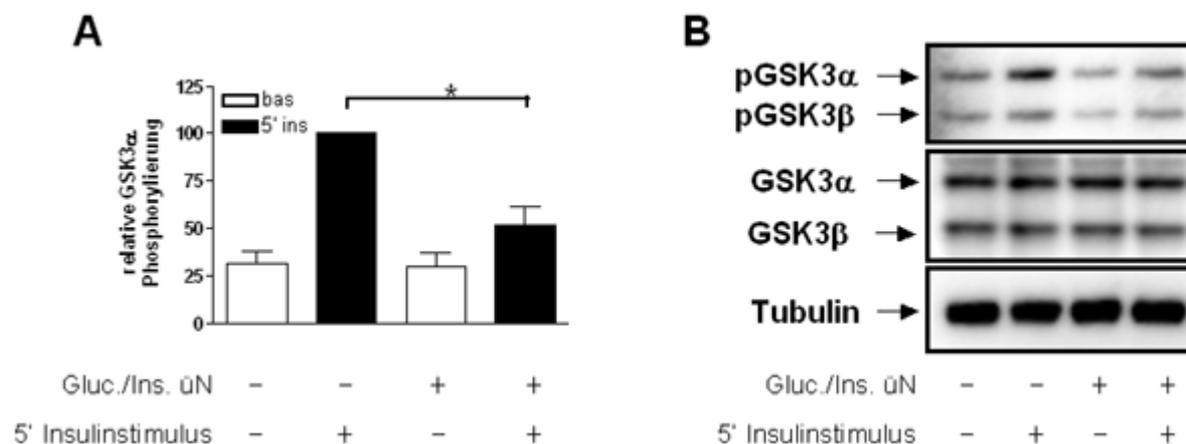


Abb. 39 Insulinresistenz auf der Ebene der GSK3

Die Induktion der Insulinresistenz mit 100 nM Insulin und 20,5 mM Glucose erfolgte wie in Abb. 33 beschrieben. Jeweils 5 μ g der Zellysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und einer Immunodetektion mit spezifischen Anti-Phospho-GSK3; Anti-GSK3 und Anti-Tubulin Antikörpern unterzogen. Bei der Quantifizierung der Phosphorylierung von GSK3 α wurde die Tubulin-Detektion zur Normierung der Daten verwendet. Der insulinstimulierte Kontrollwert wurde gleich 100% gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus 5 unabhängigen Experimenten sowie ein repräsentativer Immunoblot. bas = basal; 5' ins = insulinstimuliert; * = $p < 0,05$.

3.3.6 Effekte hoher Glucose- und Insulinmengen auf die GLUT4 Translokation

Zur Bestimmung der insulinvermittelten Steigerung der zellulären Glucoseaufnahme wurde die Translokation von insulinabhängigem Glucosetransporter 4 zur Plasmamembran gemessen. Um die GLUT4 Translokation in H9c2-E2 Myoblasten quantifizieren zu können, wurde hier wie in Kapitel 3.2.8 beschrieben eine transiente Transfektion mit pCMV GLUT4myc durchgeführt.

Nach 24 h Überexpression wurden die Zellen über Nacht im serumfreien Medium wahlweise mit / ohne 100 nM Insulin und 20,5 mM Glucose inkubiert. Die unbehandelten Zellen zeigten eine insulinstimulierte Zunahme der GLUT4-Translokation um ca. 50% verglichen mit dem Basalzustand. Nach der Resistenzinduktion blieb die basale Menge des membranständigen GLUT4 unverändert, während eine signifikante Reduktion der insulinvermittelten Translokation von GLUT4 beobachtet werden konnte (Abb. 40).

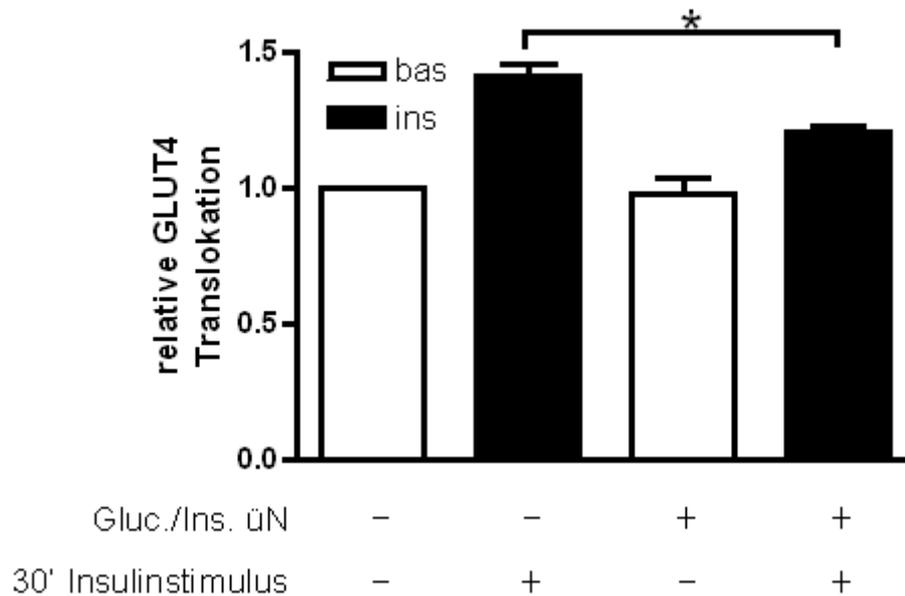


Abb. 40 Translokation von GLUT4 Vesikeln

Jeweils $3,5 \times 10^4$ H9c2-E2 Zellen wurden in 12-Well-Platten mittels FuGENE6 mit $0,5 \mu\text{g}$ pCMV GLUT4myc transient transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden H9c2-E2 Zellen zur Induktion der Insulinresistenz über Nacht im serumfreien DMEM mit 100 nM Insulin und 20,5 mM Glucose behandelt. Nach zweifachem Waschen mit PBS gefolgt von einer einstündigen serumfreien Inkubation in DMEM wurden die Zellen weitere 30 min mit $1 \mu\text{M}$ Insulin stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit 2% Paraformaldehydlösung fixiert, 1 h in PBS mit 5% Magermilchpulver blockiert und für 2 h mit einem Anti-Myc Antikörper (1:200) inkubiert. Es folgte eine einstündige Inkubation mit dem sekundären Anti-Maus [^{125}J] Antikörper ($0,1 \mu\text{Ci}$ pro Well). Nach Solubilisierung in 1% SDS wurde die Radioaktivität der Proben im γ -Counter bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten, als Referenz dient der unbehandelte Basalwert. bas = basal; ins = insulinstimuliert; * $p < 0,05$.

3.3.7 Inhibierung von Serinkinasen im Resistenzmodell

Mittels spezifischer Inhibitoren sollte geprüft werden, ob die induzierte Insulinresistenz durch die inflammatorischen Kinasen IKK beziehungsweise die c-Jun NH_2 -terminale Kinase (JNK) verursacht wird. Auch weitere, nicht inflammatorische resistenzerzeugende Mechanismen sollten überprüft werden. Möglicherweise wird hier der natürliche negative Rückkopplungsmechanismus zur Signallöschung stark aktiviert, was erwartungsgemäß zu einer Insulinresistenz führen könnte. So wäre eine übermäßige Aktivierung von GSK3, mTOR oder der PKC durch hohe Glucose- und Insulinspiegel denkbar.

3.3.7.1 IKK

Mit einem hochspezifischen Inhibitor (36) wurde die IKK während der Resistenzinduktion gehemmt. Die Inhibitorzugabe erfolgte dabei eine Stunde vor Zugabe von Glucose und Insulin. Die Insulinresistenz auf der Ebene der Akt Phosphorylierung blieb dennoch unverändert (Abb. 41), was gegen eine Beteiligung von IKK an der Resistenzauslösung spricht.

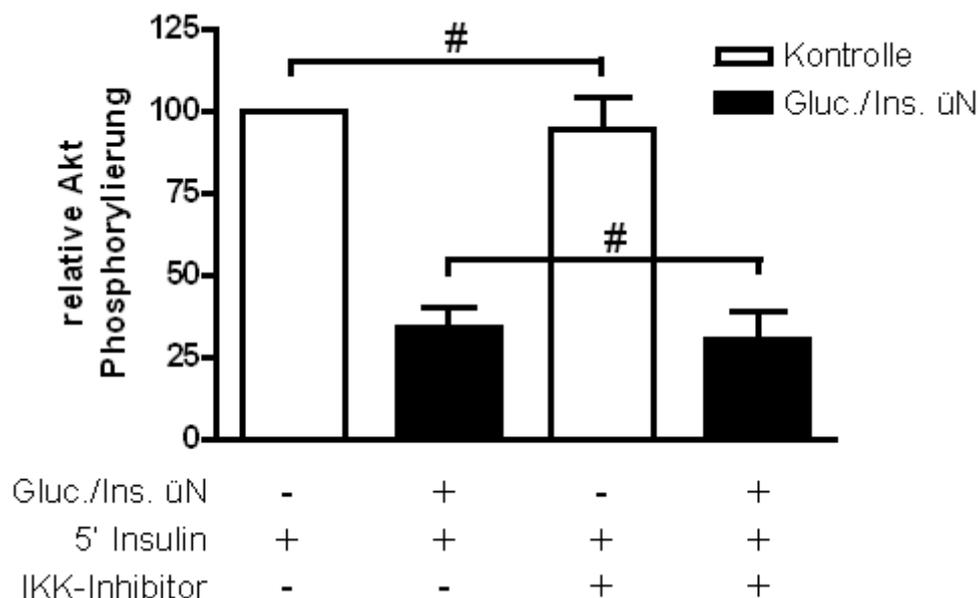


Abb. 41 Inhibierung der IKK im Zellmodell

Die Induktion der Insulinresistenz mit 100 nM Insulin und 20,5 mM Glucose erfolgte wie in Abb. 33 beschrieben. Um eine Hemmung der IKK zu erreichen wurden die Zellen mit einem selektiven IKK Inhibitor (10 µM) während der Resistenzinduktion behandelt. Die Zugabe des Inhibitors erfolgte dabei bereits 1 h vor Zugabe von Glucose und Insulin über Nacht. Nach zweifachem Waschen mit PBS gefolgt von einer einstündigen serumfreien Inkubation in DMEM wurden die Zellen einem akuten Insulinstimulus mit 100 nM Insulin ausgesetzt. Jeweils 5 µg der Zellysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und einer Immunodetektion mit spezifischen Anti-Phospho-Akt (Ser473) und Anti-Tubulin Antikörpern unterzogen. Bei der Quantifizierung der Phosphorylierung von Akt wurde die Tubulin-Detektion zur Normierung der Daten verwendet. Der insulinstimulierte Kontrollwert wurde gleich 100% gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM aus 4 unabhängigen Experimenten. # = kein signifikanter Unterschied.

3.3.7.2 JNK

Mit Hilfe selektiver Inhibierung sollte im Folgenden eine mögliche Beteiligung der Stress-aktivierten Proteinkinase JNK an der Resistenzentstehung untersucht werden. Der benötigte Inhibitor wurde von der Firma Aventis zur Verfügung gestellt. Er wurde

im zehnfachen Überschuß (20 µM) bezogen auf seine halbmaximal wirksame Konzentration (IC50; 1-3 µM) eingesetzt. Auch in diesem Fall konnte die induzierte Resistenz auf der Akt-Ebene nicht verhindert werden (Abb. 42).

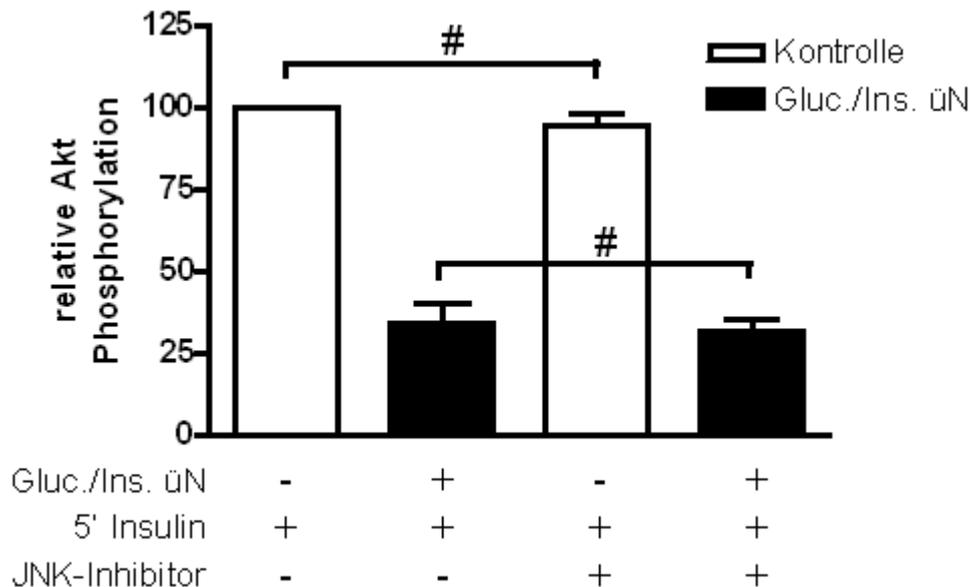


Abb. 42 Inhibierung der JNK im Zellmodell

Die Induktion der Insulinresistenz mit 100 nM Insulin und 20,5 mM Glucose erfolgte wie in Abb. 33 beschrieben. Um eine Hemmung der JNK zu erreichen wurden die Zellen mit einem selektiven JNK Inhibitor (20 µM) während der Resistenzinduktion behandelt. Die Zugabe des Inhibitors erfolgte dabei bereits 1 h vor Zugabe von Glucose und Insulin über Nacht. Nach zweifachem Waschen mit PBS gefolgt von einer einstündigen serumfreien Inkubation in DMEM wurden die Zellen einem akuten Insulinstimulus mit 100 nM Insulin ausgesetzt. Jeweils 5 µg der Zellysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und einer Immunodetektion mit spezifischen Anti-Phospho-Akt (Ser473) und Anti-Tubulin Antikörpern unterzogen. Bei der Quantifizierung der Phosphorylierung von Akt wurde die Tubulin-Detektion zur Normierung der Daten verwendet. Der insulinstimulierte Kontrollwert wurde gleich 100% gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM aus 3 unabhängigen Experimenten. # = kein signifikanter Unterschied.

3.3.7.3 GSK3

Da die Beteiligung der inflammatorischen Kinasen IKK und JNK an der Resistenzentstehung in diesem Modell ausgeschlossen werden konnte, sollte eine mögliche Signalmodulation durch stromabwärts der Akt liegende Kinasen überprüft werden. Da in aktuellen Publikationen eine Hemmung der Insulinsignalkaskade durch die GSK3 beschrieben wurde, sollen zunächst die Auswirkungen einer selektiven GSK3-Inhibierung untersucht werden. Der verwendete Inhibitor wurde freundlicherweise von der Firma Aventis zur Verfügung gestellt. Die Substanz verursacht eine 50%ige

Hemmung der GSK3 bei einer Konzentration von ca. 50 nM (IC₅₀) und wurde in der Konzentration von 500 nM eingesetzt. Die Zugabe des Inhibitors erfolgte auch in diesem Fall eine Stunde vor Beginn der über-Nacht Inkubation mit hohen Glucose- und Insulinmengen (Abb. 43). Hemmung der GSK3 bewirkte keine signifikante Änderung der Resistenzerzeugung. Dieses Ergebnis konnte auch nach einer Hemmung der GSK3 mit 10 mM LiCl reproduziert werden (Daten nicht gezeigt).

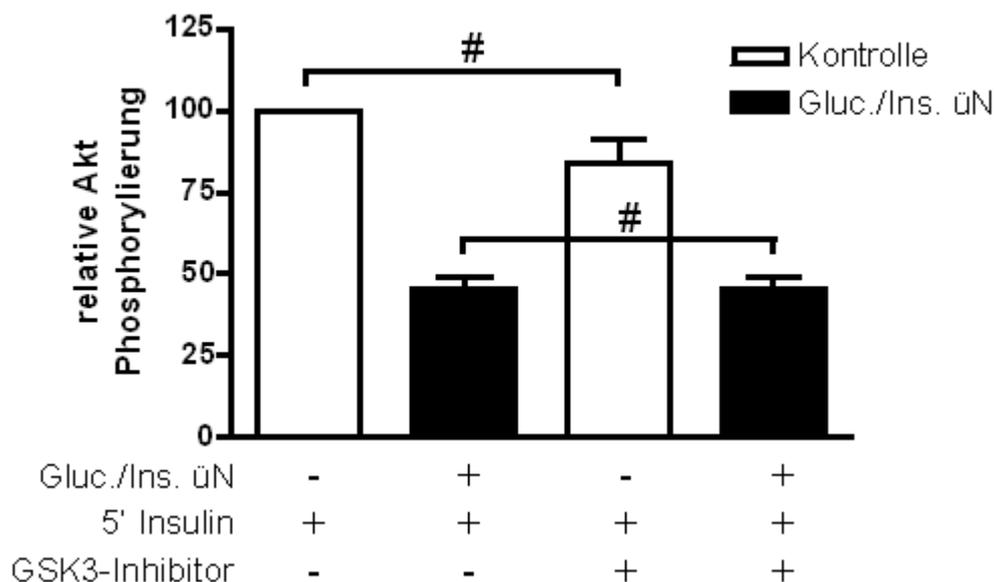


Abb. 43 Inhibierung der GSK3 im Zellmodell

Die Induktion der Insulinresistenz mit 100 nM Insulin und 20,5 mM Glucose erfolgte wie in Abb. 33 beschrieben. Um eine Hemmung der GSK3 zu erreichen wurden die Zellen mit einem selektiven GSK3 Inhibitor (0,5 µM) während der Resistenzinduktion behandelt. Die Zugabe des Inhibitors erfolgte dabei bereits 1 h vor Zugabe von Glucose und Insulin über Nacht. Nach zweifachem Waschen mit PBS gefolgt von einer einstündigen serumfreien Inkubation in DMEM wurden die Zellen einem akuten Insulinstimulus mit 100 nM Insulin ausgesetzt. Jeweils 5 µg der Zellysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und einer Immunodetektion mit spezifischen Anti-Phospho-Akt (Ser473) und Anti-Tubulin Antikörpern unterzogen. Bei der Quantifizierung der Phosphorylierung von Akt wurde die Tubulin-Detektion zur Normierung der Daten verwendet. Der insulinstimulierte Kontrollwert wurde gleich 100% gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM aus 4 unabhängigen Experimenten. # = kein signifikanter Unterschied.

3.3.7.4 mTOR

Eine weitere Proteinkinase, die als Ursache für eine Signalhemmung über negative Rückkopplung diskutiert wird, ist mTOR („mammalian target of rapamycin“). mTOR wird von der Akt im Zuge der Zellwachstum-Regulation aktiviert und ist eines der zentralen Proteine der Zellzyklus-Kontrolle. Eine Inhibierung der mTOR-Aktivität mit

Rapamycin (Abb. 44) verhinderte jedoch nicht die mit Glucose und Insulin ausgelöste Hemmung des Insulinsignals.

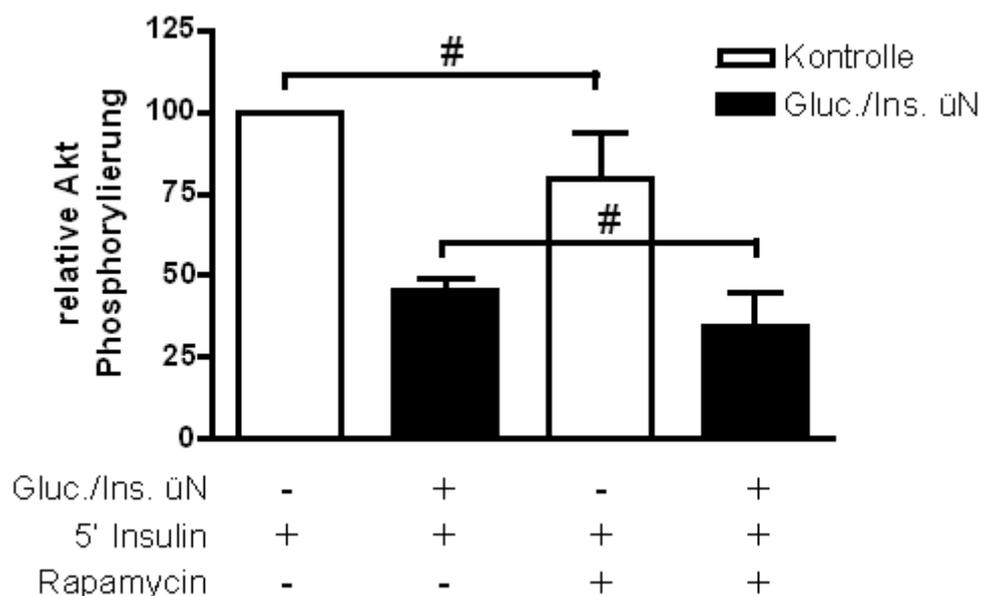


Abb. 44 Inhibierung von mTOR im Zellmodell

Die Induktion der Insulinresistenz mit 100 nM Insulin und 20,5 mM Glucose erfolgte wie in Abb. 33 beschrieben. Um eine Hemmung der IKK zu erreichen wurden die Zellen mit Rapamycin (10 μ M) während der Resistenzinduktion behandelt. Die Zugabe von Rapamycin erfolgte dabei bereits 1 h vor Zugabe von Glucose und Insulin über Nacht. Nach zweifachem Waschen mit PBS gefolgt von einer einstündigen serumfreien Inkubation in DMEM wurden die Zellen einem akuten Insulinstimulus mit 100 nM Insulin ausgesetzt. Jeweils 5 μ g der Zellysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und einer Immunodetektion mit spezifischen Anti-Phospho-Akt (Ser473) und Anti-Tubulin Antikörpern unterzogen. Bei der Quantifizierung der Phosphorylierung von Akt wurde die Tubulin-Detektion zur Normierung der Daten verwendet. Der insulinstimulierte Kontrollwert wurde gleich 100% gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus 3 unabhängigen Experimenten. # = kein signifikanter Unterschied.

3.3.7.5 PKC

Bisindolylmaleimid IX (BIM IX; Ro 31-8220) ist ein Staurosporin-Derivat, das üblicherweise zur Inhibierung der Proteinkinase C eingesetzt wird. Es inhibiert selektiv konventionelle (α , β , γ) und neue (δ , ϵ , η) PKC-Isoformen mit einer 50%igen Hemmung bereits bei Konzentrationen von 20-100 nM (IC₅₀). Eine Inhibierung der atypischen PKC ζ erfolgt dagegen mit einem IC₅₀ von ca. 1-4 μ g (153). Unabhängig von seiner inhibitorischen Funktion im Bezug auf PKC trägt das Bisindolylmaleimid IX zur Induktion von Apoptose (66) und Aktivierung der JNK (148) bei. Um eine Hemmung

von konventionellen, neuen und atypischen PKC-Isoformen zu gewährleisten, wurde 10 μ M Ro 31-8220 eingesetzt (Abb. 45).

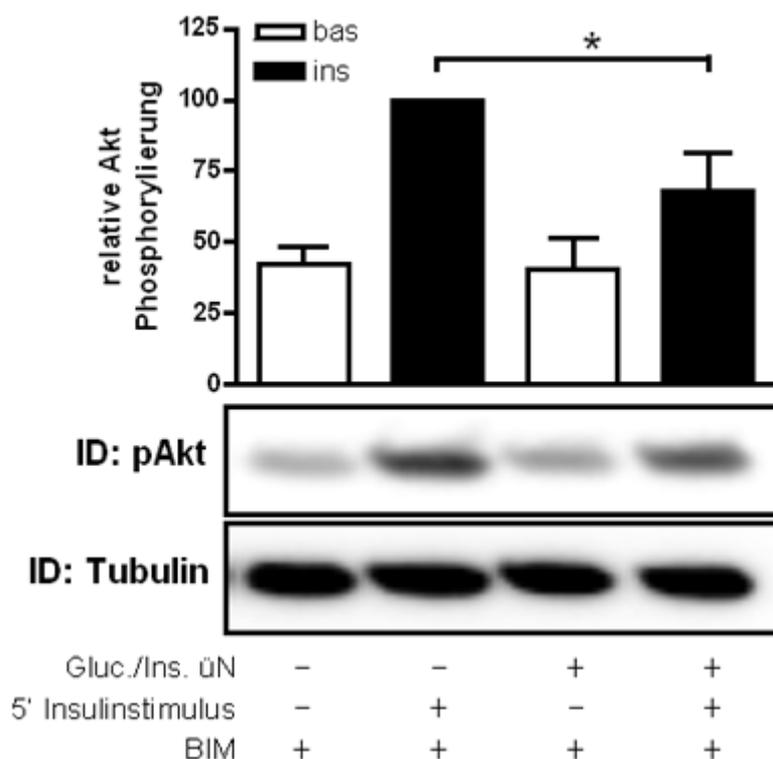


Abb. 45 Inhibierung der PKC-Subtypen mittels Ro 31-8220 (BIM)

Die Induktion der Insulinresistenz mit 100 nM Insulin und 20,5 mM Glucose erfolgte wie in Abb. 33 beschrieben. Um eine Hemmung der PKC-Isoformen zu erreichen wurden die Zellen mit dem PKC Inhibitor Ro 31-8220 (10 μ M) während der Resistenzinduktion behandelt. Die Zugabe des Inhibitors erfolgte dabei bereits 1 h vor Zugabe von Glucose und Insulin über Nacht. Nach zweifachem Waschen mit PBS gefolgt von einer einstündigen, serumfreien Inkubation in DMEM wurden die Zellen einem akuten Insulinstimulus mit 100 nM Insulin ausgesetzt. Jeweils 5 μ g der Zellysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und einer Immunodetektion mit spezifischen Anti-Phospho-Akt (Ser473) und Anti-Tubulin Antikörpern unterzogen. Bei der Quantifizierung der Phosphorylierung von Akt wurde die Tubulin-Detektion zur Normierung der Daten verwendet. Die insulinstimulierte Akt Phosphorylierung nach BIM Behandlung ohne gleichzeitige Resistenzinduktion wurde gleich 100% gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus 3 unabhängigen Experimenten sowie ein repräsentativer Immunoblot. BIM = Bisindolylmaleimid IX; bas = basal; ins = insulinstimuliert; * $p < 0,05$.

Die Anwendung von Ro 31-8220 führte im basalen und insulinstimulierten Zustand zu einer enormen Steigerung der Akt Phosphorylierung verglichen mit unbehandelter Kontrolle, möglicherweise als Gegenregulation zu der von Ro 31-8220 induzierten Apoptose (Daten nicht gezeigt). Trotz der insgesamt gestiegenen Phosphorylierungslevel der Akt konnte eine Glucose/Insulin vermittelte relative Abnahme der

insulinabhängigen Akt Phosphorylierung nicht durch Ro 31-8220 verhindert werden (Abb. 45).

3.3.8 Aktivierung transient überexprimierter PKC ζ im Resistenzmodell

Die atypische Proteinkinase C ζ Isoform wurde in der Literatur wiederholt als negativer Regulator der Insulinsignalkaskade diskutiert. Um den Einfluss von PKC ζ auf die induzierte Insulinresistenz genauer zu untersuchen wurde das Protein in der verwendeten Myoblasten-Zelllinie adenoviral überexprimiert. Die hierfür benötigten rekombinanten Adenoviren wurden von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Robert V. Farese, Florida, USA, zur Verfügung gestellt. Das Virus wurde in einem geeigneten S2-Zellkulturlabor amplifiziert, auf Rekombinationsdefizienz getestet und zur Infektion der Myoblasten in der Konzentration von 50 Viren pro Zelle eingesetzt. Im Vorexperiment wurde zunächst die Insulinsensitivität der überexprimierten PKC ζ überprüft. Ein deutlicher und anhaltender Anstieg der Phosphorylierung konnte bereits nach 15 min beobachtet werden (Abb. 46).

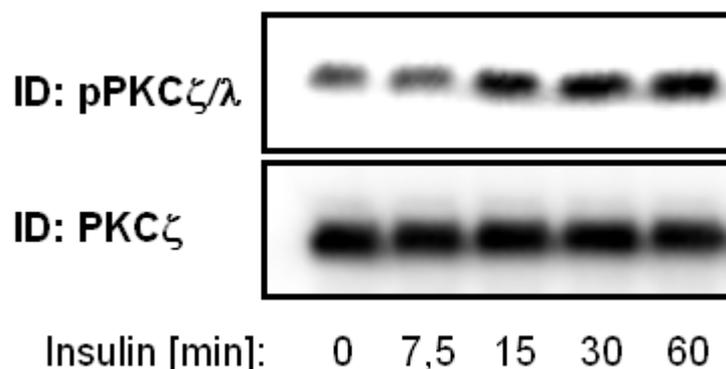


Abb. 46 Aktivierung transient überexprimierter PKC ζ durch Insulin

H9c2-E2 Zellen wurden mit einem PKC ζ überexprimierendem Adenovirus mit einer MOI von 50 Viren pro Zelle infiziert. Nach 24 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen, 1 h im serumfreien DMEM inkubiert und für angegebene Zeit mit 100 nM Insulin stimuliert. Jeweils 5 μ g der Zellysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und einer Immunodetektion mit spezifischen Anti-Phospho-PKC ζ/λ und Anti- PKC ζ Antikörpern unterzogen. Dargestellt ist ein repräsentativer Immunoblot.

Anschliessend wurden die Auswirkungen der PKC ζ -Überexpression im Resistenzmodell untersucht. Zur Kontrolle dienten mit einem nicht-exprimierenden „mock“

Adenovirus infizierte Zellen. Die Resistenzinduktion mit Glucose und Insulin begann 24 h nach der Infektion. Die Überexpression von PKC ζ hatte keinerlei Auswirkung auf die Akt Phosphorylierung, die auf der Akt-Ebene induzierte Insulinresistenz wurde weder verstärkt noch geschwächt (Abb. 47).

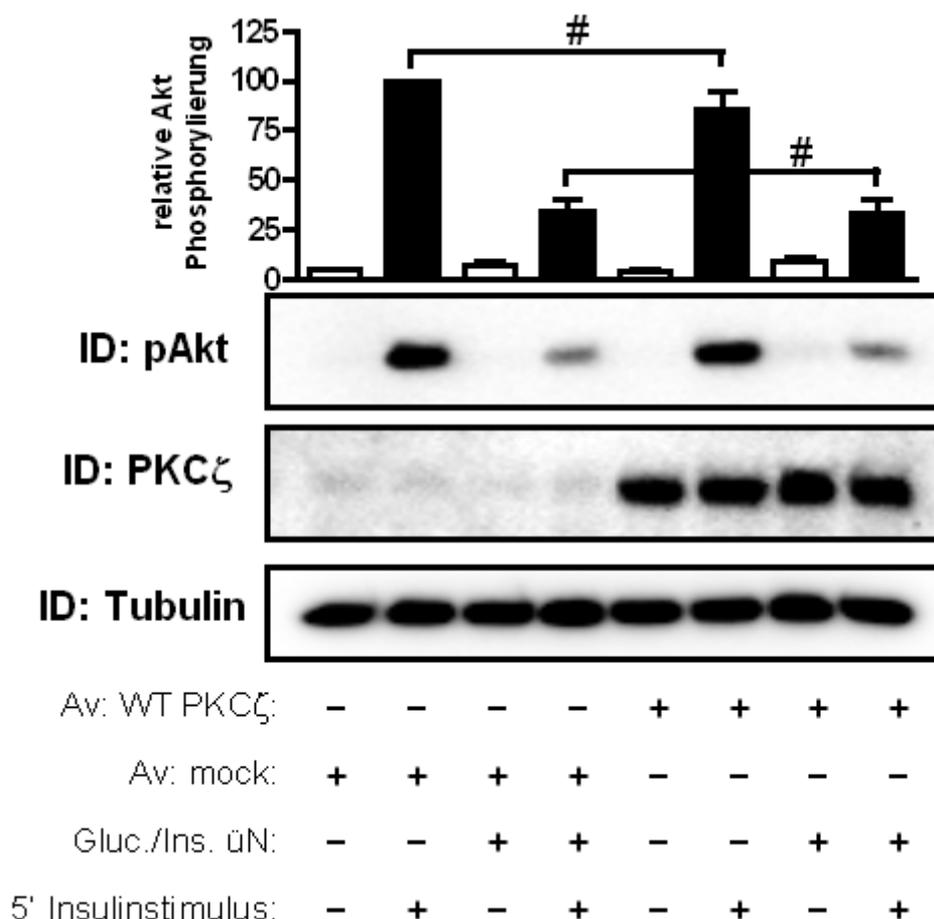


Abb. 47 Transiente Überexpression von PKC ζ im Resistenzmodell

H9c2-E2 Zellen wurden mit einem PKC ζ überexprimierendem Adenovirus bzw. einem nicht-exprimierendem Kontrollvirus (mock) mit einer MOI von 50 Viren pro Zelle infiziert. Nach 24 h folgte die Resistenzinduktion mit 100 nM Insulin und 20,5 mM Glucose über Nacht wie in Abb. 33 beschrieben. Nach zweifachem Waschen mit PBS gefolgt von einer einstündigen serumfreien Inkubation in DMEM wurden die Zellen einem akuten Insulinstimulus mit 100 nM Insulin ausgesetzt. Jeweils 5 μ g der Zellysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und einer Immunodetektion mit spezifischen Anti-PKC ζ , Anti-Phospho-Akt (Ser473) und Anti-Tubulin Antikörpern unterzogen. Die Detektion von Tubulin diente der Normierung. Quantifizierung der Akt Phosphorylierung wurde mit der Lumi-Imager Software durchgeführt. Der insulinstimulierte Kontrollwert wurde gleich 100% gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus 3 unabhängigen Experimenten sowie ein repräsentativer Immunoblot.

3.3.9 Inhibierung von Hsp90 im Resistenzmodell

Hitzeschock Protein 90 (Hsp90) ist ein zelluläres Chaperon (172;186). Hsp90 bindet eine Reihe von Klient-Proteinen und trägt dazu bei, ihre aktive Konformation zu stabilisieren (131). Zu seinen Substraten gehören zahlreiche Proteine verschiedener zellulärer Signalwege (191), unter anderem auch Akt. Das Hsp90 liegt zellulär als Komplex mit Akt vor und bewirkt die Stabilisierung des Akt-Proteins (17). Neuere Untersuchungen legen nahe, dass das Hsp90 möglicherweise neben der Stabilität auch die Aktivität seiner Klient-Proteine moduliert (140), insbesondere eine im Hsp90-Komplex veränderte räumliche Exposition der Substrate gegenüber interagierenden Proteinen (192) und eine beschleunigte Dephosphorylierung der gebundenen Hsp90 – Substrate (185;189) wurde in diesem Zusammenhang diskutiert. Die Bedeutung dieser zellulären Signalmodulation im Kontext der Insulinresistenz wurde bisher nicht untersucht.

Zur Auslösung einer Insulinresistenz wurden subkonfluente Monolayer der Muskelzelllinie H9c2-E2 über Nacht mit jeweils 100 nM Insulin und 20,5 mM Glucose inkubiert. Anschliessend wurden die Zellen zweimal gewaschen und nach einstündiger, serumfreier Inkubation einem 5-minütigen Insulinstimulus (100 nM) ausgesetzt. Die Inhibierung des Hsp90 erfolgte mittels 30-minütiger Inkubation der Zellen mit 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG). Dieser niedermolekulare Inhibitor bindet an die ATP-Bindestelle in der aminoterminalen Domäne des Hsp90 (187), hemmt seine Funktion und führt dadurch langfristig zur Degradation der Klient-Proteine (8;61).

Eine kurzfristige Hemmung des Hsp90 mit 17-AAG erhöhte die insulinbedingte Akt Phosphorylierung der unbehandelten Kontrolle an Serin 473 um ca. 30% (Abb. 48 A). Im Resistenzmodell führte die Geldanamycin-Behandlung zu einer Verdopplung der Akt Phosphorylierung an Serin 473, die dadurch von ca. 40% auf ca. 80% verglichen mit der nicht resistenten Kontrollsituation anstieg. Die insulinabhängige Phosphorylierung von Akt an Threonin 308 wurde im Resistenzmodell nach 17-AAG Behandlung sogar vollständig wiederhergestellt, von ca. 20% des Kontrollwertes auf 100%, das entspricht einer Verfünffachung (Abb. 48 B).

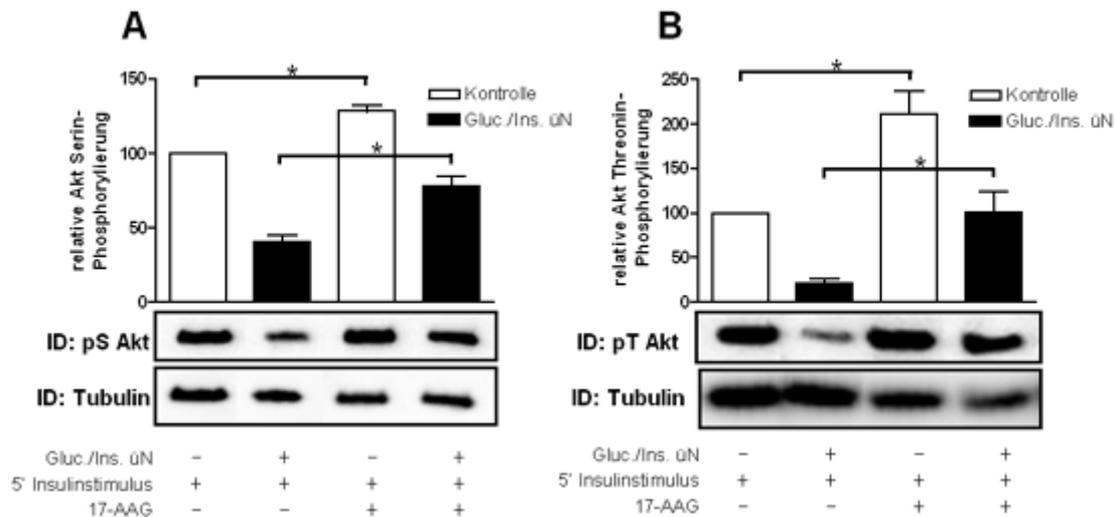


Abb. 48 Inhibierung von Hsp90 im Resistenzmodell

Die Induktion der Insulinresistenz mit 100 nM Insulin und 20,5 mM Glucose erfolgte wie in Abb. 33 beschrieben. Um eine Inhibierung von Hsp90 zu erreichen wurden die Zellen mit 17-AAG (1 µg/ml) für 30 min unmittelbar vor dem akuten Insulinstimulus behandelt. Jeweils 5 µg der Zellysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und einer Immunodetektion mit (A) Anti-Phospho-Akt (Ser473) und (B) Anti-Phospho-Akt (Thr308) Antikörpern unterzogen. Bei der Quantifizierung der Phosphorylierung von Akt wurde die Tubulin-Detektion zur Normierung der Daten verwendet. Der insulinstimulierte Kontrollwert wurde jeweils gleich 100% gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM aus 7 (A) beziehungsweise 5 (B) unabhängigen Experimenten sowie jeweils ein repräsentativer Immunoblot. * = p<0,05.

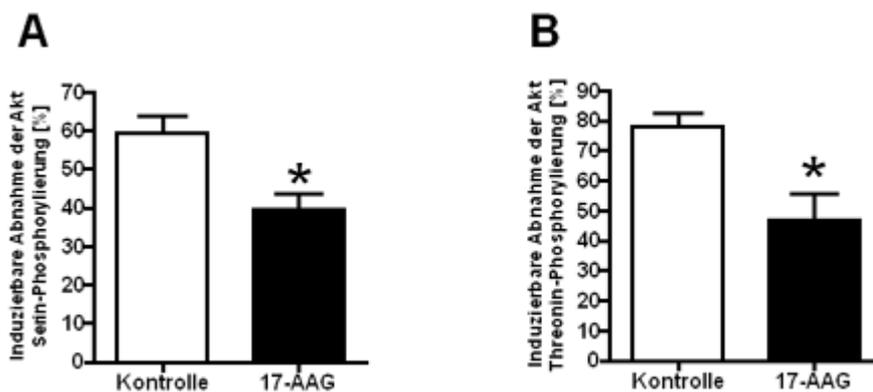


Abb. 49 Abnahme der induzierbaren Insulinresistenz nach Inhibierung von Hsp90

Gezeigt sind die Daten aus Abb. 48 in einer anderen Darstellungsweise: die induzierbare Abnahme der Akt Serin- und Threoninphosphorylierung (mit/ohne Hsp90 Inhibierung) wurde prozentual angegeben.

In der nicht resistenten Kontrollsituation stieg die Phosphorylierung von Threonin 308 dagegen nur um Faktor 2 an. Insgesamt nahm die durch Glucose- und Insulinbe-

handlung auf der Ebene von Akt induzierbare Insulinresistenz unter Einfluss von 17-AAG signifikant ab (Abb. 49).

3.3.10 Messung der Dephosphorylierungsrate im Resistenzmodell

Da das Hsp90 möglicherweise die Exposition der Akt gegenüber Phosphatasen verstärkt und dadurch die Signallöschung mittels verstärkter Dephosphorylierung des Proteins beschleunigt, wurde die Dephosphorylierungsrate von Akt jeweils in Anwesenheit und Abwesenheit des Hsp90 Inhibitors 17-AAG untersucht. Überprüft wurde hierbei die Akt-Dephosphorylierung in unbehandelten Kontrollen und nach erfolgter Resistenzinduktion.

Zu diesem Zweck wurde in Zellkultur nach unterschiedlicher Vorbehandlung die maximale Phosphorylierung von Akt durch einen Insulinstimulus induziert. Weitere Akt Phosphorylierung wurde anschliessend durch eine einminütige Behandlung mit dem PI3-Kinase Inhibitor LY294002 unterbunden, so dass in dieser Zeit nur noch Dephosphorylierung zu einer Veränderung der Phospho-Akt Menge führen konnte. Die Menge von phosphoryliertem Akt-Protein vor und nach der einminütigen Inhibierung der PI3-Kinase wurde als Masstab für die Geschwindigkeit der Dephosphorylierung ausgewertet.

In unbehandelten Kontrollzellen blieb nach einer Minute ca. ein Drittel der ursprünglich induzierten Akt Phosphorylierung erhalten. In Zellen, die zuvor einer Resistenzinduktion mittels Glucose und Insulin unterzogen wurden, war die initiale Akt Phosphorylierung erwartungsgemäss niedriger (siehe Abb. 33), von der niedrigeren Ausgangsmenge blieb aber anschliessend ebenfalls ca. ein Drittel erhalten. Eine Behandlung mit 17-AAG führte zu einer signifikanten Abnahme der Dephosphorylierung in nicht-resistenten Kontrollzellen (ca. 2/3 der Phosphorylierung war nach 1 min. noch vorhanden). Interessanterweise blieb dieser Effekt in resistenten Zellen aus, sie zeigten eine ähnliche Dephosphorylierungsrate, wie die unbehandelte Kontrolle. Da aber die Inhibierung von Hsp90 mit 17-AAG die Aktivität von Akt in resistenten Zellen deutlich stärker steigert, als in den unbehandelten Zellen, scheint es spezifisch unter

Resistenzbedingungen einen weiteren noch unbekanntem Mechanismus zu geben, über den Hsp90 die Akt-Funktion negativ moduliert.

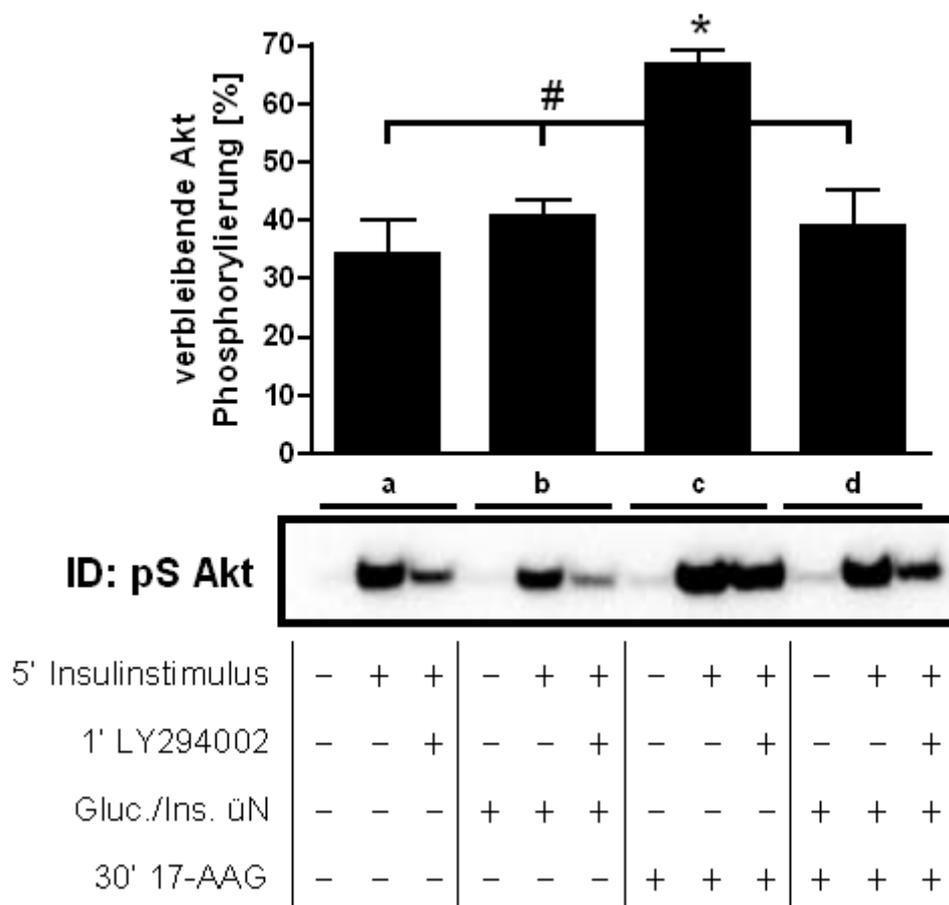


Abb. 50 Vergleich der Dephosphorylierungsraten von Akt

Die Induktion der Insulinresistenz mit 100 nM Insulin und 20,5 mM Glucose sowie die Inhibierung von Hsp90 mit 17-AAG (1 µg/ml) erfolgte wie in Abb. 48 beschrieben. Nach akutem Insulinstimulus mit 100 nM Insulin für 5 min folgte eine einminütige Behandlung mit dem PI3-Kinase Inhibitor LY294002 (50 µM). Jeweils 5 µg der Zellysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und einer Immunodetektion mit Anti-Phospho-Akt (Ser473) Antikörper unterzogen. Bei der Quantifizierung der verbleibenden Phosphorylierung von Akt wurde die Tubulin-Detektion zur Normierung der Daten verwendet. Der jeweilige insulinstimulierte Kontrollwert (a-d) wurde gleich 100% gesetzt, Die Auswertung zeigt die nach einminütiger PI3-K Inhibierung verbleibende Restphosphorylierung der Akt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM aus 3 unabhängigen Experimenten sowie ein repräsentativer Immunoblot. * = p<0,05; # = kein signifikanter Unterschied zu Kontrolle.

4 DISKUSSION

4.1 *In vitro* Phosphorylierung

4.1.1 PKC ζ

Das Insulinrezeptorsubstrat 1 (IRS-1) ist ein zentraler Bestandteil der Insulinsignalkaskade. Eine negative Modulation des Insulinsignals durch verstärkte Phosphorylierung von IRS-1 an Serin- und Threoninresten wurde mehrfach beschrieben (Übersichtsartikel: (20;169;180)). Inzwischen sind über 15 Serinkinasen identifiziert worden, welche *in vivo* oder *in vitro* das IRS-1 modifizieren können (vgl. dazu Abb. 3). Dazu gehören sowohl an der Insulinsignaltransduktion beteiligte Kinasen wie GSK3 (45;63) und PKC ζ (111;134;147), als auch beispielsweise die inflammatorische Kinase IKK (57) und die stress-aktivierte Proteinkinase JNK (2). Während IKK und JNK durch die mit Adipositas einhergehenden Entzündungsreaktionen und erhöhte TNF α Konzentrationen (2;31) übermässig aktiviert werden und die Insulinsignaltransduktion stören können, wird im Fall der Kinasen der Insulinsignalkaskade wie PKC ζ von einer Modulation der Signalweiterleitung über eine negative Rückkopplung ausgegangen. Demnach trägt die durch Insulin aktivierte PKC ζ zu einer Löschung des akuten Signals und somit zu einer Regeneration der Signalkaskade bei (106). Bei übermässiger Aktivierung der PKCs wäre eine Hemmung der Signaltransduktion über diesen Mechanismus vorstellbar. Eine Störung der insulin-abhängigen Tyrosinphosphorylierung des IRS-1 nach einer Überexpression der PKC ζ wurde 2001 beschrieben (134).

In vorangegangenen Arbeiten unserer Gruppe wurde eine *in vitro* Phosphorylierung von einem GST/IRS-1 Fusionsprotein durch die PKC ζ beschrieben und untersucht. Eine Hauptphosphorylierungsstelle an Serin 570 wurde mittels Massenspektrometrie identifiziert. In einem *in vitro* Assay wurde die inhibitorische Funktion der Phosphorylierung an Serin 570 erfolgreich demonstriert (147).

Da vorausgegangene Untersuchungen Hinweise auf weitere Phosphorylierungsstellen der PKC ζ innerhalb des IRS-1 Fusionsproteins ergaben, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Mutationsanalyse des Fusionsproteins durchgeführt. Anhand einer Konsensussequenz wurde das Serin 560 und das Threonin 534 ausgewählt und jeweils zu Alanin mutiert. Das mittels Massenspektrometrie als vermutliche Phosphorylierungsstelle identifizierte Serin 498 wurde ebenfalls zu Alanin mutiert. Da in den HPLC-Elutionsprofilen und autoradiographischen Analysen der Mutanten keine Abnahme der Phosphorylierung gegenüber dem Wildtyp festgestellt wurde, kann angenommen werden, dass es sich hierbei nicht um Hauptphosphorylierungsstellen handelt.

Da die HPLC-Profile dennoch einen Einbau von Phosphat belegen, der sich nicht alleine auf die bekannten und untersuchten Phosphorylierungsstellen zurückführen lässt, muss davon ausgegangen werden, dass weitere noch unbekannte Phosphorylierungsstellen der PKC ζ innerhalb des untersuchten Fusionsproteins vorliegen. Auch ausserhalb der in dieser Arbeit untersuchten IRS-1 Sequenz wurden PKC ζ Phosphorylierungsstellen identifiziert. Das Serin 318 des IRS-1 kann insulinabhängig von der PKC ζ phosphoryliert werden und trägt zu einer Abnahme der IR/IRS-1 Interaktion bei (111). In neueren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Mutation von Serin 318 zu Alanin eine Abnahme der akuten insulinabhängigen Akt Phosphorylierung zu Folge hat. Gleichzeitig wurde eine Störung der Signallöschung durch die Überexpression der Mutante beschrieben: 60 min nach Insulinstimulus konnte keine Reduktion der Akt Phosphorylierung beobachtet werden (174). Desweiteren führte nur Insulin, nicht aber die Gabe von TNF α und Glucose zu einer Phosphorylierung dieses Serins. Damit scheint eine initiale insulinabhängige Phosphorylierung von Serin 318 für das akute Insulinsignal zuträglich und zu seiner rechtzeitigen Abschaltung notwendig zu sein. Das Serin 318 ist somit ein Beispiel für eine Signalregulation durch die PKC ζ über die Mechanismen der negativen Rückkopplung.

Neben der PKC ζ werden auch weitere PKC Isoformen mit Entstehung der Insulinresistenz in Verbindung gebracht. So wurde kürzlich berichtet, dass eine hohe Konzentration von Glucose zu einer erhöhten PKC Aktivität und einer verminderten Glucoseaufnahme in Muskelzellen führt (30). Ausserdem konnte gezeigt werden,

dass eine Hemmung der konventionellen und neuen PKC Isoformen die Glucoseaufnahme in Muskelzellen diabetischer Ratten wiederherstellt (30). Eine Erhöhung der Aktivität der Insulinsignalkaskade wurde im Muskel und Fettgewebe von PKC α -KO Mäusen beschrieben (100). Gleichzeitig wurde eine PI3-Kinase unabhängige Aktivierung der PKC α im Muskel und in Adipocyten von Wildtyp Mäusen und Ratten gezeigt (100). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die PKC α an einer Regulierung der Signalkaskade über negativen Feedback beteiligt sein könnte, obwohl sie selbst nicht zu der Signalweiterleitung beiträgt.

Es wäre demnach vorstellbar, dass auch konventionelle PKC-Isoformen wie die PKC α das IRS-1 an dem als Phosphorylierungsstelle neu identifiziertem Serin 570 modifizieren können. Um diese Vermutung zu prüfen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein spezifisches Antiserum gegen die phosphorylierte Form des Serins 570 identifiziert. Anschliessende Untersuchungen des *in vitro* phosphorylierten IRS-1 Fusionsproteins im Immunoblot ergaben, dass das Serin 570 spezifisch von der atypischen PKC ζ , nicht aber von den konventionellen PKC-Isoformen α , β und γ phosphoryliert wird. Damit konnte das Serin 570 als hochspezifische Hauptphosphorylierungsstelle der PKC ζ bestätigt werden.

Interessanterweise wurde kürzlich eine Aktivierung der PKC α durch TNF α belegt (137). Eine Überexpression von PKC α in Myotuben verhinderte darüber hinaus die basale und insulinvermittelte Tyrosinphosphorylierung des Insulinrezeptors (137). Offenbar ist der Insulinrezeptor und nicht das IRS-1 das Zielprotein der PKC α , was mit der Beobachtung übereinstimmt, dass das IRS-1 Serin 570 von der PKC ζ , nicht aber von der PKC α phosphoryliert werden kann.

4.1.2 IKK

Ausgehend von den erfolgreichen Analysen der IRS-1 Phosphorylierung durch PKC ζ sollte eine mögliche Phosphorylierung des IRS-1 durch die IKK überprüft werden. In der Literatur wurde zuvor das Serin 307 als IKK Phosphorylierungsstelle beschrieben, weitere noch unbekannte Phosphorylierungsstellen innerhalb des IRS-1 wurden postuliert (57). Als ein möglicher Mechanismus der inhibitorischen Wirkung von

Serinkinasen wird eine Phosphorylierung von Serinen in der Nähe der Phospho-Tyrosin Bindenden Domäne des IRS-1 und damit eine Unterbrechung der IR/IRS-1 Interaktion diskutiert. Durch Mutation von 7 proximal zu der PTB Domäne liegenden Serinen zu Alaninen konnte eine aktive Konformation des IRS-1 auch nach längerer Insulinstimulation oder Behandlung mit resistenzauslösenden Substanzen wie Phorbolestern und freien Fettsäuren erhalten werden (105). Das Serin 307 befindet sich ebenfalls in der Nähe der PTB Domäne des IRS-1, seine Phosphorylierung stört die Interaktion von aktiviertem IR mit dem IRS-1 (3).

Neben der PTB-proximalen Serinphosphorylierung könnte auch eine Serinphosphorylierung des IRS-1 im Bereich der PI3-Kinase Bindestelle zur Insulinresistenz beitragen. Mögliche IKK Phosphorylierungsstellen im Bindungsbereich der SH2-Proteine könnten die Bindung von PI3-Kinase an das aktivierte IRS-1 verhindern und somit zu einer Störung der Signalweiterleitung führen. Aus diesem Grund wurde für folgende Untersuchungen ebenfalls das GST-Fusionsprotein verwendet, welches die Aminosäuren 449 bis 664 des IRS-1 der Ratte enthält. Da das Serin 307 in dieser Sequenz nicht enthalten ist, ist das Fragment zur Identifizierung neuer, noch unbekannter Phosphorylierungsstellen geeignet.

Mittels autoradiographischer Analysen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die IKK spezifisch sowohl das IRS-1 Fusionsprotein als auch ihr eigentliches Substrat, I κ B, *in vitro* phosphoryliert. Eine IKK-vermittelte Phosphorylierung des GST Anteils konnte ausgeschlossen werden. Eine selektive Phosphorylierung des IRS-1 Anteils des Fusionsproteins konnte auch für die rekombinante, trunkierte MEKK1 gezeigt werden.

In analysiertem Bereich des IRS-1 befinden sich 35 potentielle Phosphorylierungsstellen: 23 Serine und 12 Threonine. Um die Lokalisierung der IKK Phosphorylierungsstellen auf einzelne Peptide eingrenzen zu können, wurde das *in vitro* unter Zugabe von [γ -³²P]ATP phosphorylierte Fusionsprotein tryptisch gespalten. Die resultierenden Peptide wurden einer Anionenaustausch-Chromatographie unterzogen. Ein Vergleich des Elutionsprofils mit der bereits vorhandenen Phosphopeptidkartierung für eine Phosphorylierung mit PKC ζ ergab eine teilweise Übereinstim-

mung. So konnten die für PKC ζ bekannten Peaks 1, 3, 5 und 6 auch in den mit IKK phosphorylierten Proben identifiziert werden. Peaks 2 und 4 fehlten dagegen vollständig im IKK-Profil, so dass eine Phosphorylierung im Bereich der unter Peak 2 und 4 eluierenden Peptide durch die IKK als extrem unwahrscheinlich angesehen werden kann. Auf diese Weise konnten 9 potentielle Phosphorylierungsstellen ausgeschlossen werden. Die Phosphorylierung konnte auf die Sequenzen der Peptide C, D, E und G eingeschränkt werden. Die in Frage kommenden Peptide stellen ca. 45% der IRS-1 Sequenz des verwendeten Fusionsproteins dar.

Im Rahmen einer bestehenden Kooperation mit der Firma Aventis (Frankfurt) wurden dort zusätzlich massenspektrometrische Analysen des mit IKK β *in vitro* phosphorylierten IRS-1 Fusionsproteins durchgeführt. Dabei wurden in den Massenspektren der zuvor mit Trypsin gespaltenen Proben Hinweise auf eine Phosphorylierung der Peptide YIPGATMG**T**SPAL**T**GDEAAGAADLDNRFR und **TH**SAG**T**SPT**I**SHQK gefunden (persönliche Mitteilung Dr. Jochen Kruijff und Dr. Carsten Corvey). Das entspricht Peptid C im Peak 5+6 sowie Peptid D in Peak 1 der HPLC (s. Tabelle 1) und bestätigt zusätzlich die aus HPLC-Analysen resultierende Vermutung, dass die Phosphorylierung innerhalb der Sequenz der Peptide C, D, E und G, nicht aber A, B; F und H zu erwarten ist (vgl. Tabelle 1). Eine eindeutige Zuordnung der Phosphorylierung zu bestimmten Serin- oder Threoninresten innerhalb dieser Peptide ist jedoch nicht gelungen. So liegen für das Peptid C weiterhin 4, für das Peptid D sogar 6 mögliche Phosphorylierungsstellen vor.

Die aktuelle Literatur belegt, dass innerhalb des humanen IRS-1 mehr als eine Phosphorylierungsstelle der IKK existiert. So konnte gezeigt werden, dass Serin 307 nur eine von mehreren IKK Phosphorylierungsstellen ist: nach einer Mutation des Serins 307 zu Alanin konnte keine Abnahme der Gesamt-Serinphosphorylierung des rekombinanten IRS-1 beobachtet werden (57). Es wäre vorstellbar, dass in dem untersuchten IRS-1 Bereich keine einzelne Hauptphosphorylierungsstelle der IKK liegt, sondern möglicherweise mehrere, sich gegenseitig verstärkende oder sogar konkurrierende potentielle Phosphorylierungsstellen. Eine Wechselwirkung von mehreren inhibitorischen IRS-1 Phosphorylierungsstellen wurde in der Literatur bereits beschrieben: eine Phosphorylierung von beiden Serinen 307 und 302 ist für eine

JNK-vermittelte Unterbrechung der Wechselwirkung von IR und IRS-1 notwendig, eine Phosphorylierung von Serin 307 alleine reicht dafür nicht aus (176).

Das natürliche Substrat der IKK, I κ B α , wird an zwei Serinen phosphoryliert: Serin 32 und Serin 36 (35). Diese Serine sind durch 3 weitere Aminosäuren voneinander getrennt (Sequenz: DDRHDSGLDSMKDE). Diese Anordnung könnte ein mögliches Motiv für eine Phosphorylierung durch die IKK darstellen. In der untersuchten Sequenz des IRS-1 der Ratte befinden sich 9 Serin- bzw. Threonin-Reste, welche diesem Motiv entsprechend angeordnet sind. Innerhalb der Peptide C, D und E sind insgesamt sieben solche „Vierer-Muster“ vorhanden, in Gruppen aus 3 bzw. 6 Serinen bzw. Threoninen in jeweils entsprechendem Abstand. Möglicherweise werden diese Muster nach dem Zufallsprinzip phosphoryliert, so dass die Phosphorylierung in verschiedenen IRS-1 Molekülen jeweils an unterschiedlichen Stellen dieser Motive vorliegt.

Ein auf diese Weise phosphoryliertes Molekülgemisch wäre mittels Massenspektrometrie nur sehr schwer eindeutig zu bestimmen, da ein bestimmtes Serin oder Threonin jeweils nur in einem Bruchteil der eingesetzten Peptide in phosphorylierter Form vorliegen würde. Es wäre daher aufgrund der Datenlage vorstellbar, dass in diesem Bereich des IRS-1 keine einzelne Hauptphosphorylierungsstelle, sondern eine Vielzahl potentiell gleichwertiger phosphorylierbarer Motive vorhanden ist (Abb. 51).



Abb. 51 Potentielle IKK β Phosphorylierungsstellen in der Sequenz des IRS-1 der Ratte

Gelb: Sequenz des tryptischen Peptides C aus Peak 5+6; blau: Sequenz des tryptischen Peptides D aus Peak 1; grün: Sequenz des tryptischen Peptides E aus Peak 3. Potentielle Phosphorylierungsstellen wurden rot hervorgehoben. Mit einem Pfeil wurden potentielle Phosphorylierungsstellen markiert, welche sich im Abstand von 4 Aminosäuren zu einem weiteren Serin oder Threonin befinden. Das Motiv von zwei Phosphorylierungsstellen im Abstand von 4 Aminosäuren liegt auch im natürlichen Substrat der IKK, dem I κ B Protein, in ähnlicher Weise vor (DDRHDSGLDSMKDE) und stellt dort die Zielsequenz für die Phosphorylierung durch die IKK dar.

4.2 Der Einfluss aktivierter Serinkinasen auf die Signaltransduktion im Zellmodell

Eine inhibitorische Wirkung aktivierter Serinkinasen auf die Insulinsignaltransduktion wurde insbesondere in Fettzellen mehrfach belegt. In 3T3-L1 Präadipocyten führte eine Aktivierung der JNK durch Überexpression von konstitutiv aktiver MAP-Kinase MEKK7 zu einer verminderten Tyrosinphosphorylierung des Insulinrezeptorsubstrats (IRS) und zu einer Reduktion der IRS assoziierten PI3-Kinase Aktivität, ohne dabei die Expressionslevel von IR und IRS zu beeinflussen (54). In 3T3-L1 Adipocyten führte eine Behandlung mit freien Fettsäuren zu einer Aktivierung von JNK und IKK (58). Die daraus resultierende Phosphorylierung des IRS-1 an Serin 307 führte zu einer Abnahme der IRS-1 Proteinmenge und trug dadurch zu einer Verminderung der insulinabhängigen Glucoseaufnahme bei (58). Andere Autoren berichten dagegen, dass eine Phosphorylierung von IRS-1 an Serin 307 durch die JNK in 3T3 Adipocyten über Insulin oder Anisomycin ausgelöst werden kann und nur nach einer Insulinbehandlung, nicht aber nach einer Anisomycinbehandlung zu einer veränderten zellulären Lokalisation und Degradation des IRS-1 führt (74). Ebenfalls in 3T3 Adipocyten wurde eine Inhibierung der IRS-1 Tyrosinphosphorylierbarkeit durch eine IKK- und JNK-vermittelte Serinphosphorylierung nach einer Behandlung mit Interleukin 1 α beschrieben (70). Untersuchungen an einer myeloischen Zelllinie der Maus (32D-Zellen), 3T3-L1 Adipocyten sowie embryonalen Fibroblasten der Maus haben ergeben, dass die JNK durch Insulin aktiviert werden kann und vermutlich eine Rolle bei der Signalregulation mittels negativer Rückkopplung spielt (98).

Im Tiermodell wurde eine erhöhte JNK-Aktivität, eine damit einhergehende Phosphorylierung von Serin 307 und darauf folgende IRS-1 Degradation im Soleus-Muskel von Ratten demonstriert (72). In Mausmodellen führte eine Fettleibigkeit zu erhöhter JNK Aktivität im Muskel, Leber und Fettgewebe. Gleichzeitig wurde eine erhöhte Phosphorylierung von Serin 307 und damit einhergehende Reduktion der insulinabhängigen IRS-1 Tyrosinphosphorylierung in der Leber der fettleibigen Wildtyp-Versuchstiere gefunden, während fettleibige JNK-KO Mäuse diesen Effekt nicht zeigten (75). Eine Lipidinfusion verursachte eine Reduktion der Glucoseaufnahme

und der IRS-1 assoziierten PI3-Kinase Aktivität bei Ratten (90). Hemmung der IKK mit hohen Salicylat-Dosen hob diesen Effekt auf, ebenso konnte keine Störung der Insulinsignalkaskade im Muskel von IKK-KO Mäusen beobachtet werden (90).

Obwohl inhibitorische Auswirkungen einer erhöhten JNK und IKK Aktivität auf die Insulinsignalkaskade im Tiermodell wiederholt gezeigt werden konnten, existieren auch Befunde, die gegen eine Hauptrolle dieser Serinkinasen bei der Resistenzentstehung sprechen. So haben beispielsweise bei Patienten vorhandene IKK-Mutationen keinen Einfluss auf die Entwicklung einer Diabeteserkrankung (109). Eine fehlende IKK-Expression im Skelettmuskel von Mäusen sowie eine generell um 50% erniedrigte IKK Expression im Tiermodell reichten nicht aus, um die Entwicklung einer induzierten Insulinresistenz bei den Versuchstieren zu verhindern (136). Umgekehrt wurde berichtet, dass eine Überexpression der JNK im Skelletmuskel der Maus zu keiner Beeinträchtigung der frühen Insulinsignalkaskade führte (53).

Insbesondere in Muskelzellen ist eine mögliche Beteiligung von IKK und JNK bedingter IRS-1 Phosphorylierung an der Entstehung von Insulinresistenz nicht ausreichend belegt und wird zur Zeit kontrovers diskutiert. In L6 Muskelzellen konnte gezeigt werden, dass oxidativer Stress zu einer Insulinresistenz und einer Aktivierung von mehreren Kinasen, darunter auch JNK, führt. Jedoch ist die Aktivität der JNK für die ausgelöste Störung der Signalweiterleitung in diesem Fall unerheblich (21). Eine weitere Studie zeigt, dass eine IKK-vermittelte, durch Fettsäuren induzierte Hemmung der insulinvermittelten Glucoseaufnahme in L6 Muskelzellen mit der NFκB-Translokation zusammenhängt (145). Eine Inhibierung der Translokation von NFκB verhinderte die mit Palmitinsäure induzierte Reduktion der Glucoseaufnahme (145). Demnach wäre es vorstellbar, dass die inhibitorische Wirkung der IKK im Muskel zumindest teilweise auf einer veränderten Genregulation beruht.

Um den Einfluss erhöhter Serinkinaseaktivität auf die Insulinsignalweiterleitung in Muskelzellen untersuchen zu können, wurden zwei Kinasen ausgewählt und in einer Kardiomyoblasten-Zelllinie aktiviert. Zur Aktivierung der inflammatorischen Kinase IKK wurde dabei TNFα eingesetzt. Eine selektive Aktivierung der Stress-Kinase JNK erfolgte durch eine Inkubation mit Anisomycin. Dabei zeigte sich ein deutlicher

Anstieg der jeweiligen Kinaseaktivität. Nach einer Behandlung mit TNF α wurde der Inhibitor des Nukleären Faktors κ B (I κ B) innerhalb weniger Minuten phosphoryliert und vollständig abgebaut. Aktivierung der JNK wurde durch einen Anstieg der JNK Phosphorylierung angezeigt. Eine Anisomycingabe führte innerhalb von 15 Minuten zu einer prominenten Phosphorylierung der JNK, welche als Zeichen ihrer gesteigerten Aktivität gewertet wurde. Sowohl TNF α als auch Anisomycin waren in ihrer Wirkung hochspezifisch für die jeweilige Kinase, eine Aktivierung der IKK durch Anisomycin oder der JNK durch TNF α wurde nicht beobachtet. Im Gegensatz dazu wurde in der Literatur eine Korrelation zwischen TNF α -Stimulus und einer erhöhten JNK Aktivität in 3T3-L1 und HepG2 Zellen (58) sowie in HEK293 Zellen (83) beschrieben. Zusätzlich konnte in HEK293 Zellen keine Aktivierung der IKK mit TNF α beobachtet werden (83). Es wäre also denkbar, dass die Mechanismen der Aktivierung dieser Serinkinasen in Muskel, Fett, Leber und Niere voneinander abweichen.

Eine Aktivierung der IKK über einen Zeitraum von 15 und 60 Minuten hatte keine Auswirkungen auf die insulinabhängige Tyrosinphosphorylierung des Insulinrezeptorsubstrates IRS-1 in den untersuchten Myolasten. Eine Behandlung mit Anisomycin verursachte ebenfalls keine messbare Reduktion der insulinvermittelten IRS-1 Tyrosinphosphorylierung.

Auf der Ebene der IRS-1/PI3-K Interaktion konnte ein geringfügiger, aber signifikanter Rückgang der insulinvermittelten Bindung der p85 α -Untereinheit an das IRS-1 beobachtet werden, welcher erst nach einstündiger TNF α Behandlung auftrat. Eine ähnliche Tendenz konnte nach JNK-Aktivierung mittels Anisomycin beobachtet werden.

Die geringfügige Hemmung der insulinvermittelten Bindung zwischen IRS-1 und PI3-Kinase scheint dennoch die Insulinsignalweiterleitung an stromabwärts liegende Effektoren nicht zu stören. Mittels Immunoblot-Analysen konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung der IKK mit TNF α weder nach 15 Minuten, noch nach einer Stunde zu einer Verminderung der Akt Aktivierung, gemessen an insulinabhängiger Phosphorylierung des Serins 473 und Threonins 308, führt.

Mittels Immunoblot wurde ebenfalls die Threoninphosphorylierung der Akt nach einer Anisomycin-Behandlung untersucht. Kurzfristig kam es nach 15 Minuten zu einem Anstieg der durch Insulin ausgelösten Phosphorylierung von Akt an Threonin 308 um ca. 80%, nach einer Stunde war bereits kein Unterschied zur unbehandelten Kontrolle mehr erkennbar. Die Aktivierung der JNK hatte darüber hinaus keine negativen Auswirkungen auf die insulinvermittelte Phosphorylierung der Akt an Serin 473.

Die Aktivierung der IKK mit TNF α hatte auf die Signalweiterleitung von Akt zu GSK3 keinen signifikanten Einfluss. Die insulinabhängige Translokation von GLUT4-Vesikeln zur Plasmamembran blieb trotz vorausgegangener einstündiger IKK Aktivierung ebenfalls unverändert.

Interessanterweise konnte eine signifikante, ca. 40%ige Reduktion der insulinvermittelten inhibitorischen Phosphorylierung von GSK3 nach einstündiger Anisomycin-Behandlung beobachtet werden. Da zum gleichen Zeitpunkt keine Verringerung der Akt Phosphorylierung vorlag, scheint die Akt-Aktivität unvermindert hoch zu sein. Die Mechanismen, die zu der Reduktion der GSK3 Phosphorylierbarkeit führen, bleiben unbekannt. Möglicherweise vermag die JNK durch eine konkurrierende Phosphorylierung der GSK3 diese für die Phosphorylierung durch die Akt unzugänglich zu machen. Da die GSK3 gleichzeitig an der Regulation einer Vielzahl von Signalwegen beteiligt ist (39), könnte es auch zu unvorhergesehenen Wechselwirkungen mit JNK-Signalwegen kommen. Eine Beteiligung der GSK3 an der JNK-Aktivierung wurde in der Literatur beschrieben (161;194). Ebenso wird eine aktive Phosphorylierung des JNK-Substrates c-Jun durch die GSK3 angenommen (76;119). Umgekehrt wurde auch eine Akt-unabhängige Aktivierung der Glycogen-Synthase durch die JNK beschrieben (115;149). Es wäre also vorstellbar, dass eine Aktivierung der JNK zu einer Änderung in den mit ihr vernetzten GSK3 Signalwegen führt. Alternativ kommt auch eine verstärkte Dephosphorylierung der GSK3 in Frage, möglicherweise durch eine erhöhte PP2A Aktivität (112). Da die PP2A ebenfalls ein negativer Regulator der JNK ist (142), wäre eine erhöhte PP2A Aktivität als Antwort auf übermäßige JNK Aktivität vorstellbar.

Eine vorausgegangene Aktivierung der JNK führte zu einer geringfügigen Erniedrigung der Translokation der GLUT4-Vesikel im basalen und insulinstimulierten Zustand. Der insulinabhängige Anstieg der GLUT4 Translokation um den Faktor 1,8 gemessen bezogen auf den jeweiligen Basalwert blieb dennoch unverändert. Die Insulinsignalweiterleitung in Richtung Glucoseaufnahme blieb demnach erhalten.

Eine Behandlung mit hohen TNF α Konzentrationen führte über Nacht zu einer Schädigung und Ablösung der Myoblasten. Um mögliche längerfristige negative Folgen der IKK-Aktivierung auf die Insulinsignalweiterleitung untersuchen zu können, wurde zunächst die niedrigste zur IKK-Aktivierung noch ausreichende TNF α Konzentration bestimmt. Folgende Behandlung mit 0,1 nM TNF α über Nacht führte zu einer verstärkten Insulinsensitivität auf der Akt-Ebene. Die insulinvermittelte Serinphosphorylierung von Akt stieg signifikant um ca. 80% an. Diese Daten stehen im Widerspruch zu der Beobachtung anderer Autoren, wonach eine chronische Exposition von Muskelzellen gegenüber TNF α mit einer verringerten insulinabhängigen Akt-Aktivierung einhergeht (31). Andererseits existieren auch Berichte, dass freie Fettsäuren, nicht aber TNF α eine Inhibierung der Akt Phosphorylierung im Skelettmuskel bewirken (156). Eine vermehrte Akt Aktivität wäre auch im Rahmen einer antiapoptotischen Gegenregulation nach einer TNF α Behandlung denkbar. Eine Aktivierung der Akt in Hepatocyten der Maus nach einer Zugabe von TNF α wurde in der Literatur diskutiert (68). In neonatalen Kardiomyocyten der Ratte wurde ebenfalls eine Aktivierung der Akt nach einer TNF α Behandlung festgestellt (73).

Insgesamt wurden keine negativen Auswirkungen der erhöhten IKK und JNK-Aktivität auf die frühe Insulinsignalkaskade sowie insulinvermittelte Glucosetransporter-Translokation und Signalweiterleitung zur Glycogensynthese gefunden. Eine Ausnahme bildet hier lediglich die nach Aktivierung der JNK verminderte insulinabhängige GSK3 Phosphorylierung. Eine schematische Übersicht der Ergebnisse ist in Abb. 52 dargestellt.

Als möglicher Mechanismus der hemmenden Wirkung von Serinkinasen auf die Insulinsignalkaskade wird die inhibitorische Phosphorylierung des IRS-1 an Serin 307 diskutiert. Eine Phosphorylierung an Serin 307 geht häufig mit einer verminder-

ten Tyrosinphosphorylierung des IRS-1 einher. In CHO Zellen (eine ovarielle Hamster-Zelllinie) wurde eine Phosphorylierung von Serin 307 durch die JNK nach einer Anisomycinbehandlung beschrieben (2). Mutation dieses Serins zu Alanin hob die inhibitorische Wirkung einer TNF α Behandlung auf. Im Skelettmuskel der Maus führte eine Überexpression der JNK jedoch zu keiner Änderung der Phosphorylierung von IRS-1 an Serin 307 oder an Tyrosinresten (53). Ein Anstieg der IRS-1 Phosphorylierung an Serin 307 nach einer Behandlung mit Insulin, Anisomycin und TNF α wurde ebenfalls in 3T3 Adipocyten beschrieben. In diesem Fall ging die Phosphorylierung mit erhöhter mTOR Aktivität einher und liess sich durch den mTOR Inhibitor Rapamycin unterbinden (26). Zahlreiche Publikationen belegen eine positive Wirkung von hohen Aspirindosen auf die Insulinsignaltransduktion (16;80;90;188). Dieser Effekt wurde einer Hemmung der IKK zugeschrieben (80), eine direkte Phosphorylierung des Serins 307 durch die IKK konnte 2002 belegt werden (57). Im Rahmen dieser Arbeit konnte *in vitro* eine weitere Phosphorylierung des IRS-1 durch die IKK ausserhalb der PTB-Domäne gezeigt werden. Da aber im Tierexperiment eine um 50% erniedrigte IKK Expression sowie ein kompletter Mangel an IKK im Muskel nicht genügte, um die Versuchstiere vor einer Insulinresistenz zu schützen, wäre es durchaus denkbar, dass die IKK im Muskel keine wesentliche Rolle bei der Resistenzinduktion spielt. Dafür spricht auch die Tatsache, dass die in dieser Arbeit untersuchten Myoblasten selbst nach maximaler Aktivierung der IKK keine Störung der Insulinsignaltransduktion zeigten. Eine Phosphorylierung des nach einer TNF α bzw. Anisomycin-Behandlung präzipitierten IRS-1 an Serin 307 konnte nicht detektiert werden, obwohl die Funktionalität und Spezifität der beiden verwendeten Serin 307-Antikörper durch vom Hersteller bereitgestellte Positiv- und Negativkontrollen belegt werden konnte.

Erst nach transienter Überexpression von IRS-1 konnte eine Phosphorylierung an Serin 307 nach einer Anisomycin-Behandlung detektiert werden. Es wäre also denkbar, dass die JNK-vermittelte Serinphosphorylierung von IRS-1 in untersuchten Zellen zwar vorhanden, aber nur sehr schwach ausgeprägt ist und dadurch unterhalb der Nachweisbarkeit verbleibt. Eine solche marginale Phosphorylierung des Serins 307 ist offenbar zu einer messbaren Resistenzinduktion nicht ausreichend.

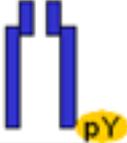
aktivierte Kinase: Ebene der Signalkaskade:	 + Anisomycin	 + TNF α
	Keine Signalhemmung	Keine Signalhemmung
	Keine Signalhemmung	Keine Signalhemmung
	Geringfügige Signalhemmung	Geringfügige Signalhemmung
	Keine Signalhemmung	Keine Signalhemmung
	Signalhemmung	Keine Signalhemmung
 GLUT4 Translokation	Keine Signalhemmung	Keine Signalhemmung

Abb. 52 Übersicht der Auswirkungen aktivierter Serinkinasen auf die Weiterleitung des Insulinsignals auf verschiedenen Ebenen der Signalkaskade

Die Aktivierung von IKK mittels TNF α dagegen führte selbst nach massiver Überexpression des IRS-1 zu keiner detektierbaren Phosphorylierung an Serin 307. Übereinstimmend mit diesen Beobachtungen wurde auch keine Beeinträchtigung der insulinvermittelten Tyrosinphosphorylierung des IRS-1 in den mit Anisomycin beziehungsweise TNF α behandelten Zellen gefunden. Offenbar spielt dieser Mechanismus der Resistenzentstehung in den untersuchten Myoblasten keine Rolle.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass eine gesteigerte Aktivität der Serinkinasen IKK oder JNK zur Auslösung einer umfassenden Insulinresistenz in den untersuchten Muskelzellen nicht ausreicht.

Frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe belegen, dass bereits geringe TNF α Mengen innerhalb von 15 Minuten eine ausgeprägte Insulinresistenz in humanen Adipocyten verursachen können (104). Ein negativer Einfluss aktivierter IKK auf Insulinsignaltransduktion in Adipocyten konnte in der Literatur mehrfach gezeigt werden (59;70). Eine TNF α vermittelte Insulinresistenz wurde in Myoblasten nach einer 24-stündigen Inkubation beschrieben (31).

Dabei kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um indirekte Auswirkungen der IKK handelt. Möglicherweise ist in diesem Fall vielmehr eine durch IKK veränderte Genexpression für die Veränderungen ursächlich. Eine durch direkte inhibitorische Serinphosphorylierung ausgelöste Hemmung der Signalkaskade wäre theoretisch bereits wenige Minuten nach einer Aktivierung der IKK zu erwarten, da auch das natürliche Substrat der IKK, I κ B, innerhalb von 5 Minuten nach einer TNF α -Behandlung vollständig phosphoryliert wird (Abb. 16). Übereinstimmend damit wurde die maximale Aktivierung der IKK in primären Hepatozyten der Ratte 5 Minuten nach Zugabe von TNF α beschrieben (141). Interessanterweise zeigen frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, dass erst eine zweitägige Behandlung mit hohen Konzentrationen von TNF α eine Signalhemmung in humanen Skelettmuskelzellen zu Folge hat (37). Niedrigere TNF α Mengen oder kürzere Inkubationsdauer führten nicht zu einer vergleichbaren Resistenzinduktion.

Da auch Literaturdaten existieren, die eine indirekte IKK vermittelte Resistenzinduktion über den NF κ B Signalweg in Muskelzellen belegen (145), wäre es denkbar, dass die IKK in Adipocyten zwar direkt durch eine Phosphorylierung des IRS-1, in Muskelzellen aber nur indirekt über eine Änderung der Transkription zu der Entstehung einer Insulinresistenz beiträgt.

Möglicherweise spielen auch die Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Zelltypen eine entscheidende Rolle bei der Resistenzinduktion. Durch Ko-Kultur mit Adipocyten sowie durch Adipocyten-konditioniertes Medium konnte unabhängig von hohen

TNF α Mengen eine Insulinresistenz in Muskelzellen induziert werden (37). Dabei wurde der NF κ B Signalweg in den Muskelzellen aktiviert (36).

Die aktuelle Datenlage spricht insgesamt dafür, dass Serinkinasen wie IKK und JNK an einer Resistenzinduktion in Fettzellen und möglicherweise weiteren Geweben beteiligt sein könnten, ohne unmittelbar durch Phosphorylierung des IRS-1 in Muskelzellen zu wirken. Es wäre dennoch denkbar, dass sie *in vivo* auf indirektem Wege zum Beispiel über sekretorische Faktoren den Stoffwechsel der Muskelzellen beeinflussen. Eine kürzlich erschienene Publikation demonstriert, dass ein Knockout der IKK β in der Leber zu einer Aufrechterhaltung der Insulinsensitivität der Leber unter einer resistenzauslösenden Behandlung führt, jedoch keine Insulinresistenz im Muskel und Fettgewebe verhindert (6). Interessanterweise konnte ein Ausschalten der IKK β in Makrophagen einer Entwicklung der Insulinresistenz bei den Versuchstieren vorbeugen (6). Diese Daten legen nahe, dass die IKK in einigen Geweben nur eine lokale Wirkung auf die Insulinsensitivität hat, während eine von der IKK in den Makrophagen über den NF κ B Signalweg vermittelte Aktivierung der inflammatorischen Prozesse zu einer umfassenden Insulinresistenz im Organismus führt. Auf diese Weise wäre es möglich, dass die aktivierte IKK zu einer systemischen Insulinresistenz beiträgt, obwohl sie wie in dieser Arbeit gezeigt, lokal in Muskelzellen keine Signalstörung verursacht.

4.3 Untersuchung der induzierten Insulinresistenz in einer Kardiomyoblasten-Zelllinie

In der Literatur wird eine Dämpfung des Insulinsignals durch an der Signaltransduktion beteiligte Kinasen wie PKC ζ (106;111;174) und GSK3 (42;63) postuliert. Zusätzlich wurde eine insulinabhängige Aktivierung von mehreren inhibitorischen Kinasen, wie konventionelle PKC Isoformen (100;137) und JNK (74;98), beschrieben. Auch hohe Glucosekonzentrationen sollen zu einer erhöhten PKC Aktivität und einer verminderten Glucoseaufnahme in Muskelzellen führen (30). Es wäre also möglich, dass auch an der eigentlichen Signalweiterleitung unbeteiligte Kinasen zu einer Löschung des Insulinsignals im Rahmen einer negativen Rückkopplung beitragen.

Eine Hyperaktivierung dieser natürlichen Modulationmechanismen könnte eine pathologische Signalstörung zu Folge haben.

Anhand eines Zellmodells sollte überprüft werden, welche Faktoren an einer Hemmung der Signalkaskade mittels übermässig aktivierter negativer Rückkopplung in Muskelzellen beteiligt sind. Zu diesem Zweck wurde ein zelluläres Resistenzmodell etabliert. Zur Auslösung der Insulinresistenz wurden embryonale Myoblasten über Nacht im serumfreien Medium mit hohen Insulin- und Glucosekonzentrationen inkubiert. Diese Behandlung ahmt die im Anfangsstadium der Diabeteserkrankung vorkommenden hohen Blutspiegel von Glucose und Insulin nach. Nach anschließendem Waschschrift folgte eine einstündige serumfreie Inkubation, um das verbleibende Insulin zu entfernen und eine Löschung des akuten Insulinsignals zu bewirken. Anschliessend wurden die Zellen einem erneuten akuten Insulinstimulus ausgesetzt. Eine Behandlung mit hohen Glucosekonzentrationen führte zu einer Abnahme der insulinstimulierten Akt Phosphorylierung an Serin 473 um ca. 15-20%. Eine Behandlung mit Insulin über Nacht resultierte in einer um ca. 50% verminderten Serinphosphorylierung von Akt. Beide Substanzen gemeinsam ergaben eine kumulative Reduktion der Signalkaskade-Aktivität. Dabei wurde eine Reduktion der insulinvermittelten Serinphosphorylierung von Akt um ca. 60% beobachtet. Noch dramatischer war die Abnahme der Threoninphosphorylierung von Akt – hier wurde eine Abnahme um ca. 80% gemessen. Eine ähnlich additive Reduktion der insulinvermittelten Akt Phosphorylierung durch Glucose und Insulin wurde in in 3T3 Adipocyten ebenfalls beschrieben, dabei war die inhibitorische Auswirkung hoher Insulinmengen stärker als die hoher Glucosekonzentrationen (118).

An diesem Resistenzmodell sollte geprüft werden, auf welcher Ebene der Signalkaskade die Signalhemmung erstmalig auftritt. Zu diesem Zweck wurden die an der frühen Signalweiterleitung beteiligten Kaskade-Proteine Insulinrezeptor, IRS-1, PI3-Kinase und PDK1 untersucht.

Weder die Expression noch die insulinabhängige Phosphorylierbarkeit des stabil exprimierten Insulinrezeptors wurden durch die resistenzauslösende Behandlung beeinträchtigt. Eine signifikante Abnahme der Rezeptormenge durch veränderte

Expression, Internalisation bzw. Degradation wäre im untersuchten Zellmodell nicht zu erwarten, da der Insulinrezeptor aufgrund der Überexpression im Überschuß vorliegt. Eine Reduktion der insulinabhängigen Rezeptorphosphorylierung wurde in der Literatur nach einer Behandlung mit hohen Glucosekonzentrationen in Fettzellen gezeigt (116). In Fibroblasten der Ratte, welche wie die in dieser Arbeit eingesetzte Zelle stabil den humanen Insulinrezeptor exprimieren, konnte dieser Effekt ebenfalls beobachtet werden (88). Die Resistenz konnte in beiden Fällen durch eine Inhibierung der PKCs aufgehoben werden. Es existieren aber auch Untersuchungen, wonach in den Fibroblasten nicht die PKCs sondern eine verstärkte Dephosphorylierung des Insulinrezeptors durch cytosolische Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTP) für die Abnahme der Tyrosinphosphorylierung verantwortlich sein soll (107). In den untersuchten Muskelzellen scheinen diese Mechanismen nicht relevant zu sein, da die insulinabhängige Rezeptorphosphorylierung nach erfolgter Resistenzinduktion nicht abnahm und eine Hemmung der PKC Isoformen sowie eine Überexpression der PKCzeta keinen Einfluss auf die Resistenzentwicklung hatten.

Auch in der insulinvermittelten Tyrosinphosphorylierung des IRS-1 wurden keine Unterschiede zu der unbehandelten Kontrolle festgestellt. Die Bindung der PI3-K Untereinheit p85 α an den aktivierten Insulinrezeptor war geringfügig, aber signifikant um 10% erniedrigt. In der Phosphorylierung der PDK1 hingegen wurden keine Unterschiede gemessen. Somit trat die massive Insulinresistenz erst auf der Ebene der Akt in Erscheinung. Ein ähnliche Beobachtung wurde nach einer Vorbehandlung mit Glucose und Insulin in 3T3 Adipocyten beschrieben: trotz unveränderter IRS-1, PI3-K und Akt Proteinmengen und unveränderter insulinabhängiger PI3-Kinase Aktivierung wurde eine Abnahme der Akt Phosphorylierung gemessen (117;118). Andere Publikationen belegen jedoch eine Störung des PI3-Kinase/Akt Signalweges bei einer langanhaltenden Insulineinwirkung, bedingt durch eine Degradation (74;129) sowie mangelnde Phosphorylierbarkeit (135) des IRS-1. Da in dem untersuchten Zellmodell keine nennenswerte Beeinträchtigung der frühen Insulinsignalkaskade beobachtet werden konnte, scheint in diesem Fall ein anderer Mechanismus vorzuliegen.

Um zu prüfen, ob die auf der Akt-Ebene induzierte Insulinresistenz die in der Signalkaskade stromabwärts liegenden Prozesse beeinflusst, wurde die Signalweiterleitung zur Glycogensynthese untersucht. Ein signifikanter Rückgang der GSK3-Phosphorylierung um ca. 60% konnte im Resistenzmodell beobachtet werden. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen wurde eine Abnahme der insulinstimulierten Glycogensynthase Aktivität nach Inkubation mit hohen Glucose- und Insulinkonzentrationen im Skelettmuskel beschrieben (71).

Die Signalweiterleitung in Richtung Glucoseaufnahme wurde anhand der Translokation des insulinabhängigen Glucosetransporters 4 (GLUT4) zur Plasmamembran bestimmt. Unter Resistenzbedingungen wurde eine signifikante Abnahme der insulinvermittelten GLUT Translokation gemessen. Literaturdaten belegen eine durch anhaltende Insulinstimulation verursachte Hemmung des Glucosetransportes aufgrund einer Reduktion der Menge an Transportern (51). Da GLUT4 zur Messung der Translokation transient überexprimiert wurde, kann ein Mangel an GLUT4 im untersuchten Zellsystem ausgeschlossen werden.

Eine Behandlung mit hohen Glucose- und Insulinmengen induziert über Nacht demnach eine massive Insulinresistenz, welche sich erstmalig auf der Akt-Ebene manifestiert und die Signalweiterleitung in Richtung Glucoseaufnahme und Glycogensynthese nachhaltig stört. Eine Übersicht der Befunde ist in Abb. 53 dargestellt.

In folgenden Experimenten wurde eine mögliche Beteiligung von Serinkinasen an der Resistenzentstehung untersucht. Die Serinkinasen IKK, JNK, mTOR und GSK3 wurden während der Resistenzinduktion mit hochspezifischen Inhibitoren gehemmt. Diese Hemmung verringerte in keinem Fall das Ausmass an induzierbarer Insulinresistenz. Desweiteren führte eine Inhibierung der PKC Isoformen α , β , γ , δ , ϵ , η und ζ mit Bisindolylmaleimid IX nicht zu einer Aufhebung der Insulinresistenz auf der Akt-Ebene. Eine adenovirale Überexpression rekombinanter PKC ζ hatte ebenfalls keinerlei Einfluss auf die Resistenzentstehung. Obwohl die genannten Kinasen in der Literatur wiederholt mit der Hemmung des Insulinsignals in Verbindung gebracht werden konnten (42;57;63;74;98;100;106;111;122;137;174), kann anhand dieser

Befunde ihre Beteiligung an der mittels Glucose und Insulin induzierten Insulinresistenz ausgeschlossen werden.

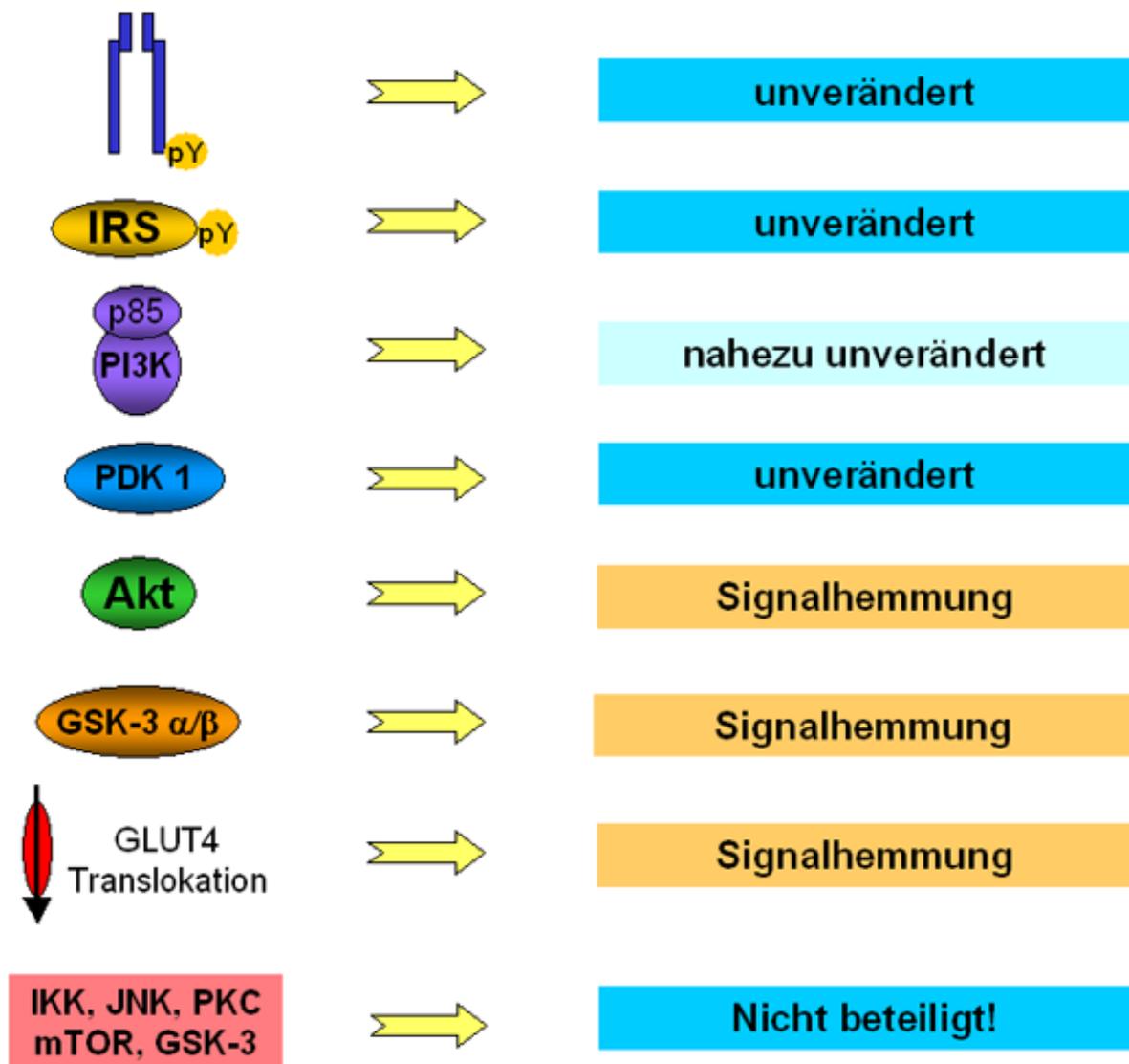


Abb. 53 Auswirkungen der Resistenzinduktion auf die Signalweiterleitung auf verschiedenen Ebenen der Insulinsignalkaskade

Da die Signalhemmung auf der Ebene von Akt auftritt, lag die Vermutung nahe, dass es sich bei den beteiligten Faktoren um direkt mit Akt interagierende Proteine handelt. Zu solchen Akt-Bindungspartnern zählt das Hitzeschockprotein 90. In seiner Funktion als Chaperon (172;186) trägt Hsp90 zu einer Stabilisierung zahlreicher Proteine (131;191), darunter auch des Akt-Proteins (17) bei. Neuere Publikationen

liefern Hinweise dafür, dass das Hsp90 die Aktivität der gebundenen Proteine beeinflusst (140). Als mögliche Mechanismen wurde eine veränderte Konformation der gebundenen Substrate sowie eine beschleunigte Dephosphorylierung der im Hsp90-Komplex gebundenen Substrate vorgeschlagen (185;189;192).

Eine kurzfristige selektive Inhibierung von Hsp90 mit dem Geldanamycin-Analogon 17-AAG verminderte signifikant das Ausmass der induzierbaren Resistenz auf der Ebene der Serinphosphorylierung von Akt. Die insulinabhängige Threoninphosphorylierung von Akt konnte auf diese Weise sogar vollständig wiederhergestellt werden. Auf die Akt-Phosphorylierung der unbehandelten Kontrolle hatte eine Hemmung des Hsp90 dagegen nur einen vergleichsweise geringen insulin-sensitivierenden Einfluss.

Um zu prüfen, ob diesem Effekt eine Modulation der Akt-Dephosphorylierung zugrunde liegt, wurde die Geschwindigkeit der Dephosphorylierung in der Resistenzsituation und der unbehandelten Kontrolle, jeweils mit und ohne Zugabe von 17-AAG untersucht. In den Kontrolllysaten wurde tatsächlich eine teilweise Hemmung der Dephosphorylierung durch 17-AAG beobachtet, was die leicht gesteigerte, insulinabhängige Akt-Phosphorylierung in nicht-resistenten Kontrollzellen nach einer Hsp90-Inhibierung erklärt.

Diese Beobachtung stimmt mit einer während dieser Arbeit erschienenen Publikation überein, in der ein ähnlicher Effekt für eine IGF-1 abhängige Akt-Phosphorylierung beschrieben wurde (140). In einer folgenden Arbeit wurde die Hsp90-vermittelte verstärkte Akt-Dephosphorylierung der Protein-Phosphatase 2A zugeschrieben (189).

Die Dephosphorylierungsrate in resistenten Zellen wies trotz geringerer initialen Akt-Phosphorylierung keine Unterschiede zu der unbehandelten Kontrolle auf. Interessanterweise war es in der Resistenzsituation im Gegensatz zu der Kontrollsituation nicht möglich, die Akt-Dephosphorylierung mittels Hsp90-Inhibierung zu hemmen. Es scheint also eine Veränderung der Hsp90 Funktion in Folge der Resistenzinduktion vorzuliegen. Möglicherweise wird im Fall der Insulinresistenz bereits die initiale Phosphorylierbarkeit der Akt durch eine Änderung innerhalb des Hsp90-Komplexes gestört. Da es in der Literatur auch Hinweise auf das Vorkommen von PDK1 im

Hsp90-Komplex gibt (55), wäre eine Hsp90-abhängige Verminderung der PDK1-Akt Interaktion vorstellbar. Da die zur Zeit erhältlichen Anti-Hsp90-Antikörper für eine Ko-Präzipitation des nativen Hsp90 mit Bindungspartnern aus Muskelzell-Lysaten nicht geeignet sind, konnte die möglicherweise unter den jeweiligen Bedingungen variable Zusammensetzung der Hsp90-Komplexe in dieser Arbeit nicht überprüft werden.

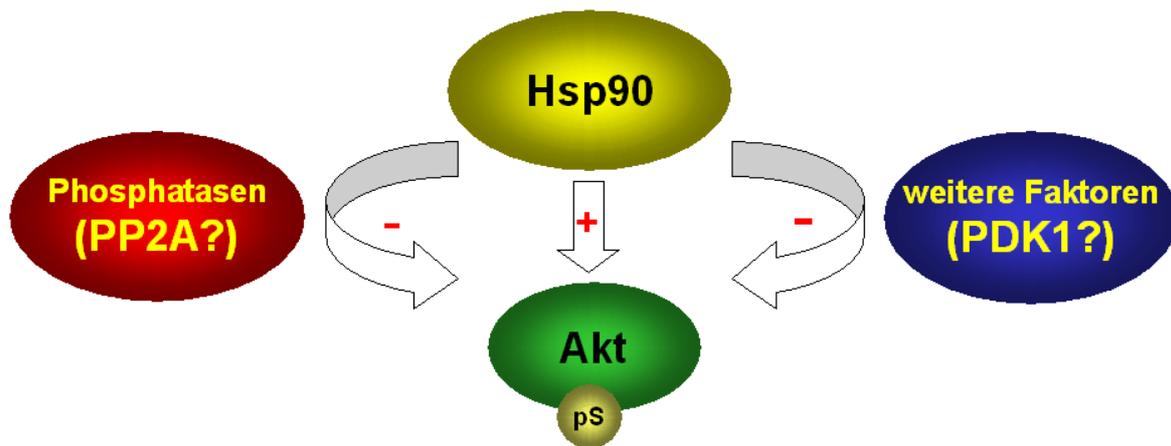


Abb. 54 Mögliche Mechanismen der Hsp90-Wirkung

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass das Hsp90 ein bedeutender Modulator der Akt ist. Neben seiner positiven stabilisierenden Funktion beeinflusst das Hsp90 die Akt-Aktivität auf unterschiedlichen Wegen (Abb. 54). Dies geschieht einerseits über eine erhöhte Dephosphorylierung, wahrscheinlich mittels verstärkter Exposition von Akt gegenüber der PP2A. Auf der anderen Seite wurde im Resistenzmodell eine Änderung der durch 17-AAG inhibierbaren Hsp90-Funktion beobachtet. Da eine Hemmung von Hsp90 die Insulinresistenz auf der Akt-Ebene unabhängig von der Dephosphorylierung aufhebt, muss im Fall der Resistenz ein weiterer, noch unbekannter Mechanismus der negativen Modulation von Akt durch das Hsp90 vorliegen. In diesem Punkt ist eine weitere Erforschung der beteiligten Mechanismen wünschenswert.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Eine inhibitorische Serinphosphorylierung des Insulinrezeptorsubstrats zählt zu den möglichen Ursachen der Insulinresistenz. In der vorliegenden Arbeit wurde das Serin 570 des IRS-1 *in vitro* als spezifische Phosphorylierungsstelle der PKC ζ bestätigt. Desweiteren konnte erstmalig eine Phosphorylierung der PI3-Kinase bindenden Domäne des IRS-1 durch die inflammatorische Kinase IKK *in vitro* belegt werden.

Im Zellmodell konnte keine inhibitorische Auswirkung von aktivierten Serinkinasen IKK und JNK auf die Insulinsignaltransduktion in Myoblasten beobachtet werden. Es wurde keine detektierbare Phosphorylierung des endogenen IRS-1 an Serin 307 festgestellt. Offenbar reicht eine erhöhte IKK- bzw. JNK-Aktivität als alleiniger Faktor nicht aus, um eine Insulinresistenz in den untersuchten Myoblasten zu verursachen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein zelluläres Resistenzmodell etabliert. Eine über-Nacht Behandlung von Myoblasten mit hohen Glucose- und Insulinmengen hatte eine dramatische Insulinresistenz zu Folge. Die induzierte Signalhemmung trat auf der Ebene von Akt erstmalig in Erscheinung. Die folgende Signalweiterleitung in Richtung Glucoseaufnahme und Glycogensynthese war ebenfalls signifikant beeinträchtigt. Durch Inhibitionsversuche und transiente Überexpression konnte belegt werden, dass die Serinkinasen IKK, JNK, GSK3, mTOR sowie PKC-Isoformen α , β , γ , δ , ϵ , η und ζ an der Entstehung der induzierten Insulinresistenz nicht beteiligt sind.

Eine Hemmung des Akt-Chaperons Hsp90 mit einem Geldanamycin-Analogen führte zu einer deutlichen Abnahme der induzierbaren Resistenz. Das Hsp90 scheint die Aktivität der Akt in resistenten und nicht-resistenten Zellen auf unterschiedliche Weise zu modulieren. In unbehandelten Zellen konnte nach einer Inhibition von Hsp90 eine Abnahme der Akt Dephosphorylierung beobachtet werden. Im Resistenzmodell hingegen bewirkte die Hemmung des Hsp90 einen von der Dephosphorylierungsrate unabhängigen Anstieg der insulinvermittelten Akt Phosphorylierung. Eine weitergehende Untersuchung der Wirkmechanismen von Hsp90 im Kontext der Insulinresistenz könnte neue Perspektiven für die Therapie von *Diabetes mellitus* eröffnen.

6 LITERATUR

1. Type 2 diabetes in children and adolescents. American Diabetes Association. *Diabetes Care* 2000; 23: 381-9.
2. **Aguirre V, Uchida T, Yenush L, Davis R, White MF.** The c-Jun NH₂-terminal Kinase Promotes Insulin Resistance during Association with Insulin Receptor Substrate-1 and Phosphorylation of Ser307. *J.Biol.Chem.* 2000; 275: 9047-54.
3. **Aguirre V, Werner ED, Giraud J, Lee YH, Shoelson SE, White MF.** Phosphorylation of Ser307 in Insulin Receptor Substrate-1 Blocks Interactions with the Insulin Receptor and Inhibits Insulin Action. *J.Biol.Chem.* 2002; 277: 1531-7.
4. **Aman MJ, Lamkin TD, Okada H, Kurosaki T, Ravichandran KS.** The Inositol Phosphatase SHIP Inhibits Akt/PKB Activation in B Cells. *J.Biol.Chem.* 1998; 273: 33922-8.
5. **Andjelkovic M, Maira SM, Cron P, Parker PJ, Hemmings BA.** Domain Swapping Used To Investigate the Mechanism of Protein Kinase B Regulation by 3-Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase 1 α and Ser473 Kinase. *Mol.Cell.Biol.* 1999; 19: 5061-72.
6. **Arkan MC, Hevener AL, Greten FR et al.** IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med* 2005; 11: 191-8.
7. **Arrandale J, Gore-Willse A, Rocks S et al.** Insulin Signaling in Mice Expressing Reduced Levels of Syp. *J.Biol.Chem.* 1996; 271: 21353-8.
8. **Bagatell R, Beliakoff J, David CL, Marron MT, Whitesell L.** Hsp90 inhibitors deplete key anti-apoptotic proteins in pediatric solid tumor cells and demonstrate synergistic anticancer activity with cisplatin. *Int.J.Cancer* 2005; 113: 179-88.
9. **Bandyopadhyay G, Standaert ML, Sajan MP et al.** Dependence of Insulin-Stimulated Glucose Transporter 4 Translocation on 3-Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase-1 and Its Target Threonine-410 in the Activation Loop of Protein Kinase C- ζ . *Mol.Endocrinol.* 1999; 13: 1766-72.
10. **Bandyopadhyay G, Standaert ML, Sajan MP et al.** Dependence of Insulin-Stimulated Glucose Transporter 4 Translocation on 3-Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase-1 and Its Target Threonine-410 in the Activation Loop of Protein Kinase C- ζ . *Mol.Endocrinol.* 1999; 13: 1766-72.
11. **Bandyopadhyay G, Kanoh Y, Sajan MP, Standaert ML, Farese RV.** Effects of Adenoviral Gene Transfer of Wild-Type, Constitutively Active, and Kinase-Defective Protein Kinase C- λ on Insulin-Stimulated Glucose Transport in L6 Myotubes. *Endocrinology* 2000; 141: 4120-7.

12. **Bandyopadhyay G, Sajan MP, Kanoh Y et al.** PKC- ζ Mediates Insulin Effects on Glucose Transport in Cultured Preadipocyte-Derived Human Adipocytes. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 2002; 87: 716-23.
13. **Bandyopadhyay G, Sajan MP, Kanoh Y et al.** PKC- ζ Mediates Insulin Effects on Glucose Transport in Cultured Preadipocyte-Derived Human Adipocytes. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 2002; 87: 716-23.
14. **Bandyopadhyay G, Standaert ML, Galloway L, Moscat J, Farese RV.** Evidence for Involvement of Protein Kinase C (PKC)- ζ and Noninvolvement of Diacylglycerol-Sensitive PKCs in Insulin-Stimulated Glucose Transport in L6 Myotubes. *Endocrinology* 1997; 138: 4721-31.
15. **Bandyopadhyay G, Standaert ML, Sajan MP et al.** Protein Kinase C- λ Knockout in Embryonic Stem Cells and Adipocytes Impairs Insulin-Stimulated Glucose Transport. *Mol.Endocrinol.* 2004; 18: 373-83.
16. **Barreiro GC, Prattali RR, Caliseo CT et al.** Aspirin inhibits serine phosphorylation of IRS-1 in muscle and adipose tissue of septic rats. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2004; 320: 992-7.
17. **Basso AD, Solit DB, Chiosis G, Giri B, Tschlis P, Rosen N.** Akt forms an intracellular complex with heat shock protein 90 (Hsp90) and Cdc37 and is destabilized by inhibitors of Hsp90 function. *J.Biol.Chem.* 2002; 277: 39858-66.
18. **Bayascas JR, Alessi DR.** Regulation of Akt/PKB Ser473 phosphorylation. *Mol.Cell* 2005; 18: 143-5.
19. **Begum N, Sandu OA, Ito M, Lohmann SM, Smolenski A.** Active Rho Kinase (ROK- α) Associates with Insulin Receptor Substrate-1 and Inhibits Insulin Signaling in Vascular Smooth Muscle Cells. *J.Biol.Chem.* 2002; 277: 6214-22.
20. **Birnbaum MJ.** Turning down insulin signaling. *J.Clin.Invest.* 2001; 108: 655-9.
21. **Blair AS, Hajduch E, Litherland GJ, Hundal HS.** Regulation of Glucose Transport and Glycogen Synthesis in L6 Muscle Cells during Oxidative Stress. EVIDENCE FOR CROSS-TALK BETWEEN THE INSULIN AND SAPK2/p38 MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE SIGNALING PATHWAYS. *J.Biol.Chem.* 1999; 274: 36293-9.
22. **Burks DJ, Pons S, Towery H et al.** Heterologous Pleckstrin Homology Domains Do Not Couple IRS-1 to the Insulin Receptor. *J.Biol.Chem.* 1997; 272: 27716-21.
23. **Burks DJ, Wang J, Towery H et al.** IRS Pleckstrin Homology Domains Bind to Acidic Motifs in Proteins. *J.Biol.Chem.* 1998; 273: 31061-7.

24. **Cai D, Dhe-Paganon S, Melendez PA, Lee J, Shoelson SE.** Two New Substrates in Insulin Signaling, IRS5/DOK4 and IRS6/DOK5. *J.Biol.Chem.* 2003; 278: 25323-30.
25. **Cantrell DA.** Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways. *J.Cell Sci.* 2001; 114: 1439-45.
26. **Carlson CJ, White MF, Rondinone CM.** Mammalian target of rapamycin regulates IRS-1 serine 307 phosphorylation. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2004; 316: 533-9.
27. **Cheng A, Dube N, Gu F, Tremblay ML.** Coordinated action of protein tyrosine phosphatases in insulin signal transduction. *Eur.J.Biochem.* 2002; 269: 1050-9.
28. **Colditz GA, Willett WC, Rotnitzky A, Manson JE.** Weight Gain as a Risk Factor for Clinical Diabetes Mellitus in Women. *Ann Intern Med* 1995; 122: 481-6.
29. **Datta SR, Brunet A, Greenberg ME.** Cellular survival: a play in three Akts. *Genes & Dev.* 1999; 13: 2905-27.
30. **Davidoff AJ, Davidson MB, Carmody MW, Davis ME, Ren J.** Diabetic cardiomyocyte dysfunction and myocyte insulin resistance: role of glucose-induced PKC activity. *Mol Cell Biochem* 2004; 262: 155-63.
31. **de Alvaro C, Teruel T, Hernandez R, Lorenzo M.** Tumor Necrosis Factor {alpha} Produces Insulin Resistance in Skeletal Muscle by Activation of Inhibitor {kappa}B Kinase in a p38 MAPK-dependent Manner. *J.Biol.Chem.* 2004; 279: 17070-8.
32. **De Fea K, Roth RA.** Protein kinase C modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation requires serine 612. *Biochemistry* 1997; 36: 12939-47.
33. **De Fea K, Roth RA.** Modulation of Insulin Receptor Substrate-1 Tyrosine Phosphorylation and Function by Mitogen-activated Protein Kinase. *J.Biol.Chem.* 1997; 272: 31400-6.
34. **Delahaye L, Mothe-Satney I, Myers MG, White MF, Van Obberghen E.** Interaction of Insulin Receptor Substrate-1 (IRS-1) with Phosphatidylinositol 3-Kinase: Effect of Substitution of Serine for Alanine in Potential IRS-1 Serine Phosphorylation Sites. *Endocrinology* 1998; 139: 4911-9.
35. **DiDonato J, Mercurio F, Rosette C et al.** Mapping of the inducible IkappaB phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation. *Mol.Cell.Biol.* 1996; 16: 1295-304.

36. **Dietze D, Ramrath S, Ritzeler O, Tennagels N, Hauner H, Eckel J.** Inhibitor kappaB kinase is involved in the paracrine crosstalk between human fat and muscle cells. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004; 28: 985-92.
37. **Dietze D, Koenen M, Rohrig K, Horikoshi H, Hauner H, Eckel J.** Impairment of Insulin Signaling in Human Skeletal Muscle Cells by Co-Culture With Human Adipocytes. *Diabetes* 2002; 51: 2369-76.
38. **Doble BW, Woodgett JR.** GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J.Cell Sci.* 2003; 116: 1175-86.
39. **Doble BW, Woodgett JR.** GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J.Cell Sci.* 2003; 116: 1175-86.
40. **Duckworth WC, Bennett RG, Hamel FG.** Insulin Degradation: Progress and Potential. *Endocr.Rev.* 1998; 19: 608-24.
41. **Elchebly M, Payette P, Michaliszyn E et al.** Increased Insulin Sensitivity and Obesity Resistance in Mice Lacking the Protein Tyrosine Phosphatase-1B Gene. *Science* 1999; 283: 1544-8.
42. **Eldar-Finkelman H, Krebs EG.** Phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by glycogen synthase kinase 3 impairs insulin action. *PNAS* 1997; 94: 9660-4.
43. **Eldar-Finkelman H, Krebs EG.** Phosphorylation of insulin receptor substrate 1áby glycogen synthase kinase 3áimpairs insulin action. *PNAS* 1997; 94: 9660-4.
44. **Eldar-Finkelman H, Krebs EG.** Phosphorylation of insulin receptor substrate 1áby glycogen synthase kinase 3áimpairs insulin action. *PNAS* 1997; 94: 9660-4.
45. **Eldar-Finkelman H, Krebs EG.** Phosphorylation of insulin receptor substrate 1áby glycogen synthase kinase 3áimpairs insulin action. *PNAS* 1997; 94: 9660-4.
46. **Esposito DL, Li Y, Cama A, Quon MJ.** Tyr612 and Tyr632 in Human Insulin Receptor Substrate-1 Are Important for Full Activation of Insulin-Stimulated Phosphatidylinositol 3-Kinase Activity and Translocation of GLUT4 in Adipose Cells. *Endocrinology* 2001; 142: 2833-40.
47. **Fallaux FJ, Kranenburg O, Cramer SJ et al.** Characterization of 911: a new helper cell line for the titration and propagation of early region 1-deleted adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* 1996; 7: 215-22.
48. **Farese RV.** Function and dysfunction of aPKC isoforms for glucose transport in insulin-sensitive and insulin-resistant states. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 283: E1-11.

49. **Farhang-Fallah J, Yin X, Trentin G, Cheng AM, Rozakis-Adcock M.** Cloning and Characterization of PHIP, a Novel Insulin Receptor Substrate-1 Pleckstrin Homology Domain Interacting Protein. *J.Biol.Chem.* 2000; 275: 40492-7.
50. **Fayard E, Tintignac LA, Baudry A, Hemmings BA.** Protein kinase B/Akt at a glance. *J.Cell Sci.* 2005; 118: 5675-8.
51. **Flores-Riveros JR, McLenithan JC, Ezaki O, Lane MD.** Insulin Down-Regulates Expression of the Insulin-Responsive Glucose Transporter (GLUT4) Gene: Effects on Transcription and mRNA Turnover. *PNAS* 1993; 90: 512-6.
52. **Frame S, Cohen P.** GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem.J.* 2001; 359: 1-16.
53. **Fujii N, Boppart MD, Dufresne SD et al.** Overexpression or ablation of JNK in skeletal muscle has no effect on glycogen synthase activity. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 287: C200-C208.
54. **Fujishiro M, Gotoh Y, Katagiri H et al.** Three mitogen-activated protein kinases inhibit insulin signaling by different mechanisms in 3T3-L1 adipocytes. *Mol.Endocrinol.* 2003; 17: 487-97.
55. **Fujita N, Sato S, Ishida A, Tsuruo T.** Involvement of Hsp90 in signaling and stability of 3-phosphoinositide-dependent kinase-1. *J.Biol.Chem.* 2002; 277: 10346-53.
56. **Gao T, Furnari F, Newton AC.** PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Mol.Cell* 2005; 18: 13-24.
57. **Gao Z, Hwang D, Bataille F et al.** Serine Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate 1 by Inhibitor kappa B Kinase Complex. *J.Biol.Chem.* 2002; 277: 48115-21.
58. **Gao Z, Zhang X, Zuberi A et al.** Inhibition of Insulin Sensitivity by Free Fatty Acids Requires Activation of Multiple Serine Kinases in 3T3-L1 Adipocytes. *Mol.Endocrinol.* 2004; 18: 2024-34.
59. **Gao Z, Zuberi A, Quon MJ, Dong Z, Ye J.** Aspirin Inhibits Serine Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate 1 in Tumor Necrosis Factor-treated Cells through Targeting Multiple Serine Kinases. *J.Biol.Chem.* 2003; 278: 24944-50.
60. **Giani G, Janka H, Hauner H et al.** Epidemiologie und Verlauf des Diabetes mellitus in Deutschland. *Evidenzbasierte Leitlinie DDG.* 2004; Aktualisierte Version auf den Webseiten der DDG „www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de“ /Evidenzbasierte Leitlinien/Epidemiologie.: Mai 2004 2).

61. **Goetz MP, Toft DO, Ames MM, Erlichman C.** The Hsp90 chaperone complex as a novel target for cancer therapy. *Ann.Onc.* 2003; 14: 1169-76.
62. **Goldstein BJ, Bittner-Kowalczyk A, White MF, Harbeck M.** Tyrosine dephosphorylation and deactivation of insulin receptor substrate-1 by protein-tyrosine phosphatase 1B. Possible facilitation by the formation of a ternary complex with the Grb2 adaptor protein. *J.Biol.Chem.* 2000; 275: 4283-9.
63. **Greene MW, Garofalo RS.** Positive and negative regulatory role of insulin receptor substrate 1 and 2 (IRS-1 and IRS-2) serine/threonine phosphorylation. *Biochemistry* 2002; 41: 7082-91.
64. **Greene MW, Sakaue H, Wang L, Alessi DR, Roth RA.** Modulation of Insulin-stimulated Degradation of Human Insulin Receptor Substrate-1 by Serine 312 Phosphorylation. *J.Biol.Chem.* 2003; 278: 8199-211.
65. **Gual P, Gonzalez T, Gremeaux T, Barres R, Marchand-Brustel Y, Tanti JF.** Hyperosmotic Stress Inhibits Insulin Receptor Substrate-1 Function by Distinct Mechanisms in 3T3-L1 Adipocytes. *J.Biol.Chem.* 2003; 278: 26550-7.
66. **Han Z, Pantazis P, Lange TS, Wyche JH, Hendrickson EA.** The staurosporine analog, Ro-31-8220, induces apoptosis independently of its ability to inhibit protein kinase C. *Cell Death Differ* 2000; 7: 521-30.
67. **Haruta T, Uno T, Kawahara J et al.** A Rapamycin-Sensitive Pathway Down-Regulates Insulin Signaling via Phosphorylation and Proteasomal Degradation of Insulin Receptor Substrate-1. *Mol.Endocrinol.* 2000; 14: 783-94.
68. **Hatano E, Brenner DA.** Akt protects mouse hepatocytes from TNF-alpha - and Fas-mediated apoptosis through NK-kappa B activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281: G1357-G1368.
69. **Hayden MS, Ghosh S.** Signaling to NF- κ B. *Genes & Dev.* 2004; 18: 2195-224.
70. **He J, Usui I, Ishizuka K et al.** Interleukin-1 α Inhibits Insulin Signaling with Phosphorylating Insulin Receptor Substrate-1 on Serine Residues in 3T3-L1 Adipocytes. *Mol.Endocrinol.* 2005; me.
71. **Henry RR, Ciaraldi TP, Mudaliar S, Abrams L, Nikoulina SE.** Acquired defects of glycogen synthase activity in cultured human skeletal muscle cells: influence of high glucose and insulin levels. *Diabetes* 1996; 45: 400-7.
72. **Hilder TL, Tou JC, Grindeland RE, Wade CE, Graves LM.** Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 serine 307 correlates with JNK activity in atrophic skeletal muscle. *FEBS Lett.* 2003; 553: 63-7.
73. **Hiraoka E, Kawashima S, Takahashi T et al.** TNF- α induces protein synthesis through PI3-kinase-Akt/PKB pathway in cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280: H1861-H1868.

74. **Hiratani K, Haruta T, Tani A, Kawahara J, Usui I, Kobayashi M.** Roles of mTOR and JNK in serine phosphorylation, translocation, and degradation of IRS-1. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2005; 335: 836-42.
75. **Hirosumi J, Tuncman G, Chang L et al.** A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 2002; 420: 333-6.
76. **Hongisto V, Smeds N, Brecht S, Herdegen T, Courtney MJ, Coffey ET.** Lithium Blocks the c-Jun Stress Response and Protects Neurons via Its Action on Glycogen Synthase Kinase 3. *Mol.Cell.Biol.* 2003; 23: 6027-36.
77. **Hori H, Sasaoka T, Ishihara H et al.** Association of SH2-Containing Inositol Phosphatase 2 With the Insulin Resistance of Diabetic db/db Mice. *Diabetes* 2002; 51: 2387-94.
78. **Horike N, Takemori H, Katoh Y et al.** Adipose-specific Expression, Phosphorylation of Ser794 in Insulin Receptor Substrate-1, and Activation in Diabetic Animals of Salt-inducible Kinase-2. *J.Biol.Chem.* 2003; 278: 18440-7.
79. **Hu FB, Manson JE, Stampfer MJ et al.** Diet, Lifestyle, and the Risk of Type 2 Diabetes Mellitus in Women. *N Engl J Med* 2001; 345: 790-7.
80. **Hundal RS, Petersen KF, Mayerson AB et al.** Mechanism by which high-dose aspirin improves glucose metabolism in type 2 diabetes. *J.Clin.Invest.* 2002; 109: 1321-6.
81. **Jaeschke A, Czech MP, Davis RJ.** An essential role of the JIP1 scaffold protein for JNK activation in adipose tissue. *Genes & Dev.* 2004; 18: 1976-80.
82. **Jakobsen SN, Hardie DG, Morrice N, Tornqvist HE.** 5'-AMP-activated Protein Kinase Phosphorylates IRS-1 on Ser-789 in Mouse C2C12 Myotubes in Response to 5-Aminoimidazole-4-carboxamide Riboside. *J.Biol.Chem.* 2001; 276: 46912-6.
83. **Jiang G, Dallas-Yang Q, Liu F, Moller DE, Zhang BB.** Salicylic Acid Reverses Phorbol 12-Myristate-13-Acetate (PMA)- and Tumor Necrosis Factor alpha (TNFalpha)-induced Insulin Receptor Substrate 1 (IRS1) Serine 307 Phosphorylation and Insulin Resistance in Human Embryonic Kidney 293 (HEK293) Cells. *J.Biol.Chem.* 2003; 278: 180-6.
84. **Kanai F, Nishioka Y, Hayashi H, Kamohara S, Todaka M, Ebina Y.** Direct demonstration of insulin-induced GLUT4 translocation to the surface of intact cells by insertion of a c-myc epitope into an exofacial GLUT4 domain. *J.Biol.Chem.* 1993; 268: 14523-6.
85. **Kane S, Sano H, Liu SCH et al.** A Method to Identify Serine Kinase Substrates. Akt PHOSPHORYLATES A NOVEL ADIPOCYTE PROTEIN WITH A Rab GTPASE-ACTIVATING PROTEIN (GAP) DOMAIN. *J.Biol.Chem.* 2002; 277: 22115-8.

86. **Kanoh Y, Bandyopadhyay G, Sajan MP, Standaert ML, Farese RV.** Thiazolidinedione Treatment Enhances Insulin Effects on Protein Kinase C- ζ / λ Activation and Glucose Transport in Adipocytes of Nondiabetic and Goto-Kakizaki Type II Diabetic Rats. *J.Biol.Chem.* 2000; 275: 16690-6.
87. **Karin M.** The Beginning of the End: I κ B Kinase (IKK) and NF- κ B Activation. *J.Biol.Chem.* 1999; 274: 27339-42.
88. **Kellerer M, Kroder G, Tippmer S et al.** Troglitazone prevents glucose-induced insulin resistance of insulin receptor in rat-1 fibroblasts. *Diabetes* 1994; 43: 447-53.
89. **Kerner W, Brückel J, Böhm B.** Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus. *Evidenzbasierte Leitlinie DDG.* 2004; Aktualisierte Version auf den Webseiten der DDG „www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de“ /Evidenzbasierte Leitlinien/Definition.: November 2004 1).
90. **Kim JK, Kim YJ, Fillmore JJ et al.** Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate. *J.Clin.Invest.* 2001; 108: 437-46.
91. **Kohn AD, Summers SA, Birnbaum MJ, Roth RA.** Expression of a Constitutively Active Akt Ser/Thr Kinase in 3T3-L1 Adipocytes Stimulates Glucose Uptake and Glucose Transporter 4 Translocation. *J.Biol.Chem.* 1996; 271: 31372-8.
92. **Kohn AD, Takeuchi F, Roth RA.** Akt, a Pleckstrin Homology Domain Containing Kinase, Is Activated Primarily by Phosphorylation. *J.Biol.Chem.* 1996; 271: 21920-6.
93. **Lam K, Carpenter CL, Ruderman NB, Friel JC, Kelly KL.** The phosphatidylinositol 3-kinase serine kinase phosphorylates IRS-1. Stimulation by insulin and inhibition by Wortmannin. *J.Biol.Chem.* 1994; 269: 20648-52.
94. **Lavan BE, Fantin VR, Chang ET, Lane WS, Keller SR, Lienhard GE.** A Novel 160-kDa Phosphotyrosine Protein in Insulin-treated Embryonic Kidney Cells Is a New Member of the Insulin Receptor Substrate Family. *J.Biol.Chem.* 1997; 272: 21403-7.
95. **Lavan BE, Lane WS, Lienhard GE.** The 60-kDa Phosphotyrosine Protein in Insulin-treated Adipocytes Is a New Member of the Insulin Receptor Substrate Family. *J.Biol.Chem.* 1997; 272: 11439-43.
96. **Lawlor MA, Alessi DR.** PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J.Cell Sci.* 2001; 114: 2903-10.
97. **Le Roith D, Zick Y.** Recent Advances in Our Understanding of Insulin Action and Insulin Resistance. *Diabetes Care* 2001; 24: 588-97.

98. **Lee YH, Giraud J, Davis RJ, White MF.** c-Jun N-terminal Kinase (JNK) Mediates Feedback Inhibition of the Insulin Signaling Cascade. *J.Biol.Chem.* 2003; 278: 2896-902.
99. **Lee YI, Seo M, Kim Y et al.** Membrane Depolarization Induces the Undulating Phosphorylation/Dephosphorylation of Glycogen Synthase Kinase 3{beta}, and This Dephosphorylation Involves Protein Phosphatases 2A and 2B in SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cells. *J.Biol.Chem.* 2005; 280: 22044-52.
100. **Letiges M, Plomann M, Standaert ML et al.** Knockout of PKC{alpha} Enhances Insulin Signaling Through PI3K. *Mol.Endocrinol.* 2002; 16: 847-58.
101. **Li J, Peet GW, Pullen SS et al.** Recombinant Ikappa B Kinases alpha and beta Are Direct Kinases of Ikappa Balpha. *J.Biol.Chem.* 1998; 273: 30736-41.
102. **Li Y, Soos TJ, Li X et al.** Protein Kinase C {theta} Inhibits Insulin Signaling by Phosphorylating IRS1 at Ser1101. *J.Biol.Chem.* 2004; 279: 45304-7.
103. **Li ZW, Chu W, Hu Y et al.** The IKKbeta Subunit of Ikappa B Kinase (IKK) is Essential for Nuclear Factor kappa B Activation and Prevention of Apoptosis. *J.Exp.Med.* 1999; 189: 1839-45.
104. **Liu LS, Spelleken M, Rohrig K, Hauner H, Eckel J.** Tumor necrosis factor-alpha acutely inhibits insulin signaling in human adipocytes: implication of the p80 tumor necrosis factor receptor. *Diabetes* 1998; 47: 515-22.
105. **Liu YF, Herschkovitz A, Boura-Halfon S et al.** Serine Phosphorylation Proximal to Its Phosphotyrosine Binding Domain Inhibits Insulin Receptor Substrate 1 Function and Promotes Insulin Resistance. *Mol.Cell.Biol.* 2004; 24: 9668-81.
106. **Liu YF, Paz K, Herschkovitz A et al.** Insulin Stimulates PKCzeta -mediated Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate-1 (IRS-1). A SELF-ATTENUATED MECHANISM TO NEGATIVELY REGULATE THE FUNCTION OF IRS PROTEINS. *J.Biol.Chem.* 2001; 276: 14459-65.
107. **Maegawa H, Ide R, Hasegawa M et al.** Thiazolidine Derivatives Ameliorate High Glucose-induced Insulin Resistance via the Normalization of Protein-tyrosine Phosphatase Activities. *J.Biol.Chem.* 1995; 270: 7724-30.
108. **Maehama T, Dixon JE.** The Tumor Suppressor, PTEN/MMAC1, Dephosphorylates the Lipid Second Messenger, Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate. *J.Biol.Chem.* 1998; 273: 13375-8.
109. **Menzaghi C, Plengvidhya N, Ma X, Warram JH, Shoelson SE, Doria A.** COMMENT: Genetic Variability in Insulin Action Inhibitor Ikk{beta} (IKKB) Does Not Play a Major Role in the Development of Type 2 Diabetes. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 2002; 87: 1894-7.

110. **Miller BS, Zandi E.** Complete reconstitution of human I κ B kinase (IKK) complex in yeast. Assessment of its stoichiometry and the role of IKK γ on the complex activity in the absence of stimulation. *J.Biol.Chem.* 2001; 276: 36320-6.
111. **Moeschel K, Beck A, Weigert C et al.** Protein Kinase C- ζ -induced Phosphorylation of Ser318 in Insulin Receptor Substrate-1 (IRS-1) Attenuates the Interaction with the Insulin Receptor and the Tyrosine Phosphorylation of IRS-1. *J.Biol.Chem.* 2004; 279: 25157-63.
112. **Mora A, Sabio G, Risco AM et al.** Lithium blocks the PKB and GSK3 dephosphorylation induced by ceramide through protein phosphatase-2A. *Cell Signal* 2002; 14: 557-62.
113. **Moscat J, Diaz-Meco MT.** The atypical protein kinase Cs: Functional specificity mediated by specific protein adapters. *EMBO Rep.* 2000; 1: 399-403.
114. **Mothe I, Van Obberghen E.** Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on multiple serine residues, 612, 632, 662, and 731, modulates insulin action. *J.Biol.Chem.* 1996; 271: 11222-7.
115. **Moxham CM, Tabrizchi A, Davis RJ, Malbon C.** jun N-terminal Kinase Mediates Activation of Skeletal Muscle Glycogen Synthase by Insulin in Vivo. *J.Biol.Chem.* 1996; 271: 30765-73.
116. **Muller HK, Kellerer M, Ermel B et al.** Prevention by protein kinase C inhibitors of glucose-induced insulin-receptor tyrosine kinase resistance in rat fat cells. *Diabetes* 1991; 40: 1440-8.
117. **Nelson BA, Robinson KA, Buse MG.** High glucose and glucosamine induce insulin resistance via different mechanisms in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* 2000; 49: 981-91.
118. **Nelson BA, Robinson KA, Buse MG.** Defective Akt activation is associated with glucose- but not glucosamine-induced insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 282: E497-E506.
119. **Nikolakaki E, Coffey PJ, Hemelsoet R, Woodgett JR, Defize LH.** Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates Jun family members in vitro and negatively regulates their transactivating potential in intact cells. *Oncogene* 1993; 8: 833-40.
120. **Ouwens DM, van der Zon GC, Pronk GJ et al.** A mutant insulin receptor induces formation of a Shc-growth factor receptor bound protein 2 (Grb2) complex and p21ras-GTP without detectable interaction of insulin receptor substrate 1 (IRS1) with Grb2. Evidence for IRS1-independent p21ras-GTP formation. *J.Biol.Chem.* 1994; 269: 33116-22.

121. **Ozes ON, Akca H, Mayo LD et al.** A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR pathway mediates and PTEN antagonizes tumor necrosis factor inhibition of insulin signaling through insulin receptor substrate-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 2001; 98: 4640-5.
122. **Ozes ON, Akca H, Mayo LD et al.** A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR pathway mediates and PTEN antagonizes tumor necrosis factor inhibition of insulin signaling through insulin receptor substrate-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 2001; 98: 4640-5.
123. **Pang DT, Sharma BR, Shafer JA, White MF, Kahn CR.** Predominance of tyrosine phosphorylation of insulin receptors during the initial response of intact cells to insulin. *J.Biol.Chem.* 1985; 260: 7131-6.
124. **Parker PJ, Murray-Rust J.** PKC at a glance. *J.Cell Sci.* 2004; 117: 131-2.
125. **Paz K, Liu YF, Shorer H et al.** Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1) by protein kinase B positively regulates IRS-1 function. *J.Biol.Chem.* 1999; 274: 28816-22.
126. **Pederson TM, Kramer DL, Rondinone CM.** Serine/Threonine Phosphorylation of IRS-1 Triggers Its Degradation: Possible Regulation by Tyrosine Phosphorylation. *Diabetes* 2001; 50: 24-31.
127. **Permutt MA, Wasson J, Cox N.** Genetic epidemiology of diabetes. *J.Clin.Invest.* 2005; 115: 1431-9.
128. **Pessin JE, Saltiel AR.** Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J.Clin.Invest.* 2000; 106: 165-9.
129. **Pirola L, Bonnafous S, Johnston AM, Chaussade C, Portis F, Van Obberghen E.** Phosphoinositide 3-Kinase-mediated Reduction of Insulin Receptor Substrate-1/2 Protein Expression via Different Mechanisms Contributes to the Insulin-induced Desensitization of Its Signaling Pathways in L6 Muscle Cells. *J.Biol.Chem.* 2003; 278: 15641-51.
130. **Pons S, Asano T, Glasheen E et al.** The structure and function of p55PIK reveal a new regulatory subunit for phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol.Cell.Biol.* 1995; 15: 4453-65.
131. **Pratt WB, Toft DO.** Regulation of Signaling Protein Function and Trafficking by the hsp90/hsp70-Based Chaperone Machinery. *Experimental Biology and Medicine* 2003; 228: 111-33.
132. **Qiao Ly, Goldberg JL, Russell JC, Sun XJ.** Identification of Enhanced Serine Kinase Activity in Insulin Resistance. *J.Biol.Chem.* 1999; 274: 10625-32.
133. **Rameh LE, Cantley LC.** The Role of Phosphoinositide 3-Kinase Lipid Products in Cell Function. *J.Biol.Chem.* 1999; 274: 8347-50.

134. **Ravichandran LV, Esposito DL, Chen J, Quon MJ.** Protein Kinase C-zeta Phosphorylates Insulin Receptor Substrate-1 and Impairs Its Ability to Activate Phosphatidylinositol 3-Kinase in Response to Insulin. *J.Biol.Chem.* 2001; 276: 3543-9.
135. **Ricort JM, Tanti JF, Van Obberghen E, Le M.** Alterations in insulin signalling pathway induced by prolonged insulin treatment of 3T3-L1 adipocytes. *Diabetologia* 1995; 38: 1148-56.
136. **Rohl M, Pasparakis M, Baudler S et al.** Conditional disruption of I{kappa}B kinase 2 fails to prevent obesity-induced insulin resistance. *J.Clin.Invest.* 2004; 113: 474-81.
137. **Rosenzweig T, Braiman L, Bak A, Alt A, Kuroki T, Sampson SR.** Differential Effects of Tumor Necrosis Factor- α on Protein Kinase C Isoforms α and δ Mediate Inhibition of Insulin Receptor Signaling. *Diabetes* 2002; 51: 1921-30.
138. **Rui L, Fisher TL, Thomas J, White MF.** Regulation of insulin/insulin-like growth factor-1 signaling by proteasome-mediated degradation of insulin receptor substrate-2. *J.Biol.Chem.* 2001; 276: 40362-7.
139. **Sano H, Kane S, Sano E et al.** Insulin-stimulated Phosphorylation of a Rab GTPase-activating Protein Regulates GLUT4 Translocation. *J.Biol.Chem.* 2003; 278: 14599-602.
140. **Sato S, Fujita N, Tsuruo T.** Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2000; 97: 10832-7.
141. **Schwabe RF, Bennett BL, Manning AM, Brenner DA.** Differential role of I kappa B kinase 1 and 2 in primary rat hepatocytes. *Hepatology* 2001; 33: 81-90.
142. **Shanley TP, Vasi N, Denenberg A, Wong HR.** The Serine/Threonine Phosphatase, PP2A: Endogenous Regulator of Inflammatory Cell Signaling. *J.Immunol.* 2001; 166: 966-72.
143. **Shepherd PR, Withers DJ, Siddle K.** Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem.J.* 1998; 333 (Pt 3): 471-90.
144. **Shulman GI.** Cellular mechanisms of insulin resistance. *J.Clin.Invest.* 2000; 106: 171-6.
145. **Sinha S, Perdomo G, Brown NF, O'Doherty RM.** Fatty Acid-induced Insulin Resistance in L6 Myotubes Is Prevented by Inhibition of Activation and Nuclear Localization of Nuclear Factor κ B. *J.Biol.Chem.* 2004; 279: 41294-301.
146. **Sizemore N, Lerner N, Dombrowski N, Sakurai H, Stark GR.** Distinct roles of the I kappa B kinase alpha and beta subunits in liberating nuclear factor

- kappa B (NF-kappa B) from Ikappa B and in phosphorylating the p65 subunit of NF-kappa B. *J.Biol.Chem.* 2002; 277: 3863-9.
147. **Sommerfeld MR, Metzger S, Stosik M, Tennagels N, Eckel J.** In vitro phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by protein kinase C-zeta: functional analysis and identification of novel phosphorylation sites. *Biochemistry* 2004; 43: 5888-901.
 148. **Standaert ML, Bandyopadhyay G, Antwi EK, Farese RV.** RO 31-8220 Activates c-Jun N-Terminal Kinase and Glycogen Synthase in Rat Adipocytes and L6 Myotubes. Comparison to Actions of Insulin. *Endocrinology* 1999; 140: 2145-51.
 149. **Standaert ML, Bandyopadhyay G, Antwi EK, Farese RV.** RO 31-8220 Activates c-Jun N-Terminal Kinase and Glycogen Synthase in Rat Adipocytes and L6 Myotubes. Comparison to Actions of Insulin. *Endocrinology* 1999; 140: 2145-51.
 150. **Standaert ML, Bandyopadhyay G, Sajan MP, Cong L, Quon MJ, Farese RV.** Okadaic Acid Activates Atypical Protein Kinase C (zeta /lambda) in Rat and 3T3/L1 Adipocytes. AN APPARENT REQUIREMENT FOR ACTIVATION OF GLUT4 TRANSLOCATION AND GLUCOSE TRANSPORT. *J.Biol.Chem.* 1999; 274: 14074-8.
 151. **Standaert ML, Bandyopadhyay G, Perez L et al.** Insulin Activates Protein Kinases C-zeta and C-lambda by an Autophosphorylation-dependent Mechanism and Stimulates Their Translocation to GLUT4 Vesicles and Other Membrane Fractions in Rat Adipocytes. *J.Biol.Chem.* 1999; 274: 25308-16.
 152. **Standaert ML, Galloway L, Karnam P, Bandyopadhyay G, Moscat J, Farese RV.** Protein Kinase C-zeta as a Downstream Effector of Phosphatidylinositol 3-Kinase during Insulin Stimulation in Rat Adipocytes. POTENTIAL ROLE IN GLUCOSE TRANSPORT. *J.Biol.Chem.* 1997; 272: 30075-82.
 153. **Standaert ML, Galloway L, Karnam P, Bandyopadhyay G, Moscat J, Farese RV.** Protein Kinase C-zeta as a Downstream Effector of Phosphatidylinositol 3-Kinase during Insulin Stimulation in Rat Adipocytes. POTENTIAL ROLE IN GLUCOSE TRANSPORT. *J.Biol.Chem.* 1997; 272: 30075-82.
 154. **Stoker AW.** Protein tyrosine phosphatases and signalling. *J.Endocrinol.* 2005; 185: 19-33.
 155. **Stokoe D, Stephens LR, Copeland T et al.** Dual Role of Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the Activation of Protein Kinase B. *Science* 1997; 277: 567-70.

156. **Storz P, Doppler H, Wernig A, Pfizenmaier K, Muller G.** Cross-talk mechanisms in the development of insulin resistance of skeletal muscle cells: Palmitate rather than tumour necrosis factor inhibits insulin-dependent protein kinase B (PKB)/Akt stimulation and glucose uptake. *FEBS J.* 1999; 266: 17-25.
157. **Sugita M, Sugita H, Kaneki M.** Increased Insulin Receptor Substrate 1 Serine Phosphorylation and Stress-Activated Protein Kinase/c-Jun N-Terminal Kinase Activation Associated With Vascular Insulin Resistance in Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension* 2004; 44: 484-9.
158. **Sun XJ, Goldberg JL, Qiao LY, Mitchell JJ.** Insulin-induced insulin receptor substrate-1 degradation is mediated by the proteasome degradation pathway. *Diabetes* 1999; 48: 1359-64.
159. **Sun XJ, Miralpeix M, Myers MG, Jr. et al.** Expression and function of IRS-1 in insulin signal transmission. *J.Biol.Chem.* 1992; 267: 22662-72.
160. **Taha C, Klip A.** The insulin signaling pathway. *J.Membr.Biol.* 1999; 169: 1-12.
161. **Takada Y, Fang X, Jamaluddin M, Boyd DD, Aggarwal BB.** Genetic Deletion of Glycogen Synthase Kinase-3{beta} Abrogates Activation of I{kappa}B{alpha} Kinase, JNK, Akt, and p44/p42 MAPK but Potentiates Apoptosis Induced by Tumor Necrosis Factor. *J.Biol.Chem.* 2004; 279: 39541-54.
162. **Tanasijevic MJ, Myers MG, Jr., Thoma RS, Crimmins DL, White MF, Sacks DB.** Phosphorylation of the insulin receptor substrate IRS-1 by casein kinase II. *J.Biol.Chem.* 1993; 268: 18157-66.
163. **Taylor V, Wong M, Brandts C et al.** 5' Phospholipid Phosphatase SHIP-2 Causes Protein Kinase B Inactivation and Cell Cycle Arrest in Glioblastoma Cells. *Mol.Cell.Biol.* 2000; 20: 6860-71.
164. **Toker A, Newton AC.** Akt/Protein Kinase B Is Regulated by Autophosphorylation at the Hypothetical PDK-2 Site. *J.Biol.Chem.* 2000; 275: 8271-4.
165. **Uchida T, Myers MG, Jr., White MF.** IRS-4 Mediates Protein Kinase B Signaling during Insulin Stimulation without Promoting Antiapoptosis. *Mol.Cell.Biol.* 2000; 20: 126-38.
166. **Ugi S, Imamura T, Maegawa H et al.** Protein Phosphatase 2A Negatively Regulates Insulin's Metabolic Signaling Pathway by Inhibiting Akt (Protein Kinase B) Activity in 3T3-L1 Adipocytes. *Mol.Cell.Biol.* 2004; 24: 8778-89.
167. **Uhlig M, Passlack W, Eckel J.** Functional role of Rab11 in GLUT4 trafficking in cardiomyocytes. *Mol Cell Endocrinol* 2005; 235: 1-9.

168. **Vanhaesebroeck B, Welham MJ, Kotani K et al.** p110delta , a novel phosphoinositide 3-kinase in leukocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 1997; 94: 4330-5.
169. **Virkamaki A, Ueki K, Kahn CR.** Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J.Clin.Invest* 1999; 103: 931-43.
170. **Wang QM, Fiol CJ, DePaoli-Roach AA, Roach PJ.** Glycogen synthase kinase-3 beta is a dual specificity kinase differentially regulated by tyrosine and serine/threonine phosphorylation. *J.Biol.Chem.* 1994; 269: 14566-74.
171. **Wang Q, Somwar R, Bilan PJ et al.** Protein Kinase B/Akt Participates in GLUT4 Translocation by Insulin in L6 Myoblasts. *Mol.Cell.Biol.* 1999; 19: 4008-18.
172. **Wegele H, Muller L, Buchner J.** Hsp70 and Hsp90--a relay team for protein folding. *Rev.Physiol Biochem.Pharmacol.* 2004; 151: 1-44.
173. **Wei Y, Pagliassotti MJ.** Hepatospecific effects of fructose on c-jun NH2-terminal kinase: implications for hepatic insulin resistance. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 2004; 287: E926-E933.
174. **Weigert C, Hennige AM, Brischmann T et al.** The phosphorylation of SER318 of insulin receptor substrate 1 is not per se inhibitory in skeletal muscle cells, but is necessary to trigger the attenuation of the insulin-stimulated signal. *J.Biol.Chem.* 2005; M506134200.
175. **Wellen KE, Hotamisligil GS.** Inflammation, stress, and diabetes. *J.Clin.Invest.* 2005; 115: 1111-9.
176. **Werner ED, Lee J, Hansen L, Yuan M, Shoelson SE.** Insulin Resistance Due to Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate-1 at Serine 302. *J.Biol.Chem.* 2004; 279: 35298-305.
177. **White MF.** The insulin signalling system and the IRS proteins. *Diabetologia* 1997; 40 Suppl 2: S2-17.
178. **White MF.** The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol.Cell Biochem.* 1998; 182: 3-11.
179. **White MF, Maron R, Kahn CR.** Insulin rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of a Mr-185,000 protein in intact cells. *Nature* 1985; 318: 183-6.
180. **White MF.** IRS proteins and the common path to diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 283: E413-E422.
181. **Whitehead JP, Clark SF, Urso B, James DE.** Signalling through the insulin receptor. *Curr.Opin.Cell Biol.* 2000; 12: 222-8.

182. **Yang J, Cron P, Good VM, Thompson V, Hemmings BA, Barford D.** Crystal structure of an activated Akt/protein kinase B ternary complex with GSK3-peptide and AMP-PNP. *Nat Struct Biol* 2002; 9: 940-4.
183. **Yenush L, Makati KJ, Smith-Hall J, Ishibashi O, Myers MG, Jr., White MF.** The Pleckstrin Homology Domain Is the Principle Link between the Insulin Receptor and IRS-1. *J.Biol.Chem.* 1996; 271: 24300-6.
184. **Yi Z, Luo M, Carroll CA, Weintraub ST, Mandarino LJ.** Identification of phosphorylation sites in insulin receptor substrate-1 by hypothesis-driven high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal.Chem.* 2005; 77: 5693-9.
185. **Yoshinari K, Kobayashi K, Moore R, Kawamoto T, Negishi M.** Identification of the nuclear receptor CAR:HSP90 complex in mouse liver and recruitment of protein phosphatase 2A in response to phenobarbital. *FEBS Lett.* 2003; 548: 17-20.
186. **Young JC, Moarefi I, Hartl FU.** Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *J.Cell Biol.* 2001; 154: 267-73.
187. **Yu B, Standaert M, Arnold T et al.** Effects of insulin on diacylglycerol/protein kinase-C signalling and glucose transport in rat skeletal muscles in vivo and in vitro. *Endocrinology* 1992; 130: 3345-55.
188. **Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J et al.** Reversal of Obesity- and Diet-Induced Insulin Resistance with Salicylates or Targeted Disruption of Ikkbeta. *Science* 2001; 293: 1673-7.
189. **Yun BG, Matts RL.** Hsp90 functions to balance the phosphorylation state of Akt during C2C12 myoblast differentiation. *Cell Signal.* 2005; 17: 1477-85.
190. **Zhande R, Mitchell JJ, Wu J, Sun XJ.** Molecular Mechanism of Insulin-Induced Degradation of Insulin Receptor Substrate 1. *Mol.Cell.Biol.* 2002; 22: 1016-26.
191. **Zhang H, Burrows F.** Targeting multiple signal transduction pathways through inhibition of Hsp90. *J.Mol.Med.* 2004; 82: 488-99.
192. **Zhang R, Luo D, Miao R et al.** Hsp90-Akt phosphorylates ASK1 and inhibits ASK1-mediated apoptosis. *Oncogene* 2005; 24: 3954-63.
193. **Zhang SQ, Kovalenko A, Cantarella G, Wallach D.** Recruitment of the IKK signalosome to the p55 TNF receptor: RIP and A20 bind to NEMO (IKKgamm) upon receptor stimulation. *Immunity.* 2000; 12: 301-11.
194. **Zhang Y, Qiu WJ, Liu DX, Neo SY, He X, Lin SC.** Differential Molecular Assemblies Underlie the Dual Function of Axin in Modulating the Wnt and JNK Pathways. *J.Biol.Chem.* 2001; 276: 32152-9.

195. **Zimmet P, Alberti KG, Shaw J.** Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 2001; 414: 782-7.
196. **Zolnierowicz S.** Type 2A protein phosphatase, the complex regulator of numerous signaling pathways. *Biochem.Pharmacol.* 2000; 60: 1225-35.

7 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1 Schematische Darstellung des Insulinrezeptorsubstrats 1	12
Abb. 2 Schematische Darstellung der Insulin-Signalkaskade.....	14
Abb. 3 Inhibitorische Serinphosphorylierung des IRS-1	18
Abb. 4 Aminosäuresequenz des wildtyp rIRS-1 ⁴⁴⁹⁻⁶⁶⁴ Fusionsproteins.....	34
Abb. 5 Zweidimensionale Auftrennung tryptischer Peptide des IRS-1 Fusionsproteins nach einer Phosphorylierung mit PKC ζ	38
Abb. 6 Serinphosphorylierung von IRS-1	46
Abb. 7 Spezifische Phosphorylierung des IRS-1 Fusionsproteins durch die PKC ζ ..	48
Abb. 8 <i>In vitro</i> Phosphorylierung des IRS-1 Fusionsproteins mit IKK-Komplex	49
Abb. 9 HPLC-Profil nach Phosphorylierung mittels IKK-Komplex.....	50
Abb. 10 <i>In vitro</i> Phosphorylierung des IRS-1 Fusionsproteins mit MEKK1	51
Abb. 11 HPLC-Profil nach Phosphorylierung mittels MEKK1	52
Abb. 12 <i>In vitro</i> Phosphorylierung des IRS-1 Fusionsproteins mit IKK β	53
Abb. 13 HPLC-Profil nach Phosphorylierung mittels IKK β	53
Abb. 14 MALDI-Analyse: Vergleich <i>in vitro</i> phosphorylierter und dephosphorylierter tryptischer Peptide des IRS-1 Fusionsproteins	56
Abb. 15 MALDI-Analyse: Vergleich <i>in vitro</i> phosphorylierter und unbehandelter tryptischer Peptide des IRS-1 Fusionsproteins	56
Abb. 16 Aktivierung der IKK und JNK in Kardiomyoblasten	58
Abb. 17 Auswirkungen aktivierter IKK auf die Tyrosinphosphorylierung von IRS-1..	59
Abb. 18 Auswirkungen aktivierter JNK auf die Tyrosinphosphorylierung von IRS-1.	60
Abb. 19 Einfluss aktivierter IKK auf die IRS-1/PI3-K Interaktion	61
Abb. 20 Einfluss aktivierter JNK auf die IRS-1/PI3-K Interaktion	62
Abb. 21 Aktivierung der IKK und JNK hat keinen Einfluss auf die Expression von Akt und GSK3	63
Abb. 22 Einfluss aktiverter IKK auf die Akt Phosphorylierung.....	64
Abb. 23 Einfluss aktivierter JNK auf die Serinphosphorylierung von Akt.....	65
Abb. 24 Einfluss aktivierter JNK auf die Threoninphosphorylierung von Akt	66
Abb. 25 Einfluss aktivierter IKK auf die Phosphorylierung von GSK3.....	67
Abb. 26 Einfluss aktivierter JNK auf die Phosphorylierung von GSK3.....	68
Abb. 27 Translokation von rekombinantem GLUT4 zur Plasmamembran	69

Abb. 28 Auswirkungen einer 18-Stündigen Aktivierung der IKK auf die Phosphorylierung der Akt.....	71
Abb. 29 Phosphorylierung des endogenen IRS-1 an Ser307	72
Abb. 30 Schematische Darstellung von pCMV HA hIRS-1	73
Abb. 31 Phosphorylierung von überexprimiertem IRS-1 an Ser307	74
Abb. 32 Schematische Darstellung der Resistenzinduktion.....	76
Abb. 33 Induktion der Insulinresistenz mit Glucose und Insulin.....	77
Abb. 34 Induktion der Insulinresistenz – Charakterisierung des Resistenzmodells..	78
Abb. 35 Expression des Insulinrezeptors	79
Abb. 36 Insulinabhängige Phosphorylierung des Insulinrezeptors	80
Abb. 37 Signalweiterleitung auf der Ebene von IRS-1.....	81
Abb. 38 Unveränderte PDK1 Phosphorylierung nach Resistenzinduktion.....	82
Abb. 39 Insulinresistenz auf der Ebene der GSK3	83
Abb. 40 Translokation von GLUT4 Vesikeln.....	84
Abb. 41 Inhibierung der IKK im Zellmodell	85
Abb. 42 Inhibierung der JNK im Zellmodell.....	86
Abb. 43 Inhibierung der GSK3 im Zellmodell.....	87
Abb. 44 Inhibierung von mTOR im Zellmodell	88
Abb. 45 Inhibierung der PKC-Subtypen mittels Ro 31-8220 (BIM).....	89
Abb. 46 Aktivierung transient überexprimierter PKC ζ durch Insulin.....	90
Abb. 47 Transiente Überexpression von PKC ζ im Resistenzmodell.....	91
Abb. 48 Inhibierung von Hsp90 im Resistenzmodell	93
Abb. 49 Abnahme der induzierbaren Insulinresistenz nach Inhibierung von Hsp90.	93
Abb. 50 Vergleich der Dephosphorylierungsraten von Akt	95
Abb. 51 Potentielle IKK β Phosphorylierungsstellen in der Sequenz des IRS-1 der Ratte	101
Abb. 52 Übersicht der Auswirkungen aktivierter Serinkinasen auf die Weiterleitung des Insulinsignals auf verschiedenen Ebenen der Signalkaskade.....	108
Abb. 53 Auswirkungen der Resistenzinduktion auf die Signalweiterleitung auf verschiedenen Ebenen der Insulinsignalkaskade	114
Abb. 54 Mögliche Mechanismen der Hsp90-Wirkung	116

8 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Zuordnung der bekannten tryptischen Peptide des IRS-1 Fusionsproteins
..... 54

9 DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde am Deutschen Diabetes-Zentrum an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf ausgeführt und durch Zuschüsse von Aventis Pharma, Frankfurt, unterstützt.

Danken möchte ich an dieser Stelle:

Prof. Dr. Jürgen Eckel für das interessante Thema, für seine Offenheit und unermüdliche Diskussionsbereitschaft, experimentelle Anregungen, sein Interesse am Fortschreiten der Dissertation, vielfältige Ratschläge und nicht zuletzt dafür, dass er es mir ermöglicht hat, durch die Teilnahme an einer Reihe von Kongressen wertvolle Ideen für diese Arbeit zu sammeln.

Prof. Dr. Frank Wunderlich für die bereitwillige Übernahme des Koreferats und das Interesse an dieser Arbeit.

Dr. Norbert Tennagels für interessante fachliche Diskussionen.

Dr. Jochen Kruip und Dr. Carsten Corvey für die Leitung der massenspektrometrischen Analysen.

Karin Deckers-Thomas für die Hilfestellung bei der Etablierung des Resistenzmodells.

meinen Mitdoktoranden und allen Mitarbeitern der AG Eckel für die freundliche Atmosphäre, kollegiale Hilfe, gegenseitige Rücksichtnahme und konstruktive Zusammenarbeit.

Gerd Vogt für seine Geduld und Beistand in allen Lebenslagen.

und ganz besonders meinen Eltern für Ihre Unterstützung und aufmunternde Worte.

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 10.05.2006

Magdalene Stosik