

**Untersuchungen zum Einfluss der Rab-GTPase
Rab11A auf die Insulin-stimulierte Translokation des
Glucosetransporters GLUT4 in Muskelzellen**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Mathias Uhlig
aus Döbeln / Sa.

2006

Aus dem Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie
des Deutschen Diabetes-Zentrums
- Leibniz-Institut an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf -

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

Referent: Prof. Dr. Jürgen Eckel

Koreferent: Prof. Dr. Rolf Wagner

Tag der mündlichen Prüfung: 20.06.2006

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit entstand auf Anregung und unter der Leitung von Herrn **Prof. Dr. Jürgen Eckel** im Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie am Deutschen Diabetes-Zentrum - Leibniz-Institut an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Herrn Prof. Eckel gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas, die intensive fachliche Betreuung, sein entgegengebrachtes Interesse an meiner Arbeit, seine hilfreichen Ratschläge und konstruktiven Ideen sowie die stets vorhandene Bereitschaft zur wissenschaftlichen Diskussion. Außerdem ermöglichte er mir die Teilnahme an nationalen und internationalen Kongressen, bei denen ich wertvolle Anregungen und Ideen für die Anfertigung der vorliegenden Arbeit sammeln konnte.

Herrn **Prof. Dr. Rolf Wagner**, Institut für Physikalische Biologie an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, möchte ich herzlich für die Übernahme des Koreferates und das Interesse an der Arbeit danken.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) danke ich für die finanzielle Förderung der vorliegenden Arbeit im Rahmen der DFG-Forschergruppe 441 „Mechanismen der normalen und gestörten Insulinwirkung“ (Teilprojekt 3: EC 64/9-1, EC 64/9-2).

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 Diabetes mellitus	2
1.1.1 Typ 1-Diabetes	2
1.1.2 Typ 2-Diabetes	3
1.1.3 Prävalenz und epidemiologische Prognose des Diabetes mellitus	4
1.2 Familie der Glucosetransporter-Proteine	5
1.3 Glucosetransporter GLUT4	8
1.3.1 Strukturelle Organisation des Glucosetransporters GLUT4	8
1.3.2 GLUT4 als Mediator der Glucosetransport-Aktivität	9
1.3.3 Glucosetransporter in Muskelzellen	10
1.3.4 Transgene GLUT4-Tiermodelle	11
1.4 Insulinsignaltransduktion	12
1.4.1 Insulin	12
1.4.2 Insulinrezeptor	13
1.4.3 Phosphatidylinositol-3-Kinase-vermittelte Insulinsignalkaskade	16
1.4.4 Cbl / CAP-vermittelte Insulinsignalkaskade	20
1.5 Insulin-stimulierte Translokation des Glucosetransporters GLUT4	22
1.5.1 Aktin-Zytoskelett und Translokation von GLUT4	24
1.5.2 SNARE-Proteine und Translokation von GLUT4	25
1.5.3 Rab-Proteine und Translokation von GLUT4	26
1.6 Familie der Rab-Proteine	28
1.6.1 Klassifikation der Rab-Proteine	30
1.6.2 Strukturelle Organisation der Rab-Proteine	30
1.6.3 Enzymatische Aktivität der Rab-Proteine	33
1.6.4 Posttranslationale Modifikationen der Rab-Proteine	34
1.6.5 GDP-GTP-Zyklus der Rab-Proteine	35
1.6.6 Rab-spezifische Effektorproteine	38
1.7 Rab-Protein Rab11A	40
1.7.1 Allgemeiner Überblick	40

1.7.2 Rab11-spezifische Effektorproteine	43
1.8 Ziel der Arbeit	47
2. MATERIAL UND METHODEN	48
2.1 Chemikalien	49
2.2 Fertigprodukte und Reagenzienkits	50
2.3 Enzyme	51
2.4 Vektoren	52
2.5 Bakterienstämme	52
2.6 Primärzellen und Zelllinien	53
2.7 Antikörper	53
2.7.1 Primärantikörper	53
2.7.2 Sekundärantikörper	54
2.8 Puffer und Lösungen	54
2.9 Geräte und Verbrauchsmaterialien	57
2.10 Zellkultur	58
2.10.1 Primärzellen und Zelllinien	59
2.10.1.1 Humane Skelettmuskelzellen	59
2.10.1.2 Ratten-Kardiomyoblasten-Zelllinie H9c2-E2	59
2.10.1.3 HEK-293- und HeLa-Zellen	59
2.10.2 Zellkultivierung	59
2.10.2.1 Kultivierung von humanen Skelettmuskelzellen	60
2.10.2.2 Kultivierung von Zelllinien	61
2.11 Molekularbiologische Methoden	63
2.11.1 RNA-Techniken	63
2.11.1.1 Isolation von Gesamt-RNA aus Primärzellen und Zelllinien	63
2.11.1.2 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Gesamt-RNA	64
2.11.1.3 Analyse der Integrität von Gesamt-RNA	64
2.11.1.4 Reverse Transkription - Polymerase-Kettenreaktion	64
2.11.2 DNA-Techniken	65
2.11.2.1 Polymerase-Kettenreaktion	65

2.11.2.2 Mutagenese-Polymerase-Kettenreaktion	67
2.11.2.3 Auftrennung und Visualisierung von DNA	68
2.11.2.4 Reinigung von DNA	69
2.11.2.5 Bestimmung von DNA-Konzentration und -Reinheit	69
2.11.2.6 Modifikation von DNA mit Restriktionsendonukleasen	70
2.11.2.7 Ligation von DNA	70
2.11.2.8 Transformation von <i>E. coli</i> - Zellen	72
2.11.2.9 Präparation von Plasmid-DNA	73
2.11.2.10 Sequenzierung von Plasmid-DNA	74
2.12 Proteinanalytische Methoden	74
2.12.1 Zelllysis	74
2.12.2 Bestimmung von Proteinkonzentration	75
2.12.3 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen	75
2.12.4 Proteintransfer	75
2.12.5 Protein-Färbetechniken	76
2.12.6 Immundetektion mit verstärkter Chemilumineszenz	77
2.13 Transiente Transfektion von H9c2-E2-Zellen	78
2.14 Adenovirale Infektion von humanen Skelettmuskelzellen	79
2.14.1 Herstellung von rekombinanten Viruspartikeln	79
2.14.1.1 Herstellung von rekombinanten adenoviralen Donorvektoren	79
2.14.1.2 Homologe Rekombination	82
2.14.1.3 Amplifikation von rekombinanter adenoviraler Plasmid-DNA	82
2.14.1.4 Linearisierung von rekombinanter adenoviraler Plasmid-DNA	83
2.14.1.5 Calciumphosphat-Transfektion von HEK-293-Zellen	83
2.14.1.6 Amplifikation von rekombinanten Viruspartikeln	84
2.14.1.7 Reinigung von rekombinanten Viruspartikeln	85
2.14.1.8 Bestimmung der Konzentration von rekombinanten Viruspartikeln	86
2.14.1.9 Analyse der Replikationsdefizienz von rekombinanten Viruspartikeln	87
2.14.2 Adenovirale Infektion der humanen Skelettmuskelzellen	88
2.15 Enzymatische Aktivität von Rab11A	88
2.15.1 Herstellung von GST-Rab11A-Fusionsproteinen	88
2.15.1.1 Expression von GST-Rab11A-Fusionsproteinen	88

2.15.1.2 Reinigung von GST-Rab11A-Fusionsproteinen	89
2.15.2 Bestimmung der enzymatischen Aktivität der GST-Rab11A-Fusionsproteine	90
2.16 Insulin-stimulierte Glucoseaufnahme	91
2.16.1 Insulin-stimulierte Glucoseaufnahme in H9c2-E2-Zellen	91
2.16.2 Insulin-stimulierte Glucoseaufnahme in humanen Skelettmuskelzellen	92
2.17 Insulin-stimulierte Translokation des Glucosetransporters GLUT4	93
2.17.1 Insulin-stimulierte Translokation von GLUT4myc in H9c2-E2-Zellen	93
2.17.2 Insulin-stimulierte Translokation von GLUT4myc in humanen Skelettmuskelzellen	95
2.18 Subzelluläre Lokalisation von GLUT4myc-enthaltenden Membranvesikeln	95
2.19 Berechnungsverfahren und Statistik	97
3. ERGEBNISSE	99
3.1 Klonierung der Rab11A- und GLUT4myc-cDNA	100
3.1.1 Isolation der Gesamt-RNA	100
3.1.2 Herstellung der Rab11A-cDNA	101
3.1.3 Herstellung von pCMV-Rab11A	101
3.1.4 Herstellung von pCMV-Rab11A N124I	104
3.1.5 Herstellung von pCMV-GLUT4myc	104
3.2 Enzymatische Aktivität von Rab11A	105
3.2.1 Herstellung des Expressionsvektors pGEX-5X-3-Rab11A R70	106
3.2.2 Herstellung der Expressionsvektoren pGEX-5X-3-Rab11A L70 und -Rab11A Q70	107
3.2.3 Expression der GST-Rab11A-Fusionsproteine	107
3.2.4 Reinigung der GST-Rab11A-Fusionsproteine	108
3.2.5 Bestimmung der enzymatischen Aktivität von Rab11A-Fusionsproteinen	109
3.3 Transiente Transfektion von H9c2-E2-Zellen	111
3.4 Adenovirale Infektion von humanen Skelettmuskelzellen	115
3.4.1 Herstellung der rekombinanten adenoviralen Donorvektoren	115
3.4.2 Homologe Rekombination	118
3.4.3 Herstellung der rekombinanten Viruspartikel	119
3.4.4 Adenovirale Infektion der humanen Skelettmuskelzellen	120

3.5 Insulin-stimulierte Glucoseaufnahme	123
3.5.1 Insulin-stimulierte Glucoseaufnahme in H9c2-E2-Zellen	123
3.5.2 Insulin-stimulierte Glucoseaufnahme in humanen Skelettmuskelzellen	125
3.6 Insulin-stimulierte Translokation des Glucosetransporters GLUT4	127
3.6.1 Insulin-stimulierte Translokation von GLUT4myc in H9c2-E2-Zellen	128
3.6.2 Insulin-stimulierte Translokation von GLUT4myc in humanen Skelettmuskelzellen	130
3.7 Subzelluläre Lokalisation von GLUT4-enthaltenden Membranvesikeln	131
4. DISKUSSION	136
4.1 Rab11A und die Insulin-stimulierte Translokation von GLUT4	137
4.2 Enzymatische Aktivität von Rab11A	151
5. ZUSAMMENFASSUNG	155
6. LITERATURVERZEICHNIS	158
7. ANHANG	204
7.1 Abbildungsverzeichnis	205
7.2 Tabellenverzeichnis	206
7.3 Abkürzungsverzeichnis	207
7.4 Größen und Einheiten	209
7.5 Publikationsverzeichnis	210

LEBENS LAUF

DANKSAGUNG

1 EINLEITUNG

1.1 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus ist eine Stoffwechselerkrankung, deren Symptome bereits seit mehr als 3500 Jahren bekannt sind. Die Bezeichnung Diabetes (griech.: Durchfluss) wurde etwa im 2. Jahrhundert durch den griechischen Arzt Aretaios von Kappadokien aufgrund einer erhöhten Flüssigkeitsaufnahme und Polyurie bei betroffenen Personen geprägt. Spätestens im 17. Jahrhundert wurde das Hauptsymptom, die erhöhte Menge einer „zuckerähnlichen Substanz“ im Harn, beschrieben und durch den Nachweis von Zucker im 18. Jahrhundert bestätigt [Dobson, 1776]. Aufgrund des süßlichen Geschmacks des Harns entstand die Gesamtbezeichnung Diabetes mellitus (mellitus [lat.]: Honig, süß).

Gegenwärtig wird die Erkrankung Diabetes mellitus gemäß der evidenzbasierten Leitlinie der Deutschen Diabetes-Gesellschaft (DDG) als eine heterogene Störung des Stoffwechsels definiert, deren Leitbefund die chronische Hyperglykämie ist. Ursächlich dafür ist entweder eine gestörte Insulinsekretion oder eine unzureichende Insulinwirkung bzw. die Präsenz beider Dysfunktionen [Kerner *et al.*, 2004]. Als Diagnosekriterium der Erkrankung wurde die Konzentration der Nüchternblutglucose definiert, die bei Patienten mit Diabetes mellitus im kapillären Vollblut wiederholt größer als 7,0 mM ist oder während der Durchführung des oralen Glucosetoleranz-Testes nach zwei Stunden mehr als 11,1 mM beträgt.

Entsprechend den Richtlinien der Weltgesundheitsorganisation (WHO) und der Amerikanischen Diabetes-Gesellschaft (ADA) wird die Erkrankung Diabetes mellitus aufgrund der unterschiedlichen Ätiologie in zwei Hauptformen, Typ 1- und Typ 2-Diabetes, klassifiziert [Alberti & Zimmet, 1998]. Weitere spezifische Diabetesformen entstehen durch Erkrankungen des exokrinen Pankreas, Endokrinopathien, genetische Defekte der β -Zell-Funktion bzw. der Insulinwirkung oder während der Schwangerschaft.

1.1.1 Typ 1-Diabetes

Bei Patienten mit Typ 1-Diabetes liegt durch den Einfluss von genetischen und umweltbedingten Faktoren eine autoimmun-vermittelte Zerstörung der β -Zellen der Langerhansschen Inseln des Pankreas vor, die zu einem absoluten Insulinmangel führt [Eisenbarth, 2004; von Herrath, 2004]. Die betroffenen Personen erkranken meist im Kindesalter und zeigen Symptome wie Polyurie, Polydipsie und Ketoazidose. Patienten mit Typ 1-Diabetes können nur durch eine exogene Insulingabe therapiert werden, um die Entstehung des hyperglykämischen Koma im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung zu verhindern.

1.1.2. Typ 2-Diabetes

Der Typ 2-Diabetes, an dem ca. 90 % aller Diabetes-Patienten erkranken, ist eine chronisch progrediente Erkrankung, die durch eine vererbte oder erworbene Insulinresistenz und eine Störung der Insulinsekretion charakterisiert wird [Håring & Matthaei, 2002]. Die Manifestation des Typ 2-Diabetes ist durch das komplexe Zusammenspiel von genetischer Prädisposition, Alter und exogenen Faktoren wie Ernährungsgewohnheiten und körperlicher Aktivität bedingt und häufig mit dem Auftreten von arterieller Hypertonie und Adipositas im Rahmen des Metabolischen Syndroms assoziiert [DeFronzo, 1997 a; Miranda *et al.*, 2005].

Die Entstehung der Insulinresistenz in peripheren Geweben wird heute als Ausgangspunkt der Pathogenese des Typ 2-Diabetes diskutiert und stellt den Schwerpunkt bei der Erforschung der molekularen Ursachen dieser Erkrankung dar [Koistinen & Zierath, 2002]. Die Insulinresistenz der Skelettmuskelzellen führt durch die Verringerung der Insulin-stimulierten Glucoseaufnahme zu einer langanhaltenden postprandialen Hyperglykämie, die bereits 20 Jahre vor der Manifestation von klinischen Symptomen erstmals auftreten kann [Eriksson *et al.*, 1992; Henriksen *et al.*, 1994; Krook *et al.*, 2000].

Die Sezernierung von Insulin aus den pankreatischen β -Zellen ist bei Patienten mit Typ 2-Diabetes ebenfalls gestört [DeFronzo, 1997 b]. Nach einem Glucosestimulus ist der initiale Anstieg der Insulinkonzentration verringert oder fehlt, sodass lediglich eine langsame und längerwährende Phase der Insulinsekretion die Aufrechterhaltung der Glucosehomöostase realisiert [Goldstein, 2003]. Die dabei entstehende Verlängerung der postprandialen Hyperglykämie induziert eine Hyperinsulinämie, da die Insulinsynthese und -sekretion in den pankreatischen β -Zellen zunimmt. Die Hyperinsulinämie führt zuerst zu einer Kompensation der Insulinresistenz und im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung zu einer Verstärkung der Insulinresistenz aufgrund einer verringerten Stimulierbarkeit der Insulinrezeptoren. Langfristig führt dieser Kompensationsmechanismus zu einer progredienten Hyperglykämie und „Erschöpfung“ der pankreatischen β -Zellen [Boitard, 2002].

Für die Entstehung des Typ 2-Diabetes wird die Adipositas als Hauptursache angesehen. Ergebnisse einer prospektiven Kohortenstudie aus den USA („Nurse“-Studie) zeigten, dass die Zunahme des *Body Mass Index* (BMI) mit einer exponentiellen Erhöhung des Diabetesrisikos verbunden ist [Friedman *et al.*, 1992; Colditz *et al.*, 1995]. Infolge von Bewegungsmangel und unausgewogener Ernährung nimmt der Anteil übergewichtiger (BMI: 25 - 29,9 kg/m²) bzw. adipöser (BMI: > 30 kg/m²) Kinder und Jugendlicher überproportional zu und führt bereits in dieser Altersgruppe zur Entstehung des Typ 2-Diabetes.

Die Auswertung von Interventionsstudien ergab, dass sich bereits durch eine Gewichtsreduktion der Probanden das Risiko einer Manifestation des Typ 2-Diabetes verringert [Knowler *et al.*, 2002]. Nach Angaben der DDG lässt sich die Wahrscheinlichkeit, an Typ 2-Diabetes zu erkranken, mit einer nicht-pharmakologischen antihyperglykämischen Therapie um 70 - 80 % senken. Dazu zählen u.a. eine ausgewogene Ernährung mit ballaststoffreicher Kost und limitierter Fettzufuhr, insbesondere gesättigter Fettsäuren, sowie eine Erhöhung der körperlichen Aktivität.

Die chronische Hyperglykämie verursacht bei Patienten mit Typ 2-Diabetes häufig eine Vielzahl von Folgeerkrankungen, die zunehmend die Prognose und den Schweregrad der Diabetes-Erkrankung bestimmen [Scherthaner, 1996; Turner, 1998]. Durch mikroangiopathische Spät komplikationen entstehen Kapillarschäden u.a. in den renalen Glomeruli (diabetische Nephropathie), in der Retina (diabetische Retinopathie) oder im peripheren Nervensystem (diabetische Neuropathie). Infolgedessen können vollständiges Nierenversagen, Erblindung bzw. Denervationen auftreten [Nathan, 1993]. Zusätzlich führen atherosklerotische Gefäßveränderungen der Koronararterien und großen Gefäße bei 80 % aller Patienten mit Typ 2-Diabetes zu Makroangiopathien, die mit einem erhöhten Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen wie Myokardinfarkt und Schlaganfall verbunden sind [Davis *et al.*, 1999; Sowers *et al.*, 2001]. Durch die erhöhte Morbidität und Mortalität der betroffenen Patienten steht die Diagnose Diabetes mellitus an vierter Stelle der Todesursachen in den Industrieländern.

1.1.3 Prävalenz und epidemiologische Prognose des Diabetes mellitus

Im Jahr 2003 waren nach Angaben der Internationalen Diabetes-Föderation (IDF) weltweit knapp 190 Millionen Menschen an Diabetes mellitus erkrankt, das entspricht ca. 5 % der erwachsenen Bevölkerung. Etwa 65 % aller Diabetiker leben in Entwicklungs- und Schwellenländern. In Deutschland entwickelt jeder Dritte im Laufe seines Lebens einen Typ 2-Diabetes, der häufig ab dem 40. Lebensjahr, vor allem aber nach dem 60. Lebensjahr auftritt [Giani *et al.*, 2004]. Dabei ist die Häufigkeit der Erkrankung bei Frauen vor Erreichen des 60. Lebensjahres niedriger als bei Männern und danach um 10 % erhöht im Vergleich zu Männern. Derzeit sind nach Angaben der Deutschen Diabetes-Stiftung (DDS) ca. 8 Millionen Menschen in Deutschland an Diabetes mellitus erkrankt [DDS-Report, 2004]. Diese Zahl wird bis zum Jahr 2010 auf 10 Millionen ansteigen. Neben dem individuellen Leid der betroffenen Personen verursacht die Volkskrankheit Diabetes mellitus erhebliche sozioökonomische

Kosten, die derzeit ca. 30 Milliarden Euro betragen und etwa 15 % des Gesamtetats der Krankenkassen ausmachen [Köster *et al.*, 2005].

Aufgrund zahlreicher Faktoren wie zunehmender Lebenserwartung, Bevölkerungswachstum, veränderter Ernährungsgewohnheiten, häufig mangelnder körperlicher Aktivität und früherer Diagnosestellung ist in den nächsten Jahren weltweit mit einem dramatischen Anstieg der Zahl Diabetes-Erkrankter zu rechnen. Aktuellen Hochrechnungen von IDF und WHO zufolge werden im Jahr 2025 weltweit etwa 335 Millionen Menschen an Diabetes mellitus erkrankt sein [IDF Diabetes Atlas, 2003]. Dabei wird sich die Zahl der Diabetiker in den Entwicklungs- und Schwellenländern Afrikas sowie im Nahen und Mittleren Osten voraussichtlich verdreifachen. In Nord- und Südamerika wird sich die Prävalenz der Diabetes-Erkrankung verdoppeln und in Europa um 50 % zunehmen.

Die dargestellten Zahlen verdeutlichen die Relevanz der diabetologischen Forschung, die pathophysiologischen Mechanismen des Typ 2-Diabetes auf molekularer Ebene weiter zu charakterisieren und die Interaktion der Gewebe und Organe zu verstehen, die an der Entstehung der chronischen Hyperglykämie beteiligt sind oder deren Funktion durch diabetische Folgeschäden beeinträchtigt wird. Dadurch können weitere Möglichkeiten für die gezielte pharmakologisch-antihyperglykämische Therapie von Patienten mit Typ 2-Diabetes geschaffen werden.

1.2 Familie der Glucosetransporter-Proteine

Glucose ist ein wichtiger Nährstoff, dessen Zufuhr, Verteilung, Speicherung und Metabolismus die Energiebilanz eines Organismus maßgeblich bestimmt. Für die zelluläre Aufnahme von Glucose existieren in Säugerzellen zwei unterschiedliche Gruppen von Glucosetransportern. Die Natriumion-abhängigen Glucose-Co-Transporter sind überwiegend in der apikalen Membran von Dünndarm- und Nierenepithelzellen lokalisiert. Der Glucosetransport erfolgt zusammen mit Natriumionen energieabhängig unter Beteiligung der Na^+ / K^+ -ATPase entgegen des Glucose-Konzentrationsgradienten [Koepsell & Spangenberg, 1994]. Im Gegensatz dazu agieren die Hexosetransporter der Glucosetransporter-Familie energieunabhängig und entlang des Glucose-Konzentrationsgradienten [Mueckler *et al.*, 1994].

Die Hexosetransporter der Glucosetransporter (GLUT)-Familie sind transmembranäre Proteine, die wässrige Poren in der Plasmamembran bilden. Durch diese selektive Permeabilitätserhöhung der Plasmamembran wird die Diffusion von Glucose und anderen

Hexosen aus dem Blutkreislauf und weiteren extrazellulären Flüssigkeiten in das Zytoplasma erleichtert [Mueckler *et al.*, 1994]. Die Hexosetransporter der GLUT-Familie werden in allen Zelltypen exprimiert und unterscheiden sich sowohl bezüglich ihrer Substratspezifität und kinetischen Eigenschaften als auch in ihrer gewebespezifischen und subzellulären Lokalisation. Bisher wurden 14 verschiedene Transportproteine identifiziert und aufgrund ihrer Sequenzhomologie der GLUT-Familie zugeordnet (siehe Tab. 1, S. 7), die in drei Klassen unterteilt wird [Joost & Thorens, 2001; Joost *et al.*, 2002].

Die Klasse I besteht aus GLUT1, GLUT2, GLUT3 und GLUT4, deren Sequenzhomologie bis zu 65 % beträgt und die sich hauptsächlich in ihrer gewebespezifischen Verteilung unterscheiden [Bell *et al.*, 1990; Joost & Thorens, 2001]. Zu den Vertretern der Klasse II gehören die Fructosetransporter GLUT5 und GLUT11 sowie die Glucosetransporter GLUT7 und GLUT9. Die Klasse III besteht aus den Transportproteinen GLUT6, GLUT8, GLUT10 und GLUT12 sowie dem Protonen-/myo-Inositol-Symporter HMIT1.

Die Membranassoziation der GLUT-Proteine erfolgt durch 12 transmembranäre α -helikale Domänen, die durch extra- und intrazelluläre Schleifen verbunden sind. In diesen Schleifen sind verschiedene funktionelle Domänen der Hexosetransporter lokalisiert, die die Substratbindung, die Stimulation der Hexoseaufnahme sowie die Internalisierung und den zielgerichteten endozytotischen Vesikeltransport der GLUT-Proteine regulieren [Watson *et al.*, 2004 a]. Die Transportproteine der Klassen I und II besitzen eine N-Glykosylierungsstelle innerhalb der ersten extrazellulären Schleife (in GLUT4: Asn46), die in der glykosylierten Form die Glucoseaffinität des Transportproteins erhöht und die Transportaktivität beschleunigt [Asano *et al.*, 1991]. Diese Domäne ist bei den Vertretern der Klasse III in der extrazellulären Schleife 9 lokalisiert [Joost & Thorens, 2001]. Die Substratbindung erfolgt bei den Hexosetransportern der Klassen I und II an der transmembranären Domäne TM7.

Klasse I der Glucosetransporter-Familie

Die Proteine der Klasse I der GLUT-Familie, vor allem GLUT1 und GLUT4, sind bisher am Besten charakterisiert. GLUT1 wird in Säugern ubiquitär exprimiert und ist im Basalzustand in der Plasmamembran lokalisiert, um die zelluläre Grundversorgung mit Glucose zu gewährleisten [Mueckler *et al.*, 1985; Birnbaum *et al.*, 1986; Fukumoto *et al.*, 1988]. Eine erhöhte Präsenz von GLUT1 wurde in der Plasmamembran der Endothelzellen, die die Blut-Hirn-Schranke bilden, und der Erythrozyten nachgewiesen, bei denen der Anteil von GLUT1 an der Gesamtmenge aller Membranproteine ca. 5 % beträgt [Mueckler *et al.*,

Transporter	Gewebeverteilung	Funktion	Referenz
GLUT1	ubiquitär (bes. in Erythrozyten und Endothelzellen)	Basaltransport, Transport durch die Blut-Hirn-Schranke	Mueckler <i>et al.</i> , 1985 Gould <i>et al.</i> , 1991 Mueckler <i>et al.</i> , 1997
GLUT2	Darm, Niere, Leber, Pankreas (β -Zellen)	Intestinale und renale Absorption, Glucosehomöostase in Leber und β -Zellen	Fukamoto <i>et al.</i> , 1988 Baldwin, 1993 Brown, 2000
GLUT3	Hirn	Transport durch die Blut-Hirn-Schranke	Kayano <i>et al.</i> , 1988 Brown, 2000
GLUT4	Herz- und Skelettmuskel, Fettgewebe,	Insulin-stimulierter Glucosetransport	Fukamoto <i>et al.</i> , 1989 James <i>et al.</i> , 1989 Mueckler, 1994
GLUT5	Darm, Muskel, Niere	Fructosetransport	Kayano <i>et al.</i> , 1990 Davidson <i>et al.</i> , 1992 Shepherd <i>et al.</i> , 1992
GLUT6	Hirn, Leukozyten, Milz	Glucosetransport (niedrigaffin)	Doerge <i>et al.</i> , 2000 a Lisinski <i>et al.</i> , 2001
GLUT7	Darm, Hoden, Leber	Glucose- und Fructosetransport	Li <i>et al.</i> , 2004
GLUT8	Hirn, Hoden, Muskel	Glucosetransport (Inhibition durch Fructose)	Carayann. <i>et al.</i> , 2000 Doerge <i>et al.</i> , 2000 b Ibberson <i>et al.</i> , 2000
GLUT9	Leber, Niere	Desoxyglucose- und Glucosetransport	Phay <i>et al.</i> , 2000 Augustin <i>et al.</i> , 2004
GLUT10	Leber, Pankreas	n.b.	Dawson <i>et al.</i> , 2001
GLUT11	Herz- und Skelettmuskel	Fructosetransport	Doerge <i>et al.</i> , 2001 Sasaki <i>et al.</i> , 2001
GLUT12	Herz- und Skelettmuskel, Fettgewebe, Prostata	Glucosetransport	Rogers <i>et al.</i> , 1998 Rogers <i>et al.</i> , 2002 Rogers <i>et al.</i> , 2003
HMIT1	Hirn	Inositoltransport	Uldry <i>et al.</i> , 2001
GLUT14	Hoden	n.b.	Wu & Freeze, 2002

Tab. 1 Übersicht der Glucosetransporter (GLUT)-Familie.

1997; Vannucci *et al.*, 1997]. GLUT1 besitzt eine hohe Substrataffinität zu Glucose und kann aufgrund einer breiten Substratspezifität neben weiteren Hexosen auch Pentosen transportieren [Keller *et al.*, 1989; Burant & Bell, 1992; Mueckler *et al.*, 1997].

Der Glucosetransporter GLUT4 gehört ebenfalls zur Klasse I der GLUT-Familie. Eine ausführliche Darstellung von Struktur, Funktion und Lokalisation dieses Transportproteins mit besonderer Berücksichtigung des intrazellulären Transports und der Insulin-stimulierten Translokation zur Plasmamembran in Muskelzellen wird in den folgenden Kapiteln gegeben.

1.3. Glucosetransporter GLUT4

1.3.1 Strukturelle Organisation des Glucosetransporters GLUT4

Neben den für alle Hexosetransporter der GLUT-Familie typischen funktionellen Domänen wie N-Glykosylierungs- und Substratbindungsstelle besitzt der Glucosetransporter GLUT4 weitere spezifische Motive, die für den zielgerichteten intrazellulären Vesikeltransport entscheidend sind. Durch Untersuchungen der subzellulären Lokalisation von mutierten GLUT4-Proteinen wurden amino- und carboxyterminale Domänen identifiziert, die für die Endozytose des Glucosetransporters und dessen Transport aus dem Endosomalnen Recycling-Kompartiment in Insulin-sensitive Speichervesikel entscheidend sind.

Mutationen in einer Sequenz aus vier Aminosäuren (Phe5-Gln6-Gln7-Ile8) innerhalb der zytosolischen aminoterminalen Region von GLUT4 führten zu einer Akkumulation des Transportproteins in der Plasmamembran, da die Entstehung der Clathrin-beschichteten GLUT4-enthaltenden Membranvesikel inhibiert wurde [Letourneur & Klausner, 1992; Piper *et al.*, 1993; Al-Hasani *et al.*, 2002]. Außerdem agiert diese Region als Erkennungssequenz beim Transport von GLUT4 aus dem Endosomalnen Recycling-Kompartiment in Insulin-sensitive GLUT4-Speichervesikel [Palacios *et al.*, 2001]. GLUT4-Proteine, deren Phenylalanin-Rest (Phe5) substituiert wurde, zeigten einen gestörten endosomalnen Transport, der zu einer anomalen Lokalisation von GLUT4 in Recycling-Endosomen, Späten Endosomen und proteinabbauenden Lysosomen führte [Melvin *et al.*, 1999; Palacios *et al.*, 2001].

In der zytosolischen carboxyterminalen Region von GLUT4 wurden zwei weitere Domänen charakterisiert, die als Erkennungssequenzen an der intrazellulären Translokation des Glucosetransporters beteiligt sind. Ein Di-Leucin-Motiv (Leu489-Leu490) ist für die Internalisierung von GLUT4 erforderlich. Mutationen dieser Aminosäuren führten zu einer Akkumulation des Glucosetransporters in der Plasmamembran, da die Invagination der

endozytotischen Clathrin-beschichteten Membranvesikel unterbrochen wurde [Letourneur & Klausner, 1992; Hudson *et al.*, 1993; Govers *et al.*, 2004]. Für eine Beteiligung des Di-Leucin-Motivs am Transport von GLUT4-enthaltenden Membranvesikeln aus dem trans-Golgi-Netzwerk in Insulin-sensitive GLUT4-Speichervesikel existieren divergierende Befunde [Martinez-Arca *et al.*, 2000; Subtil *et al.*, 2000; Palacios *et al.*, 2001]. Eine weitere carboxyterminale Domäne von GLUT4 (Thr498 - Pro505) ist für die korrekte Translokation des Glucosetransporters aus dem Endosomalen Recycling-Kompartiment in das trans-Golgi-Netzwerk entscheidend [Shewan *et al.*, 2000; Shewan *et al.*, 2003].

1.3.2 GLUT4 als Mediator der Glucosetransport-Aktivität

Der metabolische Haupteffekt von Insulin, die Stimulation der Glucoseaufnahme im Muskel- und Fettgewebe, ist seit nunmehr 50 Jahren bekannt [Park & Johnson, 1955; Levine & Goldstein, 1955]. 1978 wurde in Insulin-stimulierten Ratten-Fettzellen durch die Quantifizierung von Cytochalasin B, das an eine intrazelluläre Schleife der membran-assoziierten Glucosetransporter bindet, eine Erhöhung der Anzahl von Glucosetransportern in der Plasmamembran gegenüber unstimulierten Zellen nachgewiesen [Wardzala *et al.*, 1978]. Wenige Jahre später konnte durch Untersuchungen von Membranfraktionen isolierter Ratten-Fettzellen die Hypothese verifiziert werden, dass Insulin die Translokation einer „Glucosetransport-Aktivität“ aus intrazellulären Speichern zur Plasmamembran induziert [Cushman & Wardzala, 1980; Suzuki & Kono, 1980]. Dieser Befund wurde durch die Analyse von Ratten-Muskelzellen bestätigt [Klip *et al.*, 1987].

Knapp ein Jahrzehnt nach der Erstbeschreibung der Insulin-stimulierten „Glucosetransport-Aktivität“ wurde die Identifikation, Klonierung und Sequenzierung der cDNA des Glucosetransporters GLUT4 sowie dessen gewebespezifische Verteilung und differentielle Expression von fünf unabhängigen Arbeitsgruppen berichtet [Birnbaum, 1989; Charron *et al.*, 1989; Fukumoto *et al.*, 1989; James *et al.*, 1989; Kaestner *et al.*, 1989]. Seitdem belegen eine Vielzahl von Befunden, dass die Insulin-stimulierte Glucoseaufnahme im Muskel- und Fettgewebe durch die Translokation des Glucosetransporters GLUT4 realisiert wird [Goodyear *et al.*, 1991; Slot *et al.*, 1991; Smith *et al.*, 1991; Marette *et al.*, 1992 a]. In den für die Untersuchung der Translokation von GLUT4 häufig verwendeten Insulin-sensitiven Zelllinien der 3T3-L1-Fettzellen bzw. L6-Skelettmuskelzellen konnte der Insulineffekt ebenso nachgewiesen werden [Calderhead *et al.*, 1990; Klip *et al.*, 1990].

1.3.3 Glucosetransporter in Muskelzellen

Das Skelettmuskelgewebe, dessen Anteil an der Körpermasse ca. 40 % beträgt, ist der Hauptwirkungsort der Insulin-stimulierten Glucoseaufnahme [Baron *et al.*, 1988]. Euglykämisch-hyperinsulinämische Clamp-Versuche zeigten, dass ca. 75 % der infundierten Glucose von Skelettmuskelzellen aufgenommen und anschließend in Glykogen umgewandelt und gespeichert werden [DeFronzo *et al.*, 1981; DeFronzo *et al.*, 1985]. Dieser wichtige Transportprozess zur Rekonstitution eines normoglykämischen Blutzuckerspiegels während der postprandialen Phase ist im Skelettmuskelgewebe von Patienten mit Typ 2-Diabetes gestört [Dohm *et al.*, 1988; Andréasson *et al.*, 1991; Bonadonna *et al.*, 1993].

Die Charakterisierung der Muskelzellen von Säugern führte zur Identifikation der Glucosetransporter GLUT1 und GLUT4 [Charron *et al.*, 1989; James *et al.*, 1989; Kahn *et al.*, 1991]. In humanen Skelettmuskelzellen wurden außerdem GLUT8 und GLUT5 nachgewiesen, dessen heterologe Expression in *X. laevis* eine präferierte Substratspezifität für Fructose ergab [Burant *et al.*, 1992; Shepherd *et al.*, 1992; Ibberson *et al.*, 2000]. Untersuchungen von Skelettmuskelzellen mit dem GLUT4-spezifischen Inhibitor Indinavir belegen, dass ca. 65 % der Glucoseaufnahme im Basalzustand durch GLUT4 realisiert wird [Rudich *et al.*, 2003].

Das Expressionsniveau der Glucosetransporter GLUT1 und GLUT4 ist im Muskelgewebe abhängig vom Entwicklungsstadium des Organismus [Santalucia *et al.*, 1992]. Erst in der perinatalen Phase steigt die Expression von GLUT4 an, dessen Anteil an der Glucosetransporter-Gesamtmenge im Skelettmuskel adulter Ratten ca. 90 % beträgt [Marette *et al.*, 1992 b]. In Herzmuskelzellen liegt der Anteil von GLUT4 an der Gesamtmenge nur bei 60 %, während der Anteil von GLUT1 ca. 40 % beträgt [Fischer *et al.*, 1997]. Das dynamische Mengenverhältnis von GLUT1 und GLUT4 kann sich durch Denervationen des Muskelgewebes ändern, die eine verstärkte Expression von GLUT1 bei gleichzeitiger Abnahme von GLUT4 induzieren [Block *et al.*, 1991; Coderre *et al.*, 1992].

Bei Insulin-resistenten oder diabetischen Patienten ist das Expressionsniveau von GLUT4 in Skelettmuskel- und Fettzellen im Vergleich zu gesunden Personen unverändert [Handberg *et al.*, 1990; Pedersen *et al.*, 1990]. Dieser Befund konnte in Tiermodell-Untersuchungen mit diabetischen C57Bl / KsJ-Lepr^{db/db}-Mäusen bestätigt werden [Shao *et al.*, 2000]. Körperliche Aktivität führte im Skelettmuskelgewebe sowohl von gesunden Personen als auch von Patienten mit Typ 2-Diabetes zu einer erhöhten Expression von GLUT4 [Houmard *et al.*, 1991; Ren *et al.*, 1994; Kennedy *et al.*, 1999]. Dieser Effekt wurde ebenso in Skelettmuskel-

zellen normaler und Insulin-resistenter adipöser Zucker-Ratten nachgewiesen [Friedman *et al.*, 1990]. Die gewebespezifische Überexpression von GLUT4 im Muskel- und Fettgewebe diabetischer *db/db*-Mäuse führte zu einer Verhinderung von Insulinresistenz und Typ 2-Diabetes [Brozinick *et al.*, 2001].

Durch subzelluläre Fraktionierungen und immunelektronenmikroskopische Untersuchungen von Herz- und Skelettmuskelzellen wurde die distinkte Lokalisation der Glucosetransporter GLUT1 und GLUT4 identifiziert. GLUT1 ist im Skelettmuskelgewebe überwiegend im Sarkolemm, der Plasmamembran der Muskelfasern, lokalisiert [Marette *et al.*, 1992 b; Munoz *et al.*, 1995 b]. Dagegen wurde GLUT4 in juxt nukleären perizentriolaren Membranvesikeln des Endosomalen Recycling-Kompartiments nahe des trans-Golgi-Netzwerkes nachgewiesen [Zorzano *et al.*, 1997 a; Ploug *et al.*, 1998].

In Herzmuskelzellen ist GLUT4 hauptsächlich in intrazellulären Membranvesikeln enthalten, die sowohl in perizentriolaren Regionen nahe des Golgi-Apparates als auch in Arealen nahe des Sarkolemms, der Transversalkanäle und der interkalierenden Scheiben lokalisiert sind [Slot *et al.*, 1991; Zorzano *et al.*, 1997 a].

1.3.4 Transgene GLUT4-Tiermodelle

GLUT4 ist der einzige Insulin-sensitive Glucosetransporter im Muskel- und Fettgewebe. Interessanterweise zeigten Mäuse mit einer homozygoten Deletion von GLUT4 (GLUT4^{-/-}) nur einen leichten Defekt der Glucosehomöostase sowie ein retardiertes Wachstum und eine verkürzte Lebensdauer [Katz *et al.*, 1995; Stenbit *et al.*, 1996]. Die daraus resultierende Hypothese, dass homozygote GLUT4^{-/-}-Mäuse andere Glucosetransporter kompensatorisch exprimieren, konnte bisher experimentell nicht bestätigt werden [Wallberg-Henriksson & Zierath, 2001; Watson *et al.*, 2004 a]. Im Gegensatz zu GLUT4^{-/-}-Mäusen entwickeln heterozygote GLUT4^{+/-}-Mäuse bereits frühzeitig eine Insulinresistenz im Muskelgewebe. Außerdem führte der heterozygote Knockout von GLUT4 zu einer Hyperglykämie und Hyperinsulinämie, sodass die Tiere nach spätestens 12 Monaten diabetische Symptome, u.a. im Herzmuskel, zeigten [Stenbit *et al.*, 1997].

Mit Hilfe des Cre-*loxP*-Systems können Tiere mit einer gewebespezifischen Deletion von GLUT4 generiert werden. Durch die gezielte Inhibition der Expression von GLUT4 im Muskelgewebe entstand bereits nach wenigen Wochen eine Glucoseintoleranz und Insulinresistenz der Muskelzellen [Zisman *et al.*, 2000]. Die lokale Deletion von GLUT4 im Fettgewebe führte zu einer Insulinresistenz nicht nur im Fettgewebe, sondern auch im

Muskelgewebe und in der Leber [Abel *et al.*, 2001]. Dieser Effekt verdeutlicht die Funktion des Fettgewebes, auch als sekretorisches parakrines Organ zu agieren und durch die Freisetzung fettzellspezifischer Faktoren eine Insulinresistenz im Muskelgewebe zu induzieren [Mohamed-Ali *et al.*, 1998; Dietze *et al.*, 2004; Dietze-Schroeder *et al.*, 2005]. Aus klinischer Sicht stellt der negative Crosstalk zwischen den beiden Insulin-sensitiven Geweben eine Verknüpfung zwischen Adipositas und Typ 2-Diabetes dar [Minokoshi *et al.*, 2003].

1.4 Insulinsignaltransduktion

1.4.1 Insulin

Die Isolierung und Beschreibung der antihyperglykämischen Wirkung von Insulin im Jahr 1921 sowie der unmittelbar nachfolgende Einsatz in der Diabetes-Therapie waren herausragende Ereignisse in der modernen Medizin [Banting & Best, 1922; Banting *et al.*, 1922]. Seitdem ist das Hormon im Fokus intensiver biochemischer und diabetologischer Forschungen, deren Ergebnisse sowohl zu einer verbesserten Behandlung diabetischer Patienten als auch zum grundlegenden Verständnis biologischer Strukturen, Mechanismen und Prinzipien beitragen.

Meilensteine dieser Entwicklung waren die Bestimmung der Aminosäuresequenz von Insulin (1951 - 1953) sowie dessen chemische Totalsynthese (1963) und proteinkristallographische Strukturaufklärung im Jahr 1969 [Sanger & Tuppy, 1951; Sanger & Thopson 1953; Meienhofer *et al.*, 1963; Adams *et al.*, 1969]. 1978 gelang die bakterielle Überexpression von Humaninsulin durch die Fa. Genentech (San Francisco, CA, USA). Mit der Einführung von Analoginsulinen wie Insulin lispro (Humalog®) durch die Fa. Eli Lilly & Co. (Indianapolis, IN, USA) im Jahr 1996 wurden modifizierte Insulinpräparate mit veränderten pharmakokinetischen Eigenschaften (Kurz- oder Langzeitwirkung) zugänglich, die zu einer wesentlichen Verbesserung der Glucosehomöostase bei Patienten mit Typ 2-Diabetes führten. Völlig neue Behandlungsstrategien vor allem für Patienten mit Typ 1-Diabetes ergeben sich aus Ergebnissen von Transplantationsversuchen mit *in vitro*-differenzierten pankreatischen Stammzellen und aus aktuellen Untersuchungen, bei denen blutbildende Stammzellen aus dem Knochenmark in Insulin-produzierende pankreatische β -Zellen transformiert werden konnten [Ramiya *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2003].

Insulin ist ein Polypeptidhormon (5,8 kDa), das in den β -Zellen der Langerhansschen Inseln des Pankreas produziert wird und aus zwei Polypeptidketten mit insgesamt 51 Aminosäuren

besteht. Nach dem postprandialen Anstieg der Blutglucosekonzentration erfolgt eine biphasische Sekretion von Insulin aus den pankreatischen β -Zellen in den Blutkreislauf, wobei zuerst die in den Granula gespeicherten Hormonmoleküle sezerniert werden und danach innerhalb einer zweiten Phase neusynthetisiertes Insulin folgt.

Insulin agiert im Zusammenspiel mit dem antagonistisch wirkenden Hormon Glucagon als zentraler Regulator des Glucosemetabolismus und initiiert eine Vielzahl unterschiedlicher Signal- und Stoffwechselprozesse. Der Hormonstimulus führt in den Insulin-sensitiven Zellen des Muskel- und Fettgewebes zu einer Translokation des Glucosetransporters GLUT4 zur Plasmamembran, der für die Aufrechterhaltung der Glucosehomöostase obligat ist. Außerdem wird die Glykogensynthese im Muskelgewebe und in der Leber stimuliert sowie die cAMP-spezifische Phosphodiesterase im Muskel- bzw. Fettgewebe und in der Leber aktiviert. Dadurch werden insgesamt die Stoffwechselwege der Glykogen-, Triglycerid- und Proteinbiosynthese aktiviert, während die Glykolyse, Glykogenolyse und die hepatische Gluconeogenese gehemmt werden [Saltiel & Kahn, 2001]. Neben diesen anabolen Effekten ist Insulin auch an der Regulation mitogener Prozesse wie Zellwachstum und Proliferation beteiligt.

1.4.2 Insulinrezeptor

Die Insulin-stimulierte Glucoseaufnahme wird im Muskel- und Fettgewebe durch die Phosphatidylinositol-3 (PI3)-Kinase-vermittelte Insulinsignalkaskade reguliert. Zusätzlich wird die Existenz einer PI3-Kinase-unabhängigen Cbl / CAP-vermittelten Insulinsignalkaskade im Fettgewebe postuliert [Rudich & Klip, 2003; Watson *et al.*, 2004 a; Zorzano *et al.*, 2005]. In Abb. 1 (S. 14) sind beide Insulinsignalkaskaden und ihre Wirkung auf die Translokation des Glucosetransporters GLUT4 schematisch dargestellt.

Als Ausgangspunkt der beiden Insulinsignalkaskaden agiert der Plasmamembran-assoziierte Insulinrezeptor, der neben mehreren Wachstumsfaktor-Rezeptoren zur Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen gehört. Das Rezeptormolekül besteht aus zwei extrazellulären α -Untereinheiten und zwei transmembranären β -Untereinheiten, die durch Disulfidbrücken kovalent verbunden sind [Kasuga *et al.*, 1982 a; Ullrich & Schlesinger, 1990]. In Vertebraten kommt der Insulinrezeptor nahezu ubiquitär vor und wird in Fett- und Leberzellen besonders stark exprimiert [White, 1997]. Durch das alternative Spleißen des Exon 11 des humanen Insulinrezeptor (IR)-Gens existieren zwei Isoformen des Rezeptors, IR-A und IR-B, die sich in der carboxyterminalen Region der α -Untereinheit unterscheiden [Moller *et al.*, 1989].

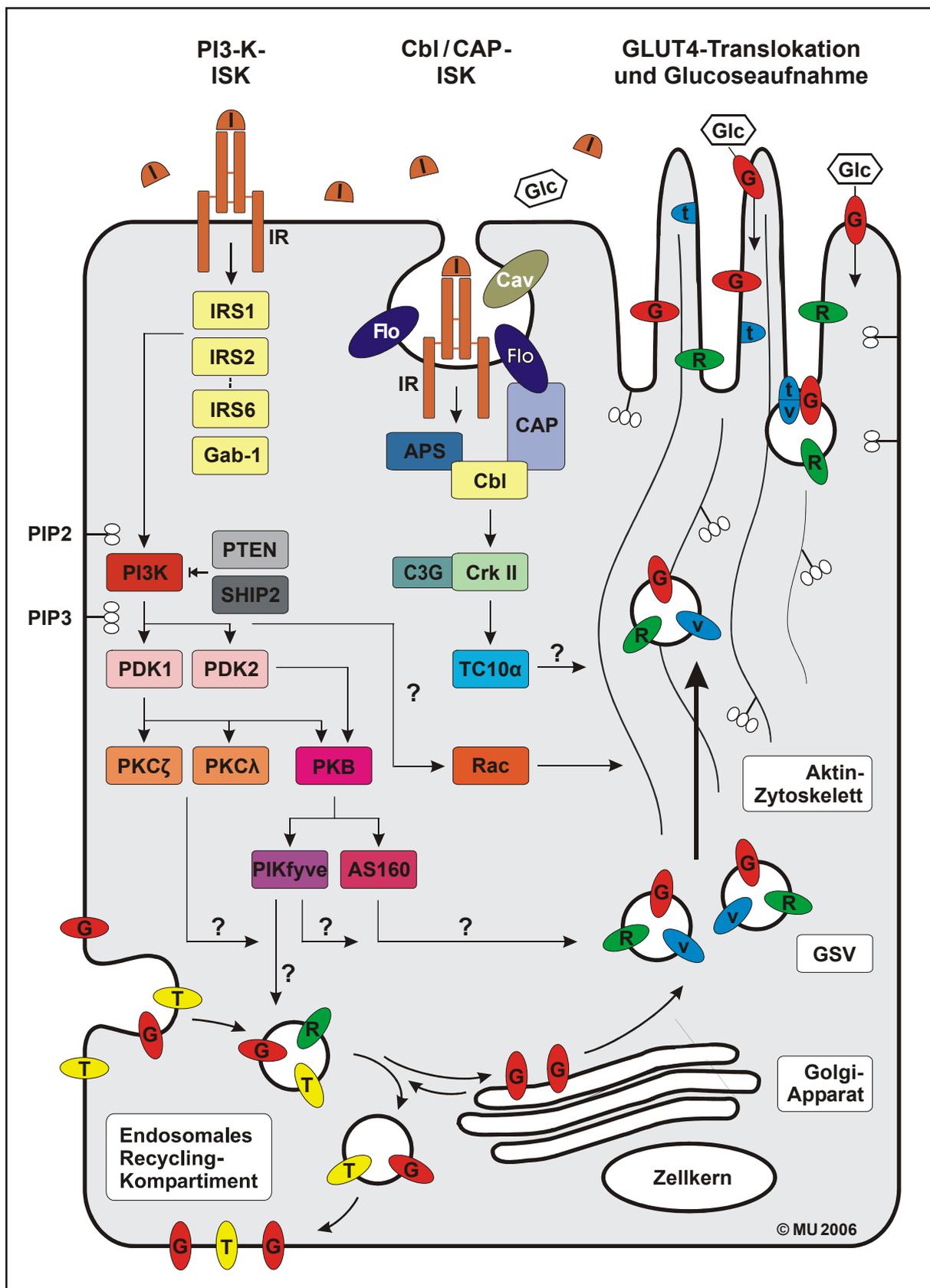


Abb. 1 Insulinsignaltransduktion und Translokation des Glucosetransporters GLUT4 [nach Rudich & Klip, 2003; Watson et al., 2004 a; Zorzano et al., 2005].

Durch die Bindung von Insulin an seinen Rezeptor wird die PI3-Kinase- und die Cbl / CAP-vermittelte Insulinsignalkaskade aktiviert. Durch nacheinanderfolgende Phosphorylierungsreaktionen, die überwiegend an der Plasmamembran stattfinden, erfolgt die Signaltransduktion zu den GLUT4-enhaltenden Membranvesikeln. Der Insulinstimulus führt gleichzeitig zu einer Umformierung des Aktin-Zytoskeletts, das als Gerüststruktur für beteiligte Signalproteine dient und als Matrix bei der Translokation der GLUT4-Speichervesikel agiert. Die Membranfusion erfolgt in faltenförmigen Straffungen der Plasmamembran und wird durch die Aktivität von komplexierten SNARE-Proteinen reguliert. Zusätzlich ist das endosomale Recycling des Glucosetransporters GLUT4 und die Sequestrierung in Insulin-sensitive GLUT4-Speichervesikel schematisch dargestellt. (Cav, Caveolin; Flo, Flotillin; G, GLUT4; Glc, Glucose; GSV, GLUT4-Speichervesikel; I, Insulin; IR, Insulinrezeptor; ISK, Insulinsignalkaskade; PIP2, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; PIP3, Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat; R, Rab11A; t, t-SNARE-Protein; T, Transferrinrezeptor; v, v-SNARE-Protein).

Anm.: Die abgebildete Cbl / CAP-vermittelte Insulinsignalkaskade wurde bisher nur in 3T3-L1-Fettzellen nach der Überexpression von TC10 α nachgewiesen. Aus graphischen Gründen ist das Protein TC10 α nicht Plasmamembran-assoziiert dargestellt. Ferner wurde auf die Angabe der p38-MAP-Kinase-vermittelten Aktivierung des Glucosetransporters GLUT4 durch Insulin verzichtet.

IR-B wird überwiegend in adulten Zellen exprimiert und vermittelt die Insulinsignaltransduktion in den Zellen des Muskel- und Fettgewebes [Pandini *et al.*, 2002; White, 2002].

Die hochaffine Bindung von Insulin an den heterotetrameren Insulinrezeptor induziert eine Konformationsänderung des Rezeptormoleküls, die die intrinsische Tyrosinkinase-Aktivität der β -Untereinheit stimuliert und zu einer intermolekularen trans-Autophosphorylierung von spezifischen Tyrosin-Resten führt [Kasuga *et al.*, 1982 b; Schlessinger, 2000]. Diese Tyrosin-Reste sind innerhalb von hochkonservierten Asn-Pro-X-Tyr-Motiven in der juxtamembranären Domäne, in der katalytischen Schleife und in der carboxyterminalen Domäne der β -Untereinheit lokalisiert [Lee & Pilch, 1994].

Die Autophosphorylierung der β -Untereinheit des Insulinrezeptors ermöglicht die Assoziation von Adaptorproteinen, die mit ihrer Phosphotyrosin-bindenden (PTB)-Domäne an den Rezeptor binden und durch dessen Kinase-Aktivität an spezifischen Tyrosin-Resten phosphoryliert werden [White, 1998; Virkamäki *et al.*, 1999]. Zusätzlich besitzen die Adaptorproteine eine Pleckstrin-homologe Domäne (PH)-Domäne, die der Assoziation mit der Plasmamembran dient [Farhang-Fallah *et al.*, 2002].

Zu der Gruppe der Adaptorproteine gehören die Proteine der Insulinrezeptorsubstrat-Familie, die Komponenten der PI3-Kinase-vermittelten Insulinsignalkaskade sind (siehe Kap. 1.4.3, S. 16), sowie APS und Cbl, die innerhalb einer parallelen und PI3-Kinase-unabhängigen Insulinsignalkaskade agieren (siehe Kap. 1.4.4, S. 20). Außerdem wurden Proteine wie

SH2-B, Shc und Gab als Adaptorproteine identifiziert [Mastick & Saltiel, 1997; Ribon *et al.*, 1998 b; Baumann *et al.*, 2000 b].

1.4.3 Phosphatidylinositol-3-Kinase-vermittelte Insulinsignalkaskade

Als proximale Signalproteine der Phosphatidylinositol-3-Kinase-vermittelten Insulinsignalkaskade agieren die Adaptorproteine der Insulinrezeptorsubstrat (IRS)-Familie, die durch den aktivierten Insulinrezeptor phosphoryliert werden. Die IRS-Proteine (IRS1 - IRS6) unterscheiden sich sowohl in ihrem Expressionsprofil als auch in ihrer Interaktion mit spezifischen Effektorproteinen [Virkamäki *et al.*, 1999; Cai *et al.*, 2003]. Für die Insulin-stimulierte Translokation des Glucosetransporters GLUT4 sind die IRS-Proteine IRS1 und IRS2 von zentraler Bedeutung [Tamemoto *et al.*, 1994; Kubota *et al.*, 2000]. Die globale, kombinierte heterozygote Deletion von Insulinrezeptor (IR) und IRS1 (IR^{+/-}-IRS1^{+/-}), der globale homozygote Knockout von IRS2 (IRS2^{-/-}) oder die gewebespezifische Deletion des Insulinrezeptors in Leber, Niere bzw. pankreatischen β -Zellen führten im Tiermodell zu Glucoseintoleranz, Insulinresistenz bzw. Typ 2-Diabetes [Bruning *et al.*, 1997; Withers *et al.*, 1998; Kulkarni *et al.*, 1999; Bruning *et al.*, 2000; Michael *et al.*, 2000]. In der kaukasisch-europäischen und -nordamerikanischen Population konnte ein genetischer Polymorphismus in IRS1 (G972R) identifiziert werden, der mit dem Auftreten von Typ 2-Diabetes assoziiert ist [Almind *et al.*, 1993]. Als molekulare Ursache dafür gilt die verringerte Bindung von IRS1 an das Effektorprotein Phosphatidylinositol-3-Kinase, dessen Enzymaktivität dadurch reduziert wird [Almind *et al.*, 1996].

Durch die Bindung von Effektorproteinen an Tyrosin-phosphorylierte Adaptorproteine wird das Insulinsignal transduziert. Für die Bildung dieser Protein-Protein-Komplexe besitzen Effektorproteine zumeist eine Src-Homologie-2 (SH2)- oder -3 (SH3)-Domäne [Czech & Corvera, 1999; White, 2002]. Zu der Gruppe der Effektorproteine gehören Enzyme wie die Phosphatidylinositol-3-Kinase, Csk, SERCA und SHIP. Außerdem wurden Ras-interagierende Proteine der MAP-Kinase-Signalkaskade (Grb2) sowie Chaperone (14-3-3) und zelluläre Homologe von Onkogenen (Crk, Nck) als Effektorproteine identifiziert [Pelicci *et al.*, 1992; Pessin & Saltiel, 2000; Watson *et al.*, 2004 a].

Die Aktivität der Klasse Ia - Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase) stellt für die Insulin-stimulierte Translokation des Glucosetransporters GLUT4 zur Plasmamembran einen entscheidenden Schritt innerhalb der Insulinsignalkaskade dar. Die PI3-Kinase ist ein Heterodimer und besteht aus einer katalytischen p110-Untereinheit und einer

regulatorischen p85-Untereinheit, die mit ihrer SH2-Domäne an Tyrosin-phosphorylierte Adaptorproteine bindet und die katalytische Untereinheit allosterisch reguliert [Alessi & Downes, 1998; Corvera & Czech, 1998]. Zusätzlich koordiniert die p85-Untereinheit die Translokation der PI3-Kinase zu ihren präferierten Substraten Phosphatidylinositol-4-phosphat und Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat in der Plasmamembran, aus denen durch die Enzymaktivität der katalytischen p110-Untereinheit Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat bzw. Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat entsteht [Cantley, 2002]. Dadurch werden Membranmikrodomänen generiert, die als Bindungsorte für Phosphatidylinositol-3-phosphat-abhängige Kinasen agieren [Storz & Toker, 2002].

Untersuchungen der PI3-Kinase-Aktivität mit selektiven Inhibitoren wie Wortmannin und LY294002, mit blockierenden Antikörpern oder mit dominant-negativen Mutanten der PI3-Kinase zeigten eine Inhibition der Insulin-stimulierten Translokation von GLUT4 zur Plasmamembran [Cheatham *et al.*, 1994; Okada *et al.*, 1994; Sharma *et al.*, 1998]. Paradoxerweise führte die vollständige Deletion der p85-Untereinheit der PI3-Kinase im Tiermodell zu einer verbesserten Insulinsensitivität und zu einer erhöhten Glucoseaufnahme im Skelettmuskel- und Fettgewebe [Terauchi *et al.*, 1999; Fruman *et al.*, 2000]. Dieser hypoglykämische Phänotyp entsteht möglicherweise durch die kompensatorische Expression anderer Isoformen der regulatorischen Untereinheit oder durch die Veränderung des Stöchiometrie-Verhältnisses der an dieser Insulinsignalkaskade beteiligten Proteine [Mauvais-Jarvis *et al.*, 2002].

Die physiologische „Aus“-Schaltung der PI3-Kinase-vermittelten Insulinsignalkaskade kann durch eine hydrolytische Spaltung von Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat erfolgen. Diese Reaktion wird durch die SH2-Domäne-Inositol-5-Phosphatase - Typ 2 (SHIP2) oder durch das Phosphatase-Tensin-homologe Protein (PTEN) katalysiert, die somit als negative Regulatoren der PI3-Kinase-vermittelten Insulinsignalkaskade agieren [Jiang & Zhang, 2002]. Eine heterozygote Deletion von SHIP2 führte im Tiermodell zu einer verbesserten Insulinsensitivität [Clement *et al.*, 2001]. Vergleichbare Effekte zeigte PTEN, dessen Überexpression eine Inhibition der Insulin-stimulierten Translokation von GLUT4 in 3T3-L1-Fetzellen induzierte [Nakashima *et al.*, 2000].

Die Insulin-stimulierte Aktivierung der PI3-Kinase führt zur Entstehung von Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat in der Plasmamembran, an das die carboxyterminale PH-Domäne der Phosphatidylinositol-3-phosphat-abhängigen Kinase 1 (PDK1) bindet [Storz & Toker, 2002]. Die nachfolgende Transduktion des Insulinsignals erfolgt über zwei parallele

Signalkaskaden. Als Substrate der PDK1 agieren sowohl die Isoformen der Proteinkinase B (PKB), PKB α , PKB β und PKB γ , als auch die Proteine aus der Gruppe der atypischen Proteinkinasen C (PKC), PKC ξ und PKC λ [Watson *et al.*, 2004 a].

Die Überexpression der dominant-negativen Mutante von PKC ξ bzw. PKC λ oder die Applikation von PKC-Inhibitoren wie RO 31-8220 führten zu einer Inhibition der Insulin-stimulierten Translokation von GLUT4 zur Plasmamembran in 3T3-L1-Fettzellen bzw. L6-Skelettmuskelzellen [Bandyopadhyay *et al.*, 1997; Kotani *et al.*, 1998; Bandyopadhyay *et al.*, 2000]. Als ein Substrat von PKC ξ konnte Munc18c identifiziert werden, das als negativer Regulator der Insulin-stimulierten Translokation von GLUT4 bei der Entstehung von SNARE-Komplexen an der Plasmamembran beteiligt ist [Hodgkinson *et al.*, 2005].

Die Proteinkinase B - auch Akt genannt - wird als Substrat von PDK1 in der Plasmamembran durch die Phosphorylierung eines Threonin-Restes (Thr308) innerhalb der katalytischen Domäne aktiviert [Alessi *et al.*, 1997; Stokoe *et al.*, 1997]. Für die Phosphorylierung eines Serin-Restes (Ser473) innerhalb der regulatorischen Domäne wurden mehrere Möglichkeiten postuliert: die Aktivität von PDK1 bzw. eines putativen PDK2-Proteins oder eine Autophosphorylierung [Toker & Newton, 2000; Brazil & Hemmings 2001]. Die stabile Überexpression der membrangebundenen konstitutiv-aktiven Form der PKB induzierte eine Zunahme der Insulin-stimulierten Glucoseaufnahme durch die permanente Lokalisation von GLUT4 in der Plasmamembran [Kohn *et al.*, 1996; Kohn *et al.*, 1998]. Untersuchungen isolierter Ratten-Fettzellen ergaben, dass PKB β als dominierende Isoform der Proteinkinase B in Fettzellen entlang des Aktin-Zytoskeletts in GLUT4-Speichervesikel transloziert wird [Walker *et al.*, 1998; Kupriyanova & Kandror, 1999; Peyrollier *et al.*, 2000]. Außerdem wurde gezeigt, dass der Effekt der dominant-negativen Variante von PKB β , die Insulin-stimulierte Translokation von GLUT4 zu inhibieren, ausschließlich während der Kolo-kalisation von PKB β in GLUT4-enthaltenden Membranvesikeln auftritt [Cong *et al.*, 1997; Welsh *et al.*, 2005].

Weitere Indizien für die Bedeutung der Proteinkinase B innerhalb der PI3-Kinase-vermittelten Insulinsignalkaskade ergaben sich aus Untersuchungen von Knockout-Mäusen. Die globale homozygote Deletion von PKB β (PKB $\beta^{-/-}$) führte zu einer Insulinresistenz in Fettzellen, während Skelettmuskelzellen lediglich eine geringe Abnahme der Insulin-stimulierten Glucoseaufnahme zeigten [Cho *et al.*, 2001 a]. Dieser Effekt konnte bei Tieren mit einer globalen homozygoten Deletion der α -Isoform (PKB $\alpha^{-/-}$) nicht erzielt werden [Cho *et al.*, 2001 b]. In 3T3-L1-Fettzellen führte der Verlust von PKB β ebenfalls zu einer Verringerung

der Insulin-stimulierten Glucoseaufnahme [Jiang *et al.*, 2003]. Zusätzlich zeigten die Fettzellen nach einer kombinierten Deletion der α - und β -Isoform der Proteinkinase B eine verminderte Aktivität der Glykogensynthasekinase-3, einem Schlüsselenzym der Glykogensynthese [Katome *et al.*, 2003]. Klinische Daten bestätigen die Relevanz von PKB β innerhalb der PI3-Kinase-vermittelten Insulinsignalkaskade, da die Insulin-stimulierte Aktivierung dieses Enzyms in Skelettmuskelzellen adipöser Personen verringert ist [Brozinick *et al.*, 2003].

Die nachfolgende Transduktion des Insulinsignals, die die Translokation des Glucosetransporters GLUT4 zur Plasmamembran in Insulin-sensitiven Zellen des Muskel- und Fettgewebes auslöst, ist derzeit noch unklar und Gegenstand intensiver Forschung. Bisher wurden mehr als 30 Substrate der Proteinkinase B identifiziert [Hanada *et al.*, 2004]. Aus dieser Vielzahl potentieller Signalmoleküle konnten bisher zwei Proteine, das Akt-Substrat mit 160 kDa (AS160) und die Phosphatidylinositol-3-monophosphat-5-Kinase mit einer FYVE-Domäne (PIKfyve), als Schlüsselproteine für die Verknüpfung der PI3-Kinase-vermittelten Insulinsignalkaskade und der Translokation des Glucosetransporters GLUT4 identifiziert werden.

AS160 wurde erstmals in 3T3-L1-Fettzellen nachgewiesen und besitzt neben zwei PTB-Domänen und mehreren Phosphorylierungsstellen eine Rab-GTPase-aktivierende (Rab-GAP)-Domäne [Kane *et al.*, 2002; Miinea *et al.*, 2005]. Bereits im Basalzustand agiert AS160 als ein negativer Regulator der Translokation von GLUT4 zur Plasmamembran, da die Deletion der GAP-Domäne zu einer Steigerung der Exozytose von GLUT4 führte [Eguez *et al.*, 2005]. In Skelettmuskelzellen von Patienten mit Typ 2-Diabetes ist die Phosphorylierung von AS160 nach einem Insulinstimulus stark reduziert [Karlsson *et al.*, 2005]. Die Mutation zweier Phosphorylierungsstellen von AS160 (Ser588, Thr642) induzierte eine Verringerung der Insulin-stimulierten Translokation von GLUT4 zur Plasmamembran in 3T3-L1-Fettzellen [Sano *et al.*, 2003]. Die Überexpression von AS160, das neben den Mutationen der beiden Phosphorylierungsstellen auch eine mutierte Rab-GAP-Domäne enthielt, führte durch die Aufhebung dieses Effektes zu einer intakten Glucoseaufnahme. Ursächlich dafür ist die fehlende Phosphorylierung von AS160 durch die Proteinkinase B, die zu einer Inaktivierung der Rab-GAP-Domäne von AS160 führt. Dadurch bleiben die interagierenden Rab-Proteine in ihrer aktiven GTP-gebundenen Form und aktivieren die Translokation von GLUT4 zur Plasmamembran. Eine direkte Rab-GAP-Interaktion von AS160 wurde bisher für die Rab-Proteine Rab2A, Rab8A, Rab10 und Rab14 nachgewiesen [Miinea *et al.*, 2005].

Mit der Charakterisierung von PIKfyve konnte ein Signalprotein innerhalb der PI3-Kinase-vermittelten Insulinsignalkaskade identifiziert werden, dass sowohl bei der Insulin-stimulierten Translokation von GLUT4 zur Plasmamembran als auch bei dessen Recycling in Insulin-sensitive GLUT4-Speichervesikel beteiligt ist [Sbrissa *et al.*, 1999; Berwick *et al.*, 2004]. Die Überexpression von PIKfyve, dessen Phosphorylierungsstelle (Ser318) mutiert war, führte zu einer Zunahme der Insulin-stimulierten Translokation von GLUT4 zur Plasmamembran in 3T3-L1-Fettzellen. Interessanterweise konnte PIKfyve auch in GLUT4-enhaltenden Membranvesikeln lokalisiert werden, die durch das Endosomale Recycling-Kompartiment in perinukleäre Regionen des trans-Golgi-Netzwerkes transloziert werden [Welsh *et al.*, 2005].

1.4.4 Cbl / CAP-vermittelte Insulinsignalkaskade

Die detaillierte Auswertung von Untersuchungen der PI3-Kinase-vermittelten Insulinsignalkaskade zeigte, dass die Aktivität der PI3-Kinase und der nachfolgenden Signalproteine für die Insulin-stimulierte Translokation von GLUT4 zur Plasmamembran nicht ausreichend ist. Beispielsweise führte die Stimulation von Ratten-Fettzellen mit dem Plättchen-aktivierenden Wachstumsfaktor oder mit β 1-Integrin zu einer Aktivierung von PI3-Kinase und Protein-kinase B [Guilherme & Czech, 1998; Staubs *et al.*, 1998]. Diese Aktivierung hatte jedoch keinen Einfluss auf die zelluläre Glucoseaufnahme, sodass die Existenz einer weiteren Insulinsignalkaskade postuliert wurde [Isakoff *et al.*, 1995; Krook *et al.*, 1997]. Die Überexpression der konstitutiv-aktiven Mutante von PDK1 zeigte trotz der Phosphorylierung ihrer potentiellen Substrate PKB, PKC ξ und PKC λ ebenfalls keine stimulierende Wirkung auf die zelluläre Glucoseaufnahme [Egawa *et al.*, 2002].

Die Hypothese einer zweiten, parallelen Insulinsignalkaskade konnte in 3T3-L1-Fettzellen durch die Identifizierung und Charakterisierung von Signalproteinen, die in Caveolin-enhaltenden Lipidflößen lokalisiert sind, bestätigt werden [Khan & Pessin, 2002]. Caveolin-enhaltende Lipidflöße stellen Invaginationen der Plasmamembran dar und enthalten neben Caveolin vor allem Flotillin, Cholesterol sowie Glyko- und Sphingolipide [Galbiati *et al.*, 2001].

Die Phosphorylierung des Protoonkogens Casitas b-Lymphom (Cbl) durch den Insulin-rezeptor führt zu einer Assoziation von Cbl in Caveolin-enhaltenden Lipidflößen und nachfolgenden Bindung von Effektorproteinen [Baumann *et al.*, 2000 b; Watson *et al.*, 2001]. Die Phosphorylierung von Cbl erfolgt nach der Bindung an eine SH3-Domäne des Cbl-assozierten Proteins (CAP) und wird durch die Assoziation des Adaptorproteins mit PH- und

SH2-Domäne (APS) ermöglicht [Liu *et al.*, 2002; Ahmed & Pillay, 2003]. Außerdem wird durch die Aktivität von APS eine Verknüpfung beider Insulinsignalkaskaden realisiert, da APS neben der Autophosphorylierung des Insulinrezeptors auch die PI3-Kinase-vermittelte Insulinsignalkaskade stimuliert [Ahmed & Pillay, 2003]. Interessanterweise wird die Expression von CAP durch Thiazolidindione erhöht, die als Agonisten der γ -Isoform des Peroxisomen-Proliferator-aktivierenden Rezeptors (PPAR γ) aufgrund ihrer Insulinsensitivierenden Wirkung bei der Therapie des Typ 2-Diabetes eingesetzt werden [Ribon *et al.*, 1998 a; Baumann *et al.*, 2000 a].

Nach der Dissoziation des Cbl / CAP-Proteinkomplexes vom Insulinrezeptor interagiert die aminoternale Sorbin-homologe Domäne von CAP mit Flotillin, wodurch der Cbl / CAP-Proteinkomplex in Membranmikrodomänen verankert wird [Baumann *et al.*, 2000 b]. Anschließend bindet ein heterodimerer Proteinkomplex, der aus Crk II und dem Crk-SH3-bindenden Guaninnukleotid-Austauschfaktor (C3G) besteht, an die phosphorylierten Tyrosin-Reste von Cbl [Tanaka *et al.*, 1994; Chiang *et al.*, 2001]. Durch die Aktivität von C3G wird das Rho-Protein TC10 α in die aktive GTP-gebundene Form konvertiert und kann dadurch mit Proteinen interagieren, die an der Umformierung des Aktin-Zytoskeletts sowie bei der Vesikelassoziation an der Plasmamembran beteiligt sind [Kanzaki *et al.*, 2002; Hou & Pessin, 2003; Inoue *et al.*, 2003]. Somit ermöglicht die Cbl / CAP-vermittelte Insulinsignalkaskade die Translokation des Glucosetransporters GLUT4 zur Plasmamembran entlang des Aktin-Zytoskeletts in Fettzellen [Kanzaki & Pessin, 2001; Saltiel & Pessin, 2003].

Ein weiterer Verknüpfungspunkt der beiden Insulinsignalkaskaden, der PI3-Kinase-vermittelten Signalkaskade und der Cbl / CAP-vermittelten Signalkaskade, konnte durch die Analyse der atypischen Proteinkinase PKC ξ und PKC λ charakterisiert werden [Kanzaki *et al.*, 2004]. Die Insulin-stimulierte Phosphorylierung von PKC ξ und PKC λ erfolgt durch die PI3-Kinase-vermittelte Signalkaskade, während die Translokation der Proteinkinase zur Plasmamembran durch das Effektorprotein der Cbl / CAP-vermittelten Signalkaskade TC10 α reguliert wird.

Die Existenz der Cbl / CAP-vermittelten Insulinsignalkaskade konnte bisher nur in 3T3-L1-Fettzellen nach der Überexpression von TC10 α nachgewiesen werden [Jebailey *et al.*, 2004]. In Muskelzellen wurden nur einzelne Komponenten der Cbl / CAP-vermittelten Insulinsignalkaskade identifiziert, deren Aktivitätsprofil die Existenz einer gerichteten Signalkaskade als unwahrscheinlich erachten lässt [Jebailey *et al.*, 2004; Thirone *et al.*, 2004]. Die Interaktion der Insulin-stimulierten Translokation von GLUT4 mit dem Aktin-Zytoskelett in Muskelzellen

wird nicht durch TC10 α , sondern durch ein anderes Rho-Protein reguliert, das Bestandteil der PI3-Kinase-vermittelten Insulinsignalkaskade ist [Patel *et al.*, 2003]. Die Überexpression der dominant-negativen Mutante des Rho-Proteins Rac führte sowohl zu einer Inhibition der Insulin-stimulierten Translokation von GLUT4 zur Plasmamembran als auch zu einer Dysfunktion des Aktin-Zytoskeletts [Khayat *et al.*, 2000]. Die Entstehung der aktiven GTP-gebundenen Form von Rac wird durch die Aktivität der PI3-Kinase induziert.

1.5 Insulin-stimulierte Translokation des Glucosetransporters GLUT4

Die Insulin-stimulierte Translokation des Glucosetransporters GLUT4 aus intrazellulären Vesikelkompartimenten zur Plasmamembran führt zu einer gesteigerten Glucoseaufnahme, die den geschwindigkeitslimitierenden Schritt des Glucosestoffwechsels in Muskel- und Fettzellen darstellt [Zorzano *et al.*, 1996; Cline *et al.*, 1999; Saltiel, 2001]. Nach der Insulin-stimulation der Muskelzellen ist GLUT4 in selektiven Regionen des Sarkolems, der Plasmamembran der Muskelfasern, und in den extrazellulären Transversalkanälen an der Z-Scheibe lokalisiert [Marette *et al.*, 1992 a; Munoz *et al.*, 1995 a]. Diese Translokation von GLUT4 ist bei Patienten mit Typ 2-Diabetes gestört [Garvey *et al.*, 1998; Ryder *et al.*, 2000 b; Zierath *et al.*, 2000]. Gegenüber der Kontrollgruppe gesunder Probanden war die Menge von GLUT4 in der Plasmamembran der Skelettmuskelzellen von Patienten mit Typ 2-Diabetes nach einem Insulinstimulus um 70 % reduziert. Dieser Befund konnte durch Untersuchungen an diabetischen Tsumura-Suzuki-Mäusen bestätigt werden [Miura *et al.*, 2001].

In isolierten Skelettmuskelzellen sind unter Basalbedingungen ca. 10 % der zellulären Gesamtmenge von GLUT4 in der Plasmamembran lokalisiert, die etwa zwei Drittel der aufgenommenen Glucose transportieren [Rudich & Klip, 2003]. Etwa 30 - 40 % der Gesamtmenge von GLUT4 befinden sich in intrazellulären Membranvesikeln des Endosomalen Recycling-Kompartiments, während der Rest im trans-Golgi-Netzwerk sowie in Insulin-sensitiven GLUT4-Speichervesikeln enthalten ist [Slot *et al.*, 1991; Martin *et al.*, 1996; Ploug *et al.*, 1998].

Bereits im Basalzustand der Insulin-sensitiven Zellen des Muskel- und Fettgewebes unterliegt der Glucosetransporter GLUT4 einem konstitutiven Kreislauf aus Plasmamembran-Lokalisation, Internalisierung und direktem Transport aus Frühen Endosomen zur Plasmamembran bzw. einer weiterführenden Endozytose in das Endosomale Recycling-Kompartiment und einer anschließender Exozytose [Satoh *et al.*, 1993; Yeh *et al.*, 1995; Mukherjee *et al.*, 1997].

Neben der Lokalisation im Endosomalen Recycling-Kompartiment und in perinukleären Regionen des trans-Golgi-Netzwerkes ist der Großteil der intrazellulären GLUT4-Proteine in Insulin-sensitiven GLUT4-Speichervesikeln lokalisiert [Hirshman *et al.*, 1990; Rea & James, 1997; Hashiramoto & James, 2000]. Die Translokation dieser Membranvesikel zur Plasmamembran stellt die Hauptwirkung von Insulin innerhalb der intrazellulären Translokation des Glucosetransporters GLUT4 dar und führt zur Insulin-stimulierten Glucoseaufnahme im Muskel- und Fettgewebe [Rea & James, 1997; Bryant *et al.*, 2002].

Nach einer Insulinstimulation verringert sich der Anteil von GLUT4 in intrazellulären Kompartimenten der Muskelzellen auf 70 %, während sich die Menge von GLUT4 in der Plasmamembran verdreifacht. Dadurch wird die Glucoseaufnahme der Muskelzellen um 100 - 300 % im Vergleich zum Basalzustand erhöht [Bonen *et al.*, 1994; Hansen *et al.*, 1994]. Kinetische Untersuchungen von L6-Skelettmuskelzellen zeigten, dass die halbmaximale Translokation von GLUT4 bereits 2,5 min nach der Insulinstimulation eintritt und die halbmaximale Glucoseaufnahme nach 6 min erreicht wird [Somwar *et al.*, 2001]. Gleichzeitig führt der Hormonstimulus zu einer verringerten Endozytose-Rate der GLUT4-enhaltenden Membranvesikel [Czech & Buxton, 1993; Kandror & Pilch, 1996].

Durch Lokalisationsuntersuchungen konnte die Existenz distinkter GLUT4-Speichervesikel-Populationen mit unterschiedlicher Stimulier- und Hemmbarkeit durch Tetanustoxin nachgewiesen werden [Millar *et al.*, 1999; Aledo & Hundal, 1996; Kupriyanova *et al.*, 2002]. Nach einer Insulinstimulation werden GLUT4-Speichervesikel, in denen das v-SNARE-Protein VAMP2 enthalten ist, zur Plasmamembran transloziert (siehe Kap. 1.5.2, S. 25). GLUT4-Speichervesikel, deren Translokation nicht durch Tetanustoxin inhibiert wird, enthalten VAMP3 und werden bei Muskelkontraktionen zur Plasmamembran transportiert [Coderre *et al.*, 1995; Rudich & Klip, 2003].

Neben der Translokation von GLUT4-Speichervesikeln zur Plasmamembran als Primäreffekt von Insulin wird durch die Wirkung des Hormons zusätzlich die Internalisierung von Plasmamembran-assoziierten GLUT4-Proteinen inhibiert und der Transport von GLUT4-enhaltenden Recycling-Endosomen stimuliert [Watson *et al.*, 2004 a; Zeigerer *et al.*, 2004]. Außerdem zeigten Untersuchungen mit L6-Skelettmuskelzellen, dass Insulin den interendosomalen Transport von GLUT4 innerhalb des Endosomalen Recycling-Kompartiments beschleunigt, sodass der Glucosetransporter schneller wieder zur Plasmamembran transloziert werden kann [Foster *et al.*, 2001; Rudich & Klip, 2003].

In Muskelzellen ist die Translokation des Glucosetransporters GLUT4 zur Plasmamembran kein exklusiver Effekt von Insulin. Muskelkontraktionen durch elektrische Reize oder körperliche Aktivität, osmotischer Schock, hypoxische Situationen infolge kardiopulmonaler Insuffizienz oder die Stimulation mit 5-Aminoimidazol-4-carboxamid-1- β -D-ribofuranosid (AICAR), einem Intermediärprodukt der Purin-Biosynthese, führen ebenfalls zu einer gesteigerten Glucoseaufnahme [Douen *et al.*, 1990; Kolter *et al.*, 1992; Sun *et al.*, 1994; Koistinen *et al.*, 2003]. Die Translokation von GLUT4 nach diesen zellulären Stimuli erfolgt nicht durch die Aktivierung der Insulinsignalkaskade, sondern wird von der AMP-Kinase und der p38-MAP-Kinase moduliert [Hayashi *et al.*, 1998; Mu *et al.*, 2001; Ryder *et al.*, 2000 a]. Die Aktivierung der AMP-Kinase durch AICAR in isolierten Skelettmuskelzellen von Patienten mit Typ 2-Diabetes führte zu einer gesteigerten Glucoseaufnahme durch eine erhöhte Anzahl von GLUT4-Proteinen in der Plasmamembran [Koistinen *et al.*, 2003]. Interessanterweise ergab die kombinierte Applikation von AICAR und Insulin eine Steigerung des Glucosetransports im diabetischen Muskel gegenüber der Einzelstimulation mit Insulin.

1.5.1 Aktin-Zytoskelett und Translokation von GLUT4

An der Insulin-stimulierten Translokation von GLUT4 zur Plasmamembran ist das Aktin-Zytoskelett maßgeblich beteiligt [Tsakiridis *et al.*, 1994; Martin *et al.*, 1996; Khan & Pessin, 2002]. Der Hormonstimulus induziert eine Umformierung des Aktin-Zytoskeletts, das dadurch als zelluläre Gerüststruktur für Signalproteine der Insulinsignalkaskade, z.B. PI3-Kinase und Proteinkinase B, sowie als Matrix bei der Translokation von Insulin-sensitiven GLUT4-Speichervesikeln zur Plasmamembran agieren kann [Khayat *et al.*, 2000; Rudich & Klip, 2003].

Außerdem entstehen durch die Umformierung des Aktin-Zytoskeletts faltenförmige Straffungen der Plasmamembran. In diesen Domänen sind SNARE-Proteine lokalisiert, die gemeinsam mit den SNARE-Proteinen der GLUT4-Speichervesikel SNARE-Komplexe bilden, die für eine Membranfusion erforderlich sind [Tong *et al.*, 2001]. Untersuchungen mit den Aktin-Zytoskelett-Disruptoren Cytochalasin D und Lantrunculin B zeigten, dass sowohl die Internalisierung von GLUT4 als auch das konstitutive Recycling von GLUT4 im Basalzustand der Zellen unabhängig vom Aktin-Zytoskelett erfolgt [Wang *et al.*, 1998 a; Omata *et al.*, 2000; Rudich & Klip, 2003].

1.5.2 SNARE-Proteine und Translokation von GLUT4

Das Andocken und die Fusion von GLUT4-Speichervesikeln nach der Translokation zur Plasmamembran wird durch die Komplexbildung von solubilen NSF-Attachment-Protein-Rezeptoren (SNARE) reguliert, die essentiell für intrazelluläre Membranfusionen sind [Calakos *et al.*, 1994; Chen & Scheller, 2001]. Dabei interagieren in der Plasmamembran lokalisierte target membrane-SNARE (t-SNARE)-Proteine aus der Gruppe der Syntaxine mit vesicle membrane-SNARE (v-SNARE)-Proteinen, die zur Familie der Vesikel-assoziierten Membranproteine (VAMP) gehören [Jahn *et al.*, 2003].

Die Bildung eines SNARE-Komplexes aus t-SNARE- und v-SNARE-Protein und die nachfolgende Membranfusion wird durch eine stabile Bindung von vier parallelen Helices der SNARE-Proteine ermöglicht [Sutton *et al.*, 1998]. Durch die Aktivität des zytosolischen Proteins N-Ethylmaleimid-sensitiver Faktor (NSF), einem hexameren Protein aus der Familie der AAA-ATPasen, und des solubilen NSF-Attachment-Proteins (SNAP) dissoziieren t-SNARE- und v-SNARE-Proteine nach der Membranfusion [Sollner *et al.*, 1993; Whiteheart *et al.*, 2001].

Die v-SNARE-Proteine VAMP2 (Synaptobrevin 2) und VAMP3 (Cellubrevin) sind in GLUT4-Speichervesikeln colokalisiert und bilden nach der Translokation dieser Vesikel zur Plasmamembran mit dem t-SNARE-Protein Syntaxin 4 einen SNARE-Komplex [Cain *et al.*, 1992; Rea & James, 1997; Sevilla *et al.*, 1997]. Lokalisationsuntersuchungen und Experimente mit selektiven Proteasen zeigten, dass VAMP2 und VAMP3 in unterschiedlichen GLUT4-Speichervesikel-Populationen enthalten sind [Cheatham *et al.*, 1996; Martin *et al.*, 1998; Millar *et al.*, 1999]. VAMP2 wurde in Insulin-sensitiven GLUT4-Speichervesikeln von Skelettmuskelzellen und Fettzellen nachgewiesen und reguliert als primäres v-SNARE-Protein den Andockprozess und die Fusion der GLUT4-Speichervesikel mit der Plasmamembran. VAMP3 ist in GLUT4-Speichervesikeln colokalisiert, deren Translokation zur Plasmamembran durch Muskelkontraktion oder das nicht-hydrolysierebare GTP-Analogon Guanosin-5'-O-3-thiotriphosphat (GTP γ S) stimuliert wird, jedoch nicht durch Insulin [Coderre *et al.*, 1995; Volchuk *et al.*, 1995; Aledo & Hundal, 1996].

Mit Syntaxin 4 wurde ein t-SNARE-Protein charakterisiert, dass die Fusion der GLUT4-Speichervesikel mit der Plasmamembran in Skelettmuskelzellen und Fettzellen reguliert [Foster & Klip, 2000; Grusovin & Macaulay, 2003]. Die heterozygote Deletion von Syntaxin 4 (Syn4^{+/-}) führte im Tiermodell zu einer Inhibition der Insulin-stimulierten Translokation des Glucosetransporters GLUT4 in Skelettmuskelzellen [Yang *et al.*, 2001].

Die Konformationsänderung der SNARE-Proteine wird durch Regulatorproteine der Sec1p / Munc18-Familie koordiniert [Misura *et al.*, 2000; Toonen & Verhage, 2003]. Durch die hochaffine Bindung von Munc18c an die aminoternale Region des t-SNARE-Proteins Syntaxin 4 wird die Interaktion mit dem v-SNARE-Protein VAMP2 im Basalzustand der Zellen blockiert [Thurmond *et al.*, 1998; Kanda *et al.*, 2005]. Das Andocken der Insulin-sensitiven GLUT4-Speichervesikel an die Plasmamembran wird durch die sukzessive Interaktion mehrerer Regulatorproteine ermöglicht. Die Insulinstimulation führt zu einer Aktivierung von PKC ξ , die Munc18c direkt bindet [Hodgkinson *et al.*, 2005]. Dadurch wird die Dissoziation von Syntaxin 4 und Munc18c induziert, sodass Syntaxin 4 in nicht-blockierter Form durch das Rab-Protein Rab4 insulinabhängig aktiviert werden kann [Li *et al.*, 2001].

Mit SNAP23, SNAP25, Tomosyn und dem Syntaxin 4-interagierenden Protein (Synip) wurden weitere akzessorische Proteine identifiziert, die an Syntaxin 4 binden und bei der Membranfusion von GLUT4-Speichervesikeln mit der Plasmamembran in Skelettmuskelzellen bzw. Fettzellen beteiligt sind [Rea *et al.*, 1998; Min *et al.*, 1999; Widberg *et al.*, 2003].

Außerdem konnte mit dem hochkonservierten oktameren Exozyst-Protein-Komplex ein Modulator identifiziert werden, der bei der Positionierung der GLUT4-Speichervesikel an der Plasmamembran unmittelbar vor der Bildung des SNARE-Komplexes beteiligt ist und dessen Komponente Exo70 von TC10 α , einem Signalprotein der Cbl / CAP-vermittelten Insulinsignalkaskade, aktiviert wird [Lipschutz & Mostov, 2002; Inoue *et al.*, 2003].

1.5.3 Rab-Proteine und Translokation von GLUT4

Rab-Proteine sind als Regulatorproteine an der Translokation des Glucosetransporters GLUT4 in Insulin-sensitiven Zellen des Muskel- und Fettgewebes beteiligt. Obwohl eine Vielzahl von Rab-Proteinen in Insulin-sensitiven Zellen exprimiert wird, ist keines dieser Kleinen GTP-bindenden Proteine ausschließlich in Muskel- und Fettzellen lokalisiert [Cormont & Le Marchand-Brustel, 2001]. Die Klassifikation, strukturelle Organisation und enzymatische Aktivität der Rab-Proteine sowie die Interaktion mit Rab-spezifischen Effektorproteinen wird in Kap. 1.6 (S. 28) ausführlich dargestellt.

Bisher konnte eine Beteiligung der Rab-Proteine Rab4, Rab5 und Rab11A an der intrazellulären Translokation des Glucosetransporters GLUT4 nachgewiesen werden. Ergebnisse neuester Untersuchungen zeigen außerdem, dass Rab2A, Rab8A, Rab10 und Rab14 ebenfalls in GLUT4-enthaltenden Membranvesikeln lokalisiert sind, ihre Funktion ist jedoch noch unklar [Larance *et al.*, 2005; Miinea *et al.*, 2005].

Rab4 wurde in GLUT4-enhaltenden Membranvesikeln des Endosomalen Recycling-Kompartiments und in GLUT4-Speichervesikeln von Muskel- und Fettzellen nachgewiesen [Cormont *et al.*, 1993; Sherman *et al.*, 1996; Hashiramoto & James, 2000]. Die Überexpression von Rab4 führte zu einer erhöhten Endozytose von GLUT4 in intrazelluläre Kompartimente, da Rab4 den Transport von GLUT4 in Insulin-sensitive Speichervesikel stimuliert [Cormont *et al.*, 1996 a; Dransfeld *et al.*, 2000; Cormont & Le Marchand-Brustel, 2001]. Außerdem wurde postuliert, dass durch die Insulin-stimulierte Umverteilung von Rab4 aus den GLUT4-Speichervesikeln in das Zytosol die Translokation der GLUT4-Speichervesikel zur Plasmamembran aktiviert wird [Cormont *et al.*, 1993; Shibata *et al.*, 1997]. Die Überexpression der dominant-negativen bzw. nicht-prenylierten zytosolischen Variante von Rab4 sowie die Injektion blockierender anti-Rab4-Antikörper führten zu einer Inhibition der Insulin-stimulierten Translokation von GLUT4 zur Plasmamembran [Cormont *et al.*, 1996 a; Vollenweider *et al.*, 1997; Knight *et al.*, 2000]. Außerdem bindet Rab4 direkt an das t-SNARE-Protein Syntaxin 4 und kann dadurch die Fusion der GLUT4-Speichervesikel mit der Plasmamembran aktivieren [Li *et al.*, 2001].

Als weiteres Rab-Protein ist Rab5 an der Regulation der intrazellulären Translokation des Glucosetransporters GLUT4 beteiligt. Rab5 wurde in Clathrin-beschichteten Membranvesikeln sowie Frühen Endosomen lokalisiert und reguliert die Entstehung und den Transport der Clathrin-beschichteten Membranvesikel sowie deren Fusion mit Frühen Endosomen und die homotypische Fusion von Frühen Endosomen [Bucci *et al.*, 1992; McLauchlan *et al.*, 1998; Woodman, 2000]. In Insulin-stimulierten 3T3-L1-Fettzellen führte die Injektion blockierender anti-Rab5-Antikörper nach der Entfernung des Hormons zu einer Inhibition der Internalisierung von GLUT4 aus der Plasmamembran [Huang *et al.*, 2001]. Außerdem wurde gezeigt, dass die Insulin-induzierte Hydrolyse von Rab5-gebundenem GTP in 3T3-L1-Fettzellen unabhängig von der Aktivität der Phosphatidylinositol-3-Kinase erfolgt [Cormont *et al.*, 1996 b].

Die Charakterisierung der Interaktion von Rab11A mit GLUT4-enhaltenden Membranvesikeln in Insulin-sensitiven Muskelzellen war Gegenstand der vorliegenden Arbeit (siehe Kap. 1.8, S. 47). Struktur, Funktion und Lokalisation von Rab11A als Regulator von intrazellulären Transportprozessen mit besonderer Berücksichtigung bereits bekannter Ergebnisse aus Untersuchungen der Insulin-stimulierten Translokation des Glucosetransporters GLUT4 sowie die Interaktion von Rab11A mit Rab11-spezifischen Effektorproteinen sind in Kap. 1.7 (S. 40) detailliert beschrieben.

1.6 Familie der Rab-Proteine

Die *Ras homologues for brain* (Rab)-Proteine sind Enzyme, die die hydrolytische Spaltung von Guanosin-5'-triphosphat (GTP) in Guanosin-5'-diphosphat (GDP) und anorganisches Phosphat katalysieren. Aufgrund dieser Phosphatase-Aktivität existieren Rab-Proteine - auch Rab-GTPasen genannt - in zwei unterschiedlichen Konformationen: der aktiven GTP-gebundenen Form, die mit Rab-spezifischen Effektorproteinen interagieren kann, und der inaktiven GDP-gebundenen Form [Hall, 1990; Stenmark *et al.*, 1994; Zerial & McBride, 2001]. Der Kreislauf zwischen diesen beiden interkonvertiblen Proteinkonformationen (GDP-GTP-Zyklus) wird durch mehrere Rab-spezifische Regulatorproteine koordiniert und ermöglicht es Rab-Proteinen, als molekulare Schalter innerhalb der zellulären Signaltransduktion zu wirken [Takai *et al.*, 2001].

Rab-Proteine gehören zur Superfamilie der Kleinen GTP-bindenden Proteine. Proteine dieser Superfamilie sind monomere Guaninnukleotid-bindende Proteine mit einem Molekulargewicht von 20 - 40 kDa und werden aufgrund ihrer Struktur den Proteinfamilien Ras, Rho, Rab, Sar1 / Arf und Ran zugeordnet [Touchot *et al.*, 1987; Bourne *et al.*, 1990]. Bisher wurden ca. 130 Kleine GTP-bindende Proteine identifiziert, wobei die Rab-Proteine die größte Gruppe innerhalb der Superfamilie darstellen [Takai *et al.*, 2001]. Kleine GTP-bindende Proteine - auch Ras-homologe Kleine GTPasen genannt - kommen in allen Eukaryonten vor und sind an einer Vielzahl unterschiedlicher zellulärer Regulationsprozesse beteiligt (siehe Tab. 2, S. 29).

Rab-Proteine wurden in allen bisher untersuchten Eukaryonten identifiziert und konnten in nahezu allen Zelltypen höherentwickelter Organismen nachgewiesen werden [Rubin *et al.*, 2000; Stenmark & Olkkonen, 2001]. Rab-Proteine besitzen eine charakteristische subzelluläre Lokalisation und sind an Membranen des Endozytose- und Exozytoseweges lokalisiert, um die Entstehung und den Transport sowie Andock- und Fusionsprozesse von Membranvesikeln zu regulieren [Segev, 2001; Zerial & McBride, 2001; Pfeffer, 2003]. Dabei ist die Interaktion der Rab-Proteine mit Rab-spezifischen Effektorproteinen für die lokale und temporale Koordination dieser Zellprozesse entscheidend [Christoforidis *et al.*, 1999 a; Gonzalez & Scheller, 1999].

Durch die funktionelle Charakterisierung der Rab-Proteine Sec4 und Ypt1 aus *S. cerevisiae* wurden erstmals Hinweise erhalten, dass Rab-Proteine an der Regulation von Exozytose- und Sekretionsprozessen beteiligt sind. Während Sec4 für den intrazellulären Vesikeltransport vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran erforderlich ist, reguliert Ypt1, dessen Gen

YPT1 zwischen Aktin- und Tubulin-Genen lokalisiert ist, den Vesikeltransport vom Endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat [Gallwitz *et al.*, 1983; Salminen & Novick, 1987; Segev *et al.*, 1988]. Insgesamt wurden 11 Rab-Proteine in *S. cerevisiae* identifiziert, die fast alle ein bzw. mehrere homologe Säugerproteine haben [Lazar *et al.*, 1997; Stenmark & Olkkonen, 2001]. Die Sequenzierung des Humangenoms ergab mindestens 60 Rab-Proteine, deren Homologiegrad bis zu 90 % beträgt [Bock *et al.*, 2001].

Proteinfamilie	Funktion
Ras (H-, K-, R-ras / Rap1-2)	Regulation der Genexpression (Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Apoptose)
Rho (RhoA-H / Rac1-3 / TC10)	Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts, Regulation der Genexpression (Zellproliferation)
Rab (Rab1-44 / Sec4 / Ypt1)	Vesikelentstehung, -transport und -fusion
Sar1 / Arf (Sar1 / Arf1-6 / Arl1-7)	Vesikelentstehung und -transport
Ran	Nukleo-Zytoplasmatischer Transport, Reorganisation des Mikrotubuli-Zytoskeletts

Tab. 2 Übersicht der Proteinfamilien der Superfamilie der Kleinen GTP-bindenden Proteine [nach Takai *et al.*, 2001].

Interessanterweise können sich die Funktionen homologer Rab-Proteine in verschiedenen Organismen deutlich unterscheiden. Während Rab11A in Säugerzellen den Vesikeltransport innerhalb des Endosomalen Recycling-Kompartiments und den Transport aus dem trans-Golgi-Netzwerk zur Plasmamembran reguliert, sind die homologen Proteine Ypt31p und Ypt32p in *S. cerevisiae* sowohl an der Koordination des intra-Golgi-Transports als auch an proteinsekretorischen Prozessen beteiligt [Benli *et al.*, 1996; Ullrich *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1998]. Rab-Proteine werden nahezu ubiquitär exprimiert. Eine gewebespezifische Expression konnte nur für Rab3A in exokrinen Zellen und Neuronen sowie für Rab17 und Rab25 in polarisierten Epithelzellen nachgewiesen werden [Fischer von Mollard *et al.*, 1990; Goldenring *et al.*, 1993; Lutcke *et al.*, 1994].

Untersuchungen von humanen Rab-Protein-codierenden Genen zeigten, dass Sequenzveränderungen pathophysiologisch bedeutsam sind und zu genetisch bedingten Erkrankungen führen. Durch homozygote Missense-Mutationen im Rab27A-codierenden Gen RAB27A entsteht eine Pigment-Anomalie bei gleichzeitiger T-Zell-Dysfunktion (Griscelli-Syndrom - Typ 2), da durch eine Veränderung der Proteinkonformation von Rab27A sowohl der Transport der Melanosomen in den Melanozyten als auch die Sekretion von Granula in zytotoxischen T-Lymphozyten gestört ist [Menasche *et al.*, 2000; Hume *et al.*, 2001; Stinchcombe *et al.*, 2001].

1.6.1 Klassifikation der Rab-Proteine

Rab-Proteine besitzen aufgrund von Genduplikationen eine hohe Sequenzhomologie (75 - 90 %) und werden in zehn Subfamilien unterteilt [Moore *et al.*, 1995; Pereira-Leal & Seabra, 2000; Bock *et al.*, 2001]. Die Rab-Subfamilien (SF) wie Rab3-SF, Rab4-SF, Rab5-SF oder Rab11-SF, die aus den beiden Rab11-Isoformen Rab11A und Rab11B sowie Rab25 besteht, besitzen vier unterschiedliche Rab-Subfamilien-Regionen [Pereira-Leal & Seabra, 2000]. Diese Regionen werden an der Proteinoberfläche exponiert und dienen als Bindungsorte von Rab-spezifischen Effektorproteinen zur Erkennung der nukleotid-abhängigen Konformation der Rab-Proteine [Ostermeier & Brunger, 1999; Stenmark & Olkkonen, 2001]. Einige Rab-Proteine wie Rab20 und Rab28 konnten bisher keiner Subfamilie zugeordnet werden [Pereira-Leal & Seabra, 2000].

1.6.2 Strukturelle Organisation der Rab-Proteine

Rab-Proteine sind Enzyme, die gebundenes GTP in GDP und anorganisches Phosphat hydrolytisch spalten. Die Phosphatase-Reaktion wird durch zahlreiche funktionelle Domänen der Rab-Proteine ermöglicht, die die Formation des katalytischen Zentrums, die Nukleotidbindung, die Orientierung des reagierenden Wassermoleküls, die Positionierung des Magnesiumions als Kofaktor sowie die Assoziation von spezifischen Regulator- und Effektorproteinen realisieren.

Aus Ergebnissen von Röntgenkristallstruktur-Untersuchungen der Rab-Proteine Rab3A aus *M. musculus*, Rab6 aus *P. falciparum* und Sec4 aus *S. cerevisiae* wurde ein allgemeines Raumstrukturmodell der Rab-Proteine entworfen, das die Positionen der funktionellen Domänen zueinander beschreibt und den Reaktionsmechanismus der enzymatischen Hydrolyse sowie die Stimulation durch Regulatorproteine verdeutlicht [Dumas *et al.*, 1999;

Chattopadhyay *et al.*, 2000; Stroupe & Brunger, 2000]. Der Vergleich mit Raumstrukturen anderer Proteine aus der Superfamilie der Kleinen GTP-bindenden Proteine wie H-ras p21, Ran oder RhoA ergab, dass die postulierte Konformation der katalytischen Domäne in der Superfamilie ubiquitär existiert [Pai *et al.*, 1990; Scheffzek *et al.*, 1995; Wei *et al.*, 1997].

In allen Kleinen GTP-bindenden Proteinen wurde ein charakteristisches Faltungsmuster identifiziert, das aus fünf α -Helices ($\alpha 1 - \alpha 5$), einem sechssträngigen gemischten β -Faltblatt ($\beta 1 - \beta 6$) und fünf Polypeptid-Schleifen (S1 - S5) besteht [Dever *et al.*, 1987; Bourne *et al.*, 1991]. Die Sekundärstrukturelemente bilden ein α/β -Faltungsmotiv, das auch als G-Domäne bezeichnet wird [Wittinghofer & Pai, 1991]. In Abb. 2 (S. 32) sind die Sekundärstrukturelemente und funktionellen Domänen der Rab-Proteine am Beispiel von Rab11A sowie die Raumstruktur von Rab11A Q70L•GDP•P dargestellt.

Der Strukturvergleich von Proteinen aus der Superfamilie der Kleinen GTP-bindenden Proteine, die entweder GTP oder GDP gebunden hatten, führte zur Identifizierung der Schleifenregionen *Switch I* und *Switch II*, deren Konformationsänderungen hoch korreliert sind [Journak, 1985; La Cour *et al.*, 1985; Sung *et al.*, 1995]. In der Region *Switch I*, die durch die Schleife S2 gebildet wird, sind die Bindungsstellen von Regulator- und Effektorproteinen lokalisiert. Die Schleife S3 und Teile der Helix $\alpha 2$ bilden die Region *Switch II*, die die höchste Flexibilität innerhalb der katalytischen Domäne besitzt [Spoerner *et al.*, 2001]. Durch die Bindung des Magnesiumions wird die aktive Konformation der Regionen *Switch I* und *Switch II* erhalten [Zhang & Matthews, 1998 a; Zhang & Matthews, 1998 b].

Für die Guaninnukleotid-Bindung der Kleinen GTP-bindenden Proteine ist die Schleife S1, die die Helix $\alpha 1$ mit dem Faltblatt $\beta 1$ verbindet und das vollständig konservierte Phosphat-Magnesiumion-Bindungsmotiv (PM)1-Motiv (in Rab11: Gly18 und Gly23-Lys24-Ser25) enthält, von entscheidender Bedeutung [Paduch *et al.*, 2001]. Durch die Lysin-Seitenkette, die sich eng an die GTP- β -Phosphatgruppe lagert, und die Hauptketten-Amidgruppen von vier Aminosäuren (in Rab11: Gly21-Val22-Gly23-Lys24) wird die negative Umgebung der Phosphatgruppen innerhalb des PM1-Motives positiv polarisiert. Außerdem bilden die Hauptketten-Amidgruppen von Gly23 und Lys24 mehrere Wasserstoffbrücken zu der GTP- α - und β -Phosphat- bzw. β - und γ -Phosphatgruppe. Der benachbarte Serin-Rest (in Rab11: Ser25) bildet ebenfalls Wasserstoffbrücken zu der GTP- β -Phosphatgruppe und ist mit der Hydroxylgruppe der Seitenkette an der Koordination des Magnesiumions beteiligt, das für die korrekte Position der Phosphatgruppen essentiell ist und insgesamt in einem hexakoordinierten Zustand vorliegt. Neben dem Serin-Rest koordinieren zwei

Sauerstoffatome der GTP-β- und γ-Phosphatgruppe, zwei Wassermoleküle und ein vollständig konservierter Threonin-Rest der Schleife S2 (in Rab11: Thr43) die Position des Magnesiumions [Wei *et al.*, 1997]. Zusätzlich bildet die Hauptketten-Amidgruppe des Threonin-Restes, der das PM2-Motiv darstellt, eine Wasserstoffbrücke zu einem

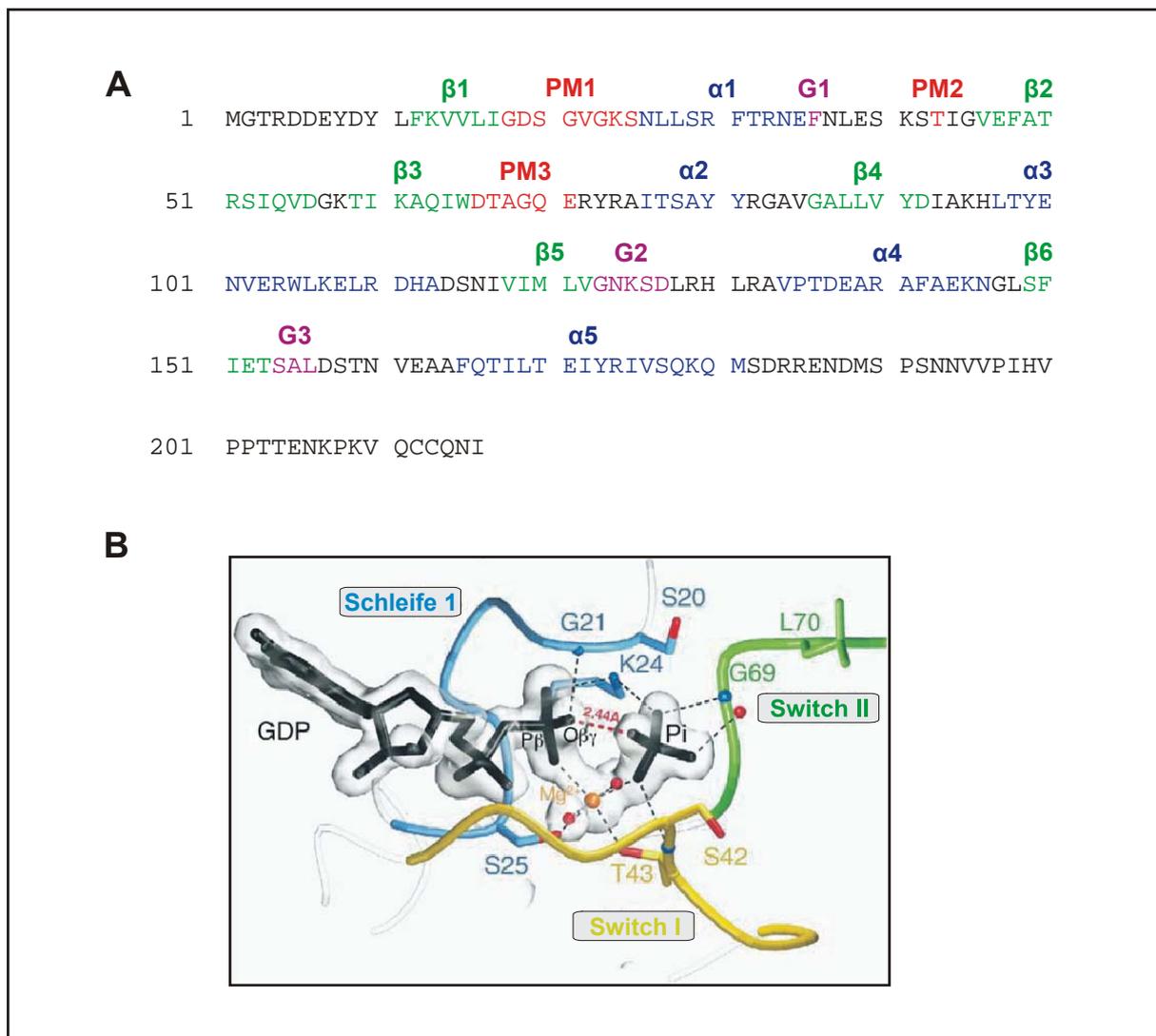


Abb. 2 Struktur und funktionelle Domänen von Rab11A [nach Stenmark & Olkkonen, 2001; Pasqualato & Cherfils, 2005].

A: Schematische Darstellung der Aminosäuresequenz mit Sekundärstrukturelementen, konservierten Regionen und funktionellen Domänen von Rab11A. **B:** Die Raumstruktur der konstitutiv-aktiven Mutante Rab11A Q70L zeigt die Interaktion des PM1-Motivs (Schleife 1), von Thr43 als PM2-Motiv (*Switch I*) und des PM3-Motivs (*Switch II*) mit GDP·P und dem Magnesiumion als Kofaktor. (α, α-Helix; β, β-Faltblatt; G, Guaninnukleotid-Bindungsmotiv; PM, Phosphat-Magnesiumion-Bindungsmotiv).

Sauerstoffatom der GTP- γ -Phosphatgruppe. Das PM3-Motiv, die vollständig konservierte Region Asp-Thr-Ala-Gly-Gln-Glu (in Rab11: Asp66 - Glu71), ist in der Schleife S3 lokalisiert und mit der Seitenkette des Aspartat-Restes über ein Wassermolekül mit dem Magnesiumion verbunden. Der Glycin-Rest bildet mit seiner Hauptketten-Amidgruppe eine Wasserstoffbrücke zu der GTP- γ -Phosphatgruppe und ist neben dem Threonin-Rest hauptsächlich für den Konformationswechsel zwischen aktiver und inaktiver Form verantwortlich [Vetter & Wittinghofer, 2001]. Der benachbarte Glutamin-Rest (in Rab11: Gln70), der bei der Hydrolyse von GTP als katalytische Base agiert, ist ebenfalls in allen Kleinen GTP-bindenden Proteinen vollständig konserviert (siehe Tab. 3, S. 34).

1.6.3 Enzymatische Aktivität der Rab-Proteine

Die Proteine aus der Superfamilie der Kleinen GTP-bindenden Proteine katalysieren die hydrolytische Spaltung von Guanosin-5'-triphosphat (GTP) in Guanosin-5'-diphosphat (GDP) und anorganisches Phosphat. Diese Reaktion wird als bimolekulare nukleophile Substitution (S_N2) bzw. Substrat-assistierte Katalyse bezeichnet [Schweins *et al.*, 1995; Kosloff & Seliger, 2001; Pasqualato & Cherfils, 2005]. Kleine GTP-bindende Proteine besitzen eine geringe intrinsische Hydrolyserate ($0,003 - 0,03 \text{ min}^{-1}$), die durch die Aktivität der GTPase-aktivierenden Proteine um den Faktor $10^4 - 10^5$ erhöht wird [Bourne *et al.*, 1991; Ahmadian *et al.*, 1997 a].

Aus der Aktivitätsanalyse von Ras und Ras-Mutanten sowie der röntgenkristallographischen Untersuchung des Proteinkomplexes von H-ras p21 in GDP-gebundener Form mit dem GTPase-aktivierenden Protein GAP-334 konnten entscheidende Fortschritte zur Aufklärung des Reaktionsmechanismus erzielt werden [Ahmadian *et al.*, 1997 b; Scheffzek *et al.*, 1997]. Während der Interaktion beider Proteine agiert die Aminosäure Arg789 des GTPase-aktivierenden Proteins als Arginin-Finger und bindet mit der Seitenkette das Brückensauerstoffatom zwischen der GTP- β - und γ -Phosphatgruppe sowie ein Sauerstoffatom der γ -Phosphatgruppe. Zusätzlich bindet die Hauptketten-Carboxylgruppe des Arginin-Restes an einen spezifischen Glutamin-Rest (in Rab11: Gln70) der Kleinen GTP-bindenden Proteine, der innerhalb des PM3-Motivs in der Schleife S3 lokalisiert ist. Dadurch wird die Position des nukleophil angreifenden Wassermoleküls stabilisiert [Resat *et al.*, 2001].

Der Glutamin-Rest innerhalb des PM3-Motivs (in Rab11: Gln70) besitzt eine zentrale Bedeutung für die enzymatische Aktivität der Rab-Proteine wie auch aller anderen Kleinen GTP-bindenden Proteine [Paduch *et al.*, 2001]. In Tab. 3 (S. 34) ist das hochkonservierte

Vorkommen des PM3-Motivs einschließlich des Glutamin (Q)-Restes in unterschiedlichen Proteinen aus der Superfamilie der Kleinen GTP-bindenden Proteine dargestellt.

Protein	UniProt-Referenz	Aminosäuresequenz des PM3-Motivs
H-ras p21	P01112	CLLDIL <u>DTAG Q E</u> EYSAMR
RhoA	P61586	VELALW <u>DTAG Q E</u> DYDRLR
Rac1	P63000	VNLGLW <u>DTAG Q E</u> DYDRLR
Rab4A	P20338	VKLQIW <u>DTAG Q E</u> RFRSVT
Rab11A	P62493	IKAQIW <u>DTAG Q E</u> RYRAIT
Rab11B	Q15907	IKAQIW <u>DTAG Q E</u> RYRAIT

Tab. 3 Aminosäuresequenz des katalytisch-aktiven PM3-Motivs von humanen Proteinen der Superfamilie der Kleinen GTP-bindenden Proteine.

Der Glutamin-Rest des PM3-Motivs agiert als katalytische Base der Reaktion, da die Carboxamidgruppe das nukleophile Wassermolekül polarisiert [Schweins *et al.*, 1995; Berghuis *et al.*, 1996]. Außerdem positioniert der Glutamin-Rest das Wassermolekül für die Hydrolyse und stabilisiert den bipyramidalen pentavalenten Übergangszustand, bevor der Transfer der negativen Ladung von der γ - auf die β -Phosphatgruppe von GTP stattfindet und die Bindung zwischen beiden Phosphatgruppen hydrolysiert wird [Frech *et al.*, 1994; Maegley *et al.*, 1996].

1.6.4 Posttranslationale Modifikationen der Rab-Proteine

Die hypervariable carboxyterminale Region der Rab-Proteine agiert als Signalsequenz, um die korrekte Assoziation der Proteine mit spezifischen Zielmembranen zu gewährleisten [Chavrier *et al.*, 1991]. Durch posttranslationale Lipidmodifikationen erhält diese Region einen hydrophoben Charakter, der neben einer reversiblen Bindung der Rab-Proteine an Plasma- oder Vesikelmembranen auch die Assoziation zusätzlicher Rab-spezifischer Regulatorproteine wie der Rab-GDP-Dissoziationsinhibitoren ermöglicht [Johnston *et al.*, 1991; Ullrich *et al.*, 1993; Zhang & Casey, 1996].

Die beiden carboxyterminalen Cystein-Reste der Rab-Proteine, die in zwei unterschiedlichen Sequenzmotiven (Cys-X-Cys / Cys-Cys) vorliegen können, werden durch die Geranylgeranyltransferase II mit Geranylgeranylpyrophosphat, einem Intermediärprodukt der Ubichinon-Biosynthese aus vier Isopren-Monomeren, pro Cystein-Rest prenyliert [Seabra *et al.*, 1992]. Zusätzlich zu der Bindung der neusynthetisierten Rab-Proteine für die Lipid-modifikation agiert die Enzymuntereinheit REP1 der Geranylgeranyltransferase II als Rab-Escort-Protein (REP) und transloziert die Rab-Proteine nach deren Prenylierung als Chaperon zur Zielmembran [Andres *et al.*, 1993].

1.6.5 GDP-GTP-Zyklus der Rab-Proteine

Um als Regulatorproteine bei Vesikelentstehung, -transport und -fusion agieren zu können, besitzen Rab-Proteine ein besonderes Charakteristikum: die Synchronisation zweier distinkter Kreisläufe. Während des GDP-GTP-Zyklus der Rab-Proteine, dem reversiblen Austausch von GDP und GTP, ändert sich ebenfalls die Zelllokalisierung. Inaktive GDP-gebundene Rab-Proteine werden aus dem Zytosol in spezifische Zielmembranen transloziert, wo sie in ihrer aktiven GTP-gebundenen Form mit Effektorproteinen interagieren und dadurch die Signaltransduktion realisieren [Stenmark & Olkkonen, 2001; Takai *et al.*, 2001; Zerial & McBride, 2001]. In Abb. 3 (S. 36) ist das allgemeine Reaktionsschema des GDP-GTP-Zyklus dargestellt.

Beide Kreisläufe der Rab-Proteine, der GDP-GTP-Austausch sowie die Translokation zwischen Zytosol und Membranvesikeln, werden durch mindestens drei verschiedene Gruppen von Rab-spezifischen Regulatorproteinen koordiniert. Dazu gehören die Gruppe der Rab-GDP-Dissoziationsinhibitoren, der Rab-Guaninnukleotid-Austauschfaktoren und der Rab-GTPase-aktivierenden Proteine, die in den nachfolgenden Abschnitten beschrieben werden.

Rab-GDP-Dissoziationsinhibitoren

Rab-Proteine sind während des Gleichgewichtszustandes der Zelle zu 10 - 50 % im Zytosol lokalisiert und bilden in ihrer inaktiven GDP-gebundenen Form einen Komplex mit Rab-spezifischen *GDP dissociation inhibitor* - Proteinen (Rab-GDI; Schimmöller *et al.*, 1998). Bisher wurden drei Rab-GDI-Isoformen identifiziert, wobei die Isoformen Rab-GDI α und Rab-GDI β bereits intensiv charakterisiert sind [Sasaki *et al.*, 1990; Shisheva *et al.*, 1994; Janoueix-Lerosey *et al.*, 1995]. Während Rab-GDI α ubiquitär exprimiert wird, konnte

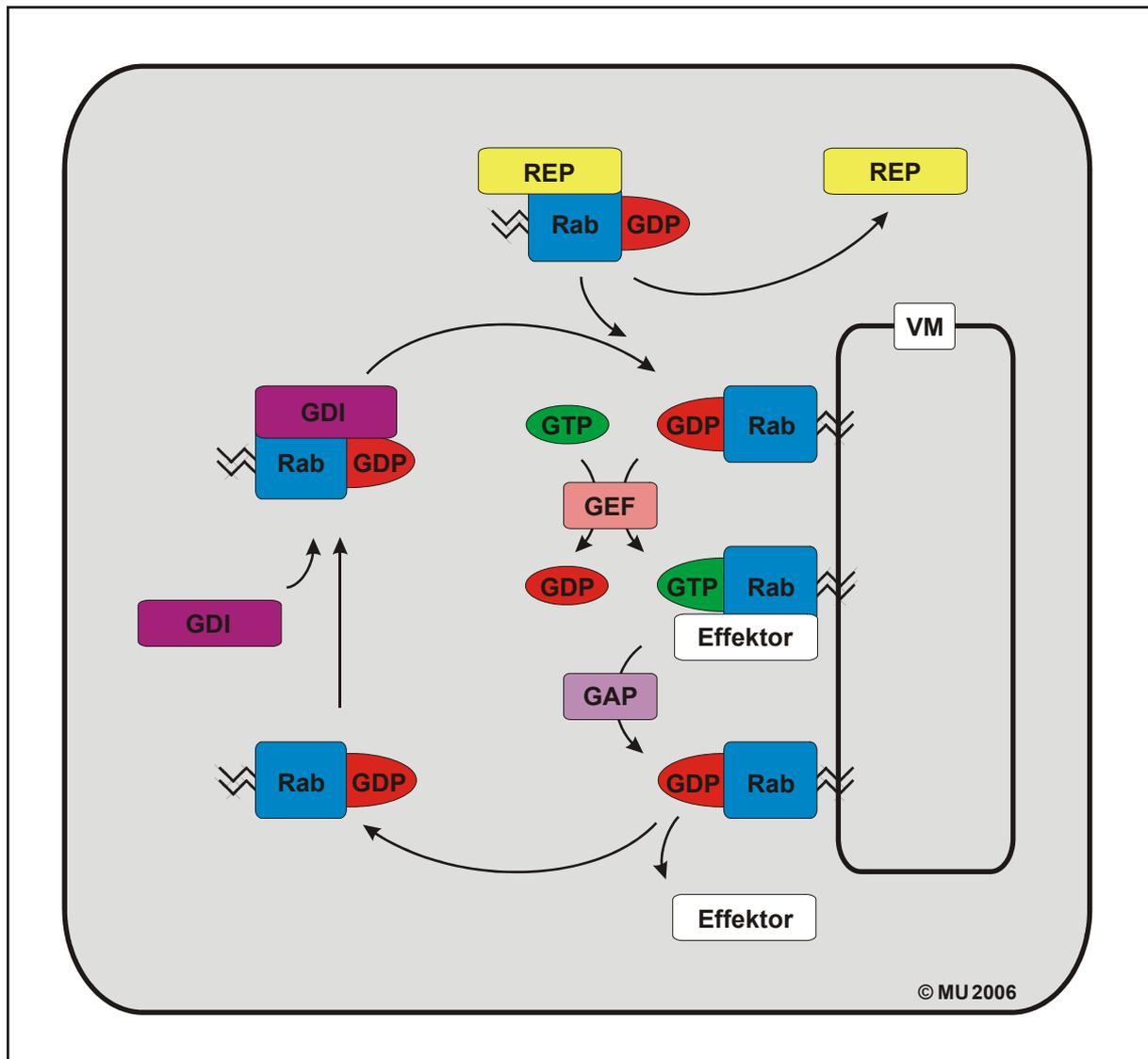


Abb. 3 Allgemeines Reaktionsschema des GDP-GTP-Zyklus von Rab-Proteinen [nach Stenmark & Olkkonen, 2001].

Rab-Proteine sind in ihrer inaktiven Form im Zytosol lokalisiert und bilden einen Proteinkomplex mit einem Rab-GDI-Protein, das die Dissoziation von GDP verhindert. Durch die Interaktion eines Rab-GEF-Proteins mit dem Rab/Rab-GDI-Komplex erfolgt die Dissoziation des Proteinkomplexes, die Membranassoziation des Rab-Proteins und die Bindung von GTP, wobei zwischenzeitlich ein binärer Komplex aus Rab-GEF- und Rab-Protein entsteht. Durch die GTP-Bindung wird eine Konformationsänderung des Rab-Proteins induziert und dadurch die Interaktion mit Rab-spezifischen Effektorproteinen ermöglicht. Die nachfolgende Assoziation eines Rab-GAP-Proteins führt zur Stimulation der Rab-GTPase-Aktivität, sodass GTP in GDP und anorganisches Phosphat gespalten wird. Durch die Hydrolyse des Rab-gebundenen GTP entsteht eine Konformationsänderung innerhalb des Rab-Proteins, die zu der Dissoziation der Effektorproteine und der nachfolgenden Redistribution des Rab-GDP-Proteins in das Zytosol führt. Das Rab-GDP-Protein wird durch ein Rab-GDI-Protein gebunden und kann erneut aktiviert

werden. Zusätzlich ist der Transport neusynthetisierter Rab-Proteine durch REP dargestellt. (GAP, GTPase-aktivierendes Protein; GEF, Guaninnukleotid-Austauschfaktor; GDI, GDP-Dissoziationsinhibitor; GDP, Guanosin-5'-diphosphat; GTP, Guanosin-5'-triphosphat; Rab, Rab-Protein; REP, Rab-Escort-Protein; VM, Vesikelmembran).

Rab-GDI β nur in Neuronen nachgewiesen werden, wobei die Funktion beider Isoformen identisch ist [Nishimura *et al.*, 1994; Araki *et al.*, 1995]. Beide Rab-GDI-Proteine binden nur lipidmodifizierte Rab-GDP-Proteine und inhibieren sowohl die basale als auch die Rab-GEF-stimulierte Dissoziation von GDP. Zusätzlich agieren Rab-GDI-Proteine als Recycling-Faktoren, da die Rab-Proteine nach der Hydrolyse von gebundenem GTP aus den Membranvesikeln durch Rab-GDI-Proteine in das Zytosol transloziert werden [Nishimura *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1994].

Außerdem regulieren Rab-GDI-Proteine, die eine große strukturelle Ähnlichkeit zu Rab-Escort-Proteinen besitzen, den Transport prenylierter Rab-Proteine wie Rab5 oder Rab9 zu deren Zielmembranen [Soldati *et al.*, 1994; Ullrich *et al.*, 1994; Schalk *et al.*, 1996]. Bei Patienten mit X-chromosomaler mentaler Retardierung wurden Mutationen im Rab-GDI α -Gen nachgewiesen, die zu einer Störung des neurosynaptischen Vesikeltransports führen [D'Adamo *et al.*, 1998].

Rab-Guaninnukleotid-Austauschfaktoren

Bisher wurden in Säugerzellen zwei Rab-spezifische Guanine nucleotide exchange factor-Proteine (Rab-GEF) isoliert und charakterisiert. Rab3-GEF interagiert ausschließlich mit Proteinen der Rab3-Subfamilie (Rab3-SF), wobei die Bindung der lipidmodifizierten Form der Rab3-SF-Proteine bevorzugt wird. Gegenüber Rab5 und Rab11A zeigt Rab3-GEF keine Aktivität [Wada *et al.*, 1997]. Die Regulation des Nukleotidaustausches bei Rab5 erfolgt durch Rabex-5, das als Komplex mit dem Rab5-spezifischen Effektorprotein Rabaptin-5 an Rab5 bindet und somit den Nukleotidaustausch und die Interaktion von Rab-Protein und Effektorprotein koppelt [Horiuchi *et al.*, 1997].

Da die Dissoziation von GDP aus Rab-GDP den geschwindigkeitslimitierenden Schritt während des gesamten GDP-GTP-Zyklus darstellt und durch die Aktivität der Rab-GDI-Proteine inhibiert wird, wurden zusätzliche Regulatorproteine für den Nukleotidaustausch postuliert. Bisher wurde ein GDI displacement factor-Protein (GDF) identifiziert, das die GDP-Dissoziation von Rab9 stimuliert, aber keine Rab-GEF-Aktivität besitzt [Dirac-Svejstrup *et al.*, 1997].

Rab-GTPase-aktivierende Proteine

Rab-Proteine besitzen *per se* nur eine geringe intrinsische GTPase-Aktivität, die durch die Bindung von Rab-GTPase-aktivierenden Proteinen (Rab-GAP) an Rab-Proteine in GTP-gebundener Form stimuliert wird. Durch die Interaktion von Rab-GAP und Rab-Protein wird das Rab-gebundene GTP hydrolysiert und das Rab-Protein in die inaktive GDP-gebundene Form konvertiert. Dabei induziert das Arginin-Finger-Motiv von Rab-GAP in den Regionen *Switch I* und *Switch II* der Rab-Proteine eine Konformationsänderung, die die Bindung des Magnesiumions stabilisiert, das reagierende Wassermolekül für den nukleophilen Angriff positioniert und die Entstehung des pentavalenten Übergangszustand der Hydrolyse-Reaktion stimuliert [Scheffzek *et al.*, 1996; Rittinger *et al.*, 1997; Resat *et al.*, 2001].

Die beiden bisher in Säugerzellen identifizierten Rab-GAP-Proteine Rab3-GAP und GAPCenA aktivieren durch ihre katalytischen Untereinheiten spezifisch die Proteine der Rab3-Subfamilie bzw. Rab6 [Fukui *et al.*, 1997; Cuif *et al.*, 1999]. Untersuchungen der Rab-Proteine Rab4 und Rab5 ergaben, dass deren GTPase-Aktivität durch die Bindung der regulatorischen Untereinheit p85 α der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase) stimuliert wird [Shibata *et al.*, 1997]. Die Rab-GAP-Aktivität von p85 α konnte für Rab11A nicht gezeigt werden [Chamberlain *et al.*, 2004].

Mit AS160, einem Substrat der Proteinkinase B, konnte ein Protein der PI-3-Kinase-vermittelten Insulinsignalkaskade identifiziert werden, dass eine Rab-GAP-Aktivität besitzt (siehe Kap. 1.4.3, S. 16). Eine direkte Rab-GAP-Interaktion von AS160 wurde bisher für die Rab-Proteine Rab2A, Rab8A, Rab10 und Rab14 nachgewiesen [Miinea *et al.*, 2005].

Interessanterweise ergaben Analysen der GTPase-Aktivität von mutierten konstitutiv-aktiven Rab-Proteinen, dass die GTP-Hydrolyse auch von der Regulatorfunktion entkoppelt sein kann. So wurde für Rab5 gezeigt, dass homotypische Endosomen-Fusionen unabhängig von der enzymatischen Aktivität der Rab-GTPase verlaufen [Rybin *et al.*, 1996]. Untersuchungen von Membranvesikeln mit internalisierten Transferrinrezeptoren ergaben, dass die Hydrolyse von Rab11A-gebundenem GTP nur für das Transferrinrezeptor-Recycling aus Recycling-Endosomen zur Plasmamembran erforderlich ist, aber nicht für den direkten Transport von Frühen Endosomen zur Plasmamembran [Ren *et al.*, 1998].

1.6.6 Rab-spezifische Effektorproteine

Für die zelluläre Aktivität der Rab-Proteine, der Regulation von Vesikelentstehung, -transport und -fusion, ist die Bindung von Rab-spezifischen Effektorproteinen entscheidend. Dabei

können sowohl mehrere Effektorproteine in einer konzertierten Aktion an ein Rab-Protein binden als auch verschiedene Rab-Proteine mit einem Effektorprotein interagieren, das somit als Brückenprotein die Regulation verschiedener Vesikeltransportwege vernetzen kann [Gonzalez & Scheller, 1999; Hickson *et al.*, 2003; Wilson *et al.*, 2005]. Effektorproteine sind strukturell sehr heterogen, zu ihnen gehören u.a. membranassoziierte Proteine, Enzyme sowie Proteine des Aktin- bzw. Mikrotubuli-Zytoskeletts [Stenmark & Olkkonen, 2001].

Als erstes Rab-spezifisches Effektorprotein wurde Rabphilin-3 identifiziert, das auf der Oberfläche synaptischer Vesikel lokalisiert ist und als ein Effektorprotein von Rab3A an der Calciumionen-induzierten Exozytose synaptischer Vesikel in Neuronen beteiligt ist [Shirataki *et al.*, 1993; Mizoguchi *et al.*, 1994; Geppert *et al.*, 1997]. Die Bindung von Rab3A und Rabphilin-3 an α -Aktinin induziert eine Umformierung des Aktin-Zytoskeletts, die die Fusion synaptischer Vesikel mit der Plasmamembran ermöglicht. Dabei agiert Rabphilin-3 als ein Brückenprotein, das Vesikelmembran und Aktin-Zytoskelett verknüpft [Kato *et al.*, 1996]. Für die Regulation des synaptischen Vesikeltransports ist Rabphilin-3 jedoch nicht essentiell, da eine Deletion durch andere Effektorproteine kompensiert werden kann [Schluter *et al.*, 1999]. Ergebnisse von Rabphilin-3-Untersuchungen zeigten außerdem, dass das Effektorprotein nur mit Proteinen der Rab3-Subfamilie interagiert und dabei deren GTPase-Aktivität inhibiert [Shirataki *et al.*, 1993; Schimmöller *et al.*, 1998].

Für Rab5, das an homotypischen Endosomen-Fusionen sowie an Fissionen der Plasmamembran und dem nachfolgenden Transport der Clathrin-beschichteten Membranvesikel zu den Frühen Endosomen beteiligt ist, wurden mehr als 20 Polypeptide als Effektorproteine postuliert [Bucci *et al.*, 1992; Christoforidis *et al.*, 1999 a; Simpson & Jones, 2005]. Neben Rabaptin-5 und Rabenosyn-5 wurden das Early endosome antigen 1 (EEA1) und die regulatorische Untereinheit p85 α der Phosphatidylinositol-3-Kinase identifiziert [Stenmark *et al.*, 1995; Christoforidis *et al.*, 1999 a; Christoforidis *et al.*, 1999 b; Nielsen *et al.*, 2000]. Die Bindung von Rab5 an p85 α führt neben einer Stabilisierung der Membranassoziation von EEA1 auch zu einer Stimulation der GTPase-Aktivität von Rab5 [Simonsen *et al.*, 1998; Chamberlain *et al.*, 2004]. Durch Rabaptin-5, das Rab5 und Rab4 in unterschiedlichen Domänen bindet, wird der Transport der Frühen Endosomen reguliert, in denen Rab5 und Rab4 sukzessiv colokalisiert sind [Vitale *et al.*, 1998]. Durch die Bindung des Effektorproteins Rabankyrin-5 an Rab5 werden in polarisierten Epithelzellen unterschiedliche Endozytosewege koordiniert, da der Proteinkomplex sowohl Endosomen-Fusionen als auch Pinozytose-Prozesse reguliert [Schnatwinkel *et al.*, 2004].

Für die Regulation des Vesikeltransports können Rab-Proteine mit Proteinen des Aktin- bzw. Mikrotubuli-Zytoskeletts interagieren. So assoziiert Rab6 mit dem Kinesin-Motorprotein Rabkinesin-6, um den retrograden Vesikeltransport zwischen Golgi-Apparat und Endoplasmatischem Retikulum zu realisieren [Echard *et al.*, 1998; White *et al.*, 1999]. In Melanozyten ist die Assoziation von Rab27A mit dem Effektorprotein Melanophilin für die Bindung des Aktin-Motorproteins Myosin Va erforderlich, sodass der Melanosomen-Transport entlang der Mikrofilamente des Aktin-Zytoskelett stattfinden kann [Hume *et al.*, 2001; Matesic *et al.*, 2001]. Rab11-spezifische Effektorproteine sind in Kap. 1.7.2 (S. 43) detailliert beschrieben.

1.7 Rab-Protein Rab11A

1.7.1 Allgemeiner Überblick

Das Rab-Protein Rab11A ist ein Kleines GTP-bindendes Protein und gehört neben Rab11B und Rab25 zur Rab11-Subfamilie [Bock *et al.*, 2001]. Während Rab11A und Rab11B ubiquitär exprimiert werden, beschränkt sich das Vorkommen von Rab25 ausschließlich auf Epithelzellen [Goldenring *et al.*, 1993; Goldenring *et al.*, 1996]. Rab11A (24 kDa), das aus 216 Aminosäuren besteht, wurde erstmals in neuronalen Membranfraktionen identifiziert und wurde danach sowohl in polarisierten als auch in nicht-polarisierten Zellen nachgewiesen [Kikuchi *et al.*, 1988; Chavrier *et al.*, 1990; Ohmori *et al.*, 1990]. Rab11A ist von zentraler Bedeutung bei der Regulation intrazellulärer Transportprozesse wie dem endosomalen Recycling von internalisierten Transportproteinen und Rezeptoren, der Phagozytose und der Translokation sekretorischer Vesikel [Ullrich *et al.*, 1996; Cox *et al.*, 2000; de Graaf *et al.*, 2004]. Außerdem reguliert Rab11A die Proteinsortierung aus dem trans-Golgi-Netzwerk bzw. aus degradativen Lysosomen in Recycling-Endosomen [Wilcke *et al.*, 2000; Peden *et al.*, 2004].

Durch die Analyse von Recycling-Endosomen konnte die Beteiligung von Rab11A an der Regulation des endosomalen Recycling von Transportproteinen und Rezeptoren in polarisierten und nicht-polarisierten Zellen nachgewiesen werden [Ullrich *et al.*, 1996; Green *et al.*, 1997; Sönnichsen *et al.*, 2000]. Rab11A ist in den perizentriolaren Recycling-Endosomen lokalisiert, die den Transferrinrezeptor zur Plasmamembran transportieren. Die Überexpression von Rab11A oder der konstitutiv-aktiven Mutante führte zu einer Akkumulation des Transferrinrezeptors in der perizentriolaren Region, während die dominant-negative Mutante von Rab11A eine Auflösung der tubulovesikulären Strukturen

des Endosomalen Recycling-Kompartiments induzierte. Durch temperaturabhängige Untersuchungen des intrazellulären Endosomen-Transports konnte der initiale Befund bestätigt und erweitert werden [Ren *et al.*, 1998]. Die Überexpression der konstitutiv-aktiven Mutante von Rab11A führte zu einer Inhibition des Austritts der Recycling-Endosomen aus dem Endosomalen Recycling-Kompartiment und zu einer verstärkten Segregation distinkter Subkompartimente des Endosomalen Recycling-Kompartiments [Teter *et al.*, 1998; Wilcke *et al.*, 2000]. In gastrointestinalen und renalen Epithelzellen ist Rab11A in subapikalen tubulären Membranvesikeln lokalisiert und reguliert das endosomale Recycling zur apikalen Plasmamembran [Goldenring *et al.*, 1994; Casanova *et al.*, 1999].

In unserer Arbeitsgruppe wurde Rab11A als eine Hauptkomponente der GLUT4-enthaltenden Membranvesikeln in isolierten Ratten-Herzmuskelzellen identifiziert [Kessler *et al.*, 2000]. Die *in vivo*-Insulinstimulation führte neben der Verringerung der Menge mikrosomaler GLUT4-enthaltender Membranvesikel zu einer Verdoppelung des relativen Anteils von Rab11A in den GLUT4-enthaltenden Membranvesikeln und der Menge von Rab11A in der Plasmamembran. Lokalisationsuntersuchungen zeigten, dass sich durch die Insulin-induzierte Umverteilung der GLUT4-enthaltenden Membranvesikel aus dem Endosomalen Recycling-Kompartiment in nicht-endosomale GLUT4-Speichervesikel die Menge von Rab11A in Recycling-Endosomen verringert und in nicht-endosomalen GLUT4-Speichervesikeln erhöht. Die Fortführung dieser Untersuchungen zur weiteren Aufklärung der Funktion von Rab11A bei der intrazellulären Translokation des Insulin-sensitiven Glucosetransporters GLUT4 war Gegenstand der vorliegenden Arbeit (siehe Kap. 1.8, S. 47).

Rab11A reguliert neben dem intrazellulären Transport von Glucosetransporter GLUT4 und Transferrinrezeptor auch das endosomale Recycling weiterer Rezeptorproteine. Dazu gehören u.a. der Angiotensin II - Typ 1A-Rezeptor, der β 2-adrenerge Rezeptor, der M4-muscarinische Acetylcholinrezeptor, der Neurokinin-1-Rezeptor und der TGF β -Rezeptor [Volpicelli *et al.*, 2002; Dale *et al.*, 2004; Mitchell *et al.*, 2004; Moore *et al.*, 2004; Roosterman *et al.*, 2004].

Zusätzlich zu dem langsam verlaufenden Transport von Recycling-Endosomen ist Rab11A auch an einem direkten Recycling aus Sortier-Endosomen zur Plasmamembran beteiligt [Ullrich *et al.*, 1996; Ren *et al.*, 1998]. Interessanterweise konnte in nicht-transfizierten Zellen keine Endosomenpopulation mit einer Colokalisation von Rab11A und den entsprechenden Markerproteinen Rab4 bzw. Rab5 nachgewiesen werden [Sheff *et al.*, 1999; Tritschler *et al.*,

1999]. Dagegen konnte eine Beteiligung von Rab11A an der Regulation des interendosomalen Transports aus Frühen Endosomen in Recycling-Endosomen ebenso ausgeschlossen werden wie eine Interaktion bei Transportprozessen aus Frühen Endosomen in Späte Endosomen bzw. aus dem trans-Golgi-Netzwerk in Späte Endosomen [Ren *et al.*, 1998; Wilcke *et al.*, 2000].

Neben der Assoziation in Recycling-Endosomen wurde Rab11A auch im trans-Golgi-Netzwerk sowie im Golgi-Apparat und in sekretorischen post-Golgi-Vesikeln lokalisiert [Urbe *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1998]. Die Überexpression der dominant-negativen Mutante von Rab11A induzierte eine Akkumulation von TGN38, einem Markerprotein des trans-Golgi-Netzwerkes, in Recycling-Endosomen und führte zu einer Inhibition des endosomalen Recycling von TGN38, das zwischen Plasmamembran und trans-Golgi-Netzwerk zirkuliert [Wilcke *et al.*, 2000]. Mit diesem Befund wurde die Hypothese, dass Rab11A das endosomale Recycling als Sortierprotein beim Austritt aus dem Endosomalen Recycling-Kompartiment reguliert, erneut bestätigt.

Außerdem ist Rab11A an der Regulation des intrazellulären Transports der H⁺ / K⁺-ATPase, des G-Protein-gekoppelten Protease-aktivierten Rezeptors 2, des vesikulären Stomatitis-Virus-Glykoproteins und des epithelialen Adhäsionsproteins E-Cadherin aus dem trans-Golgi-Netzwerk zur Plasmamembran beteiligt [Calhoun *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1998; Roosterman *et al.*, 2003; Lock & Stow, 2005]. Die Exozytose aus dem Golgi-Apparat zur Plasmamembran wird ebenfalls von Rab11A reguliert, da die Überexpression der dominant-negativen Mutante die Translokation der beteiligten Recycling-Endosomen inhibierte [Chen *et al.*, 1998].

Ergebnisse neuester Untersuchungen belegen außerdem, dass Rab11A an der Regulation der Zytokinese und von homotypischen Fusionen der Multimembranvesikel sowie bei der Tumorgenese von Hautkarzinomen beteiligt ist [Gebhardt *et al.*, 2005; Savina *et al.*, 2005; Wilson *et al.*, 2005].

Im Gegensatz zu Rab11A ist die Funktion von Rab11B bisher nur unzureichend aufgeklärt. Rab11B besteht aus 218 Aminosäuren mit einer Sequenzhomologie zu Rab11A von 90 % [Lai *et al.*, 1994; Zhu *et al.*, 1994]. Sämtliche Sequenzunterschiede zwischen beiden Rab11-Isoformen befinden sich in der carboxyterminalen Region der Proteine, die als Signalsequenz für die korrekte Assoziation mit spezifischen Membranvesikeln relevant ist [Chavrier *et al.*, 1991]. So ergaben Untersuchungen von polarisierten Zellen, dass Rab11A

und Rab11B aufgrund ihrer Lokalisation in distinkten Vesikelkompartimenten an der Regulation unterschiedlicher Transportprozesse beteiligt sind [Lapierre *et al.*, 2003].

1.7.2 Rab11-spezifische Effektorproteine

Der Transport und die Fusion von Rab11A-enthaltenden Membranvesikeln wird durch Rab11-spezifische Effektorproteine reguliert. Als erstes Rab11-spezifisches Effektorprotein wurde Rabphilin-11 in Rab11A-enthaltenden Membranvesikeln des Endosomalen Recycling-Kompartiments in polarisierten und nicht-polarisierten Zellen identifiziert [Mammoto *et al.*, 1999; Zeng *et al.*, 1999]. Für den Transport von Recycling-Endosomen zur Plasmamembran ist die carboxyterminale WD40-Region von Rabphilin-11 entscheidend, die im Zytosol die Bindungsstelle von Rab11 maskiert. Lokalisationsuntersuchungen mit Rabphilin-11, dessen WD40-Region deletiert war, zeigten eine Inhibition des Transferrinrezeptor-Recycling der Rab11A-enthaltenden Membranvesikel. Interessanterweise wurde dieser Effekt durch die zusätzliche Expression einer trunkierten Form von Rab11A, deren membranverankernde carboxyterminale Region fehlte, vollständig kompensiert. Im Gegensatz zu Rabphilin-3, das die GTPase-Aktivität von Rab3 verringert, hat Rabphilin-11 keinen Einfluss auf die GTPase-Aktivität von Rab11 [Schimmöller *et al.*, 1998; Mammoto *et al.*, 1999; Zeng *et al.*, 1999].

Eine Gruppe von Rab11-spezifischen Effektorproteinen ist die Familie der Rab11-interagierenden Proteine (Rab11-FIP), deren Vertreter eine carboxyterminale Rab11 / Rab25-Bindungsdomäne (RBD) besitzen. Die hochkonservierte RBD-Region besteht aus 20 Aminosäuren mit einer α -helikale Konformation und interagiert durch hydrophobe Wechselwirkungen mit allen Proteinen der Rab11-Subfamilie [Hales *et al.*, 2001; Meyers & Prekeris, 2002]. Bisher wurden sechs Rab11-FIP-Proteine identifiziert: Rab11-FIP1, Rab11-FIP2 [Hales *et al.*, 2001], Rab11-FIP3 [Prekeris *et al.*, 2001], Rab11-FIP4 [Wallace *et al.*, 2002], *Rab coupling protein* [Lindsay *et al.*, 2002] und *Rab11 interacting protein* [Prekeris *et al.*, 2000]. Aufgrund von spezifischen Sequenzunterschieden wird die Gruppe der Rab11-FIP-Proteine in drei Klassen unterteilt [Meyers & Prekeris, 2002], die in Tab. 4 (S. 44) dargestellt sind.

Rab11-FIP-Proteine der Klasse 1

Die Proteine der Rab11-FIP-Klasse 1, Rab11-FIP2, *Rab coupling protein* (RCP) und *Rab11 interacting protein* (Rip11), sind als Effektorproteine von Rab11A an der Regulation des Transports von Recycling-Endosomen zur Plasmamembran beteiligt. *In vivo* - Bindungs-

untersuchungen ergaben, dass die Bindung von Rab11-FIP2, RCP bzw. Rip11 an Rab11A-GTP ca. 20fach höher ist als an Rab11A in GDP-gebundenem Zustand [Junutula *et al.*, 2004]. Dabei agieren die Proteine der Rab11-FIP-Klasse 1 als Homodimere und binden zwei Moleküle Rab11A. Außerdem wurde gezeigt, dass die Bindung der beiden Rab11-Isoformen Rab11A und Rab11B mit gleicher Affinität erfolgt.

Rab-FIP-Klasse	Rab11-FIP-Protein(e)
Klasse 1	Rab11-FIP2, RCP, Rip11
Klasse 2	Rab11-FIP3, Rab11-FIP4
Klasse 3	Rab11-FIP1

Tab. 4 Klassifizierung der Rab11-FIP-Proteine [nach Meyers & Prekeris, 2002].

Die Proteine der Rab11-FIP-Klasse 1 besitzen eine carboxyterminale Domäne aus 65 Aminosäuren, die die RBD-Region überlappt und essentiell für den Vesikeltransport zur Plasmamembran ist [Lindsay *et al.*, 2002]. Eine weitere funktionelle Domäne, die aminoterminal C2-Domäne mit 130 Aminosäuren, ermöglicht die Bildung von Protein-Phospholipid- bzw. Protein-Protein-Bindungen. Damit kann die C2-Domäne als Erkennungsregion für Mikrodomänen der Plasmamembran agieren und das Andocken der Recycling-Endosomen an der Plasmamembran koordinieren [Lindsay & McCaffrey, 2004]. Der hydrophobe Charakter der C2-Domäne ermöglicht außerdem die Assoziation zusätzlicher Effektorproteine wie Myosin Vb.

Myosin Vb ist ein Motorprotein des Aktin-Zytoskeletts, das zwei funktionell relevante Domänen für den Transport von Membranvesikeln besitzt und mit dem Komplex aus Rab11A und Rab11-FIP2-Protein interagiert. Die proximale Motordomäne ermöglicht die Translokation entlang des Aktin-Zytoskeletts, während die Schwanzregion für die direkte Bindung an Rab11A in der aktiven GTP-gebundenen Form erforderlich ist. Durch eine Deletion der Motordomäne von Myosin Vb wurde die Translokation der Recycling-Endosomen zur Plasmamembran entlang des Aktin-Zytoskeletts in polarisierten bzw. nicht-polarisierten Zellen inhibiert [Lapierre *et al.*, 2001; Hales *et al.*, 2002]. Die Dysfunktion von Myosin Vb führte zu einer perizentriolaren Akkumulation von

internalisierten Rezeptoren in Rab11A-enthaltenden Membranvesikeln.

Die Interaktion von Rab11A mit Myosin Vb wird durch Rab11-FIP2 koordiniert. Die Deletion der C2-Domäne von Rab11-FIP2 führte zu einer erheblichen Störung des endosomalen Recycling, da der Verlust der Bindungsregion für Myosin Vb die Translokation zur Plasmamembran entlang des Aktin-Zytoskeletts unterbricht [Prekeris *et al.*, 2000; Lindsay & McCaffrey, 2002]. Die C2-Domäne wurde auch in den Effektorproteinen Phosphatidylinositol-3-Kinase und Rabphilin-3 identifiziert, die ebenfalls an der Regulation des Vesikeltransports beteiligt sind [Cho, 2001].

In vivo - Bindungsuntersuchungen zur funktionellen Analyse von RCP zeigten, dass Rab4 und Rab11A um eine Bindungsstelle konkurrieren, wobei die Affinität von Rab11A wesentlich höher ist im Vergleich zu Rab4 [Peden *et al.*, 2004]. Damit konnte die Primärcharakterisierung von RCP als Kopplungsprotein aus Experimenten mit einem hypersensitiven Hefe-Hybrid-System [Lindsay *et al.*, 2002] nicht bestätigt werden.

Durch die Interaktion von Rab11A und RCP wird außerdem die Proteinsortierung aus degradativen Lysosomen in Recycling-Endosomen reguliert [Peden *et al.*, 2004]. Dieser Befund ist neuartig, da Rab11A bisher als Regulator u.a. innerhalb des Endosomalen Recycling-Kompartiments und des trans-Golgi-Netzwerkes beschrieben wurde und nicht in Lysosomen lokalisiert wurde. Interessanterweise wird auch die zelluläre Aufnahme des Eisentransportproteins Transferrin durch eine Deletion von Rip11 stimuliert, obwohl Rip11 nicht in Transferrinrezeptor-enthaltenden Membranvesikeln nachweisbar ist [Prekeris *et al.*, 2000; Peden *et al.*, 2004]. Da Rab11A gegenüber den Effektorproteinen RCP und Rip11 mengenlimitiert ist, können die durch die Rip11-Deletion nicht-gebundenen Rab11A-Proteine an RCP binden und somit die oben genannte Proteinsortierung stimulieren [Peden *et al.*, 2004].

Das Effektorprotein RCP besitzt zwei weitere funktionelle Domänen: die Prolin (P)-, Glutamat (E)-, Serin (S)- und Threonin (T)-reiche PEST-Region und die carboxyterminale H13-Region. Nach dem Transport der RCP / Rab11A-enthaltenden Membranvesikel aus dem Endosomalen Recycling-Kompartiment zur Plasmamembran dient die PEST-Region als Zielsequenz für die Calpain-vermittelte Proteolyse von RCP [Marie *et al.*, 2005]. Für die H13-Region, die als Bindungsstelle für Rab4 und Rab11A agieren kann, wurde gezeigt, dass die Überexpression dieser Domäne sowohl das endosomale als auch das phagosomale Recycling inhibiert [Damiani *et al.*, 2004].

Ergebnisse aus RNA-Interferenz-Untersuchungen belegen eine spezifische Interaktion von Rab11 und Rip11. Eine gleichzeitige Deletion der beiden Rab11-Isoformen Rab11A und Rab11B führte zu einer Redistribution von Rip11 in das Zytosol, während der Verlust einer Rab11-Isoform durch die Aktivität der anderen wechselseitig kompensiert wurde [Junutula *et al.*, 2004]. Ein interessanter Befund wurde bei Experimenten mit Zellen der humanen Plattenepithelkarzinom-Zelllinie A431 erzielt, die mit dem Epidermalen Wachstumsfaktor stimuliert wurden. Der Hormonstimulus induzierte eine Colokalisation von Rab11-FIP2, RCP und Rip11 mit der Proteinkinase B in Recycling-Endosomen, die zur Plasmamembran transloziert wurden [Lindsay & McCaffrey, 2004].

Rab11-FIP-Proteine der Klasse 2

Die beiden Vertreter der Rab11-FIP-Klasse 2, Rab11-FIP3 und Rab11-FIP4 sind sowohl in Recycling-Endosomen als auch im trans-Golgi-Netzwerk lokalisiert. Rab11-FIP3 und Rab11-FIP4, auch Arfophilin 1 und 2 genannt, können durch die gleichzeitige Bindung von Rab11A und Arf-GTPasen, die ebenfalls zur Superfamilie der Kleinen GTP-bindenden Proteine gehören, einen Schnittpunkt bei der Regulation verschiedener zellulärer Vesikeltransportwege herstellen. Arf-GTPasen koordinieren die Entstehung von sekretorischen Vesikeln im Golgi-Apparat, sodass durch die Interaktion mit Rab11-spezifischen Effektorproteinen endo- und exozytotische Membrantransporte verknüpft werden können [Chavrier & Goud, 1999; Hickson *et al.*, 2003].

Interessanterweise wurde für den Proteinkomplex aus Rab11A und Rab11-FIP3 eine Beteiligung an der Zytokinese, der Separation des Zytoplasmas während der Zellteilung, in Säugerzellen nachgewiesen [Wilson *et al.*, 2005]. Durch die Bindung von Rab11-FIP3 an Rab11A zu Beginn der späten Anaphase translozieren Rab11A-enhaltende Membranvesikel zur Spaltfurche, akkumulieren und sind an Membranfusionen während der Furchenbildung und der nachfolgenden Abschnürung der Tochterzellen beteiligt. Mit dieser dynamischen Umverteilung von Rab11-FIP3 aus Zentrosomen in Rab11A-enhaltende Membranvesikel kann die Regulation von Zellzyklus und Vesikeltransport vernetzt werden [Wilson *et al.*, 2005].

1.8 Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Einflusses von Rab11A auf die Insulin-stimulierte Translokation des Glucosetransporters GLUT4 zur Plasmamembran sowie die subzelluläre Lokalisation von GLUT4-enhaltenden Membranvesikeln in Insulin-sensitiven Muskelzellen. Ausgehend von dem berichteten Primärbefund, dass Rab11A durch eine Insulinstimulation in GLUT4-enhaltende Membranvesikel umverteilt und zur Plasmamembran transloziert wird, sollte die Wirkung der Rab-GTPase auf die Insulin-stimulierte Translokation von GLUT4 zur Plasmamembran und die Rolle der beteiligten Vesikelkompartimente charakterisiert werden. Für die Aufklärung der Funktion von Rab11A wurden zwei verschiedene Zellsysteme, eine Kardiomyoblasten-Zelllinie sowie primäre Skelettmuskelzellen, eingesetzt.

Eine weitere Fragestellung ergab sich nach der Analyse der cDNA-Sequenz von Rab11A aus der verwendeten Kardiomyoblasten-Zelllinie. Die Rab11A-cDNA enthielt eine Mutation, die zu einer Aminosäure-Substitution innerhalb einer hochkonservierten Domäne des katalytischen Zentrums der Rab-GTPase führte. Deshalb wurde der Einfluss dieser Substitution auf die enzymatische Aktivität von Rab11A untersucht.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien

Acridin-Orange	Sigma, Deisenhofen
Agar	Difco, Detroit, MI (USA)
Agarose SeaKem® ME / SeaPlaque®	BioWhittaker, Rockland, ME (USA)
6-Amino-n-hexansäure	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Fluka, Buchs (CH)
Bovines Serumalbumin	Roche Diagnostics, Mannheim
Bovines Serumalbumin (Zellkultur)	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Coomassie R-250	Sigma, Deisenhofen
Cytochalasin B	Sigma, Deisenhofen
2-Desoxy-D-[1- ¹⁴ C]-glucose	Amersham Biosciences, Freiburg
Diethylpyrocarbonat	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid	Sigma, Deisenhofen
Dithiothreitol	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Applichem, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure	Sigma, Deisenhofen
Ethylenglykol-bis-(β-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure	Sigma, Deisenhofen
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
Geneticin® G418	Calbiochem, Bad Soden
L-[1- ¹⁴ C]-Glucose	Amersham Biosciences, Freiburg
Glutathion	Sigma, Deisenhofen
Glycerol	Serva, Heidelberg
Glykogen	Roth, Karlsruhe
Guanosin-5'-triphosphat	Roche Diagnostics, Mannheim
[γ- ³² P]-Guanosin-5'-triphosphat	Amersham Biosciences, Freiburg
Hefeextrakt	Difco, Detroit, MI (USA)
N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)	Sigma, Deisenhofen
Insulin (Schwein)	Fluka, Buchs (CH)
Isopropanol	Sigma, Deisenhofen
Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranosid	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Invitrogen, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt

β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Applichem, Darmstadt
3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure	Serva, Heidelberg
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdesoxycholat	Sigma, Deisenhofen
Natriumdihydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat	Serva, Heidelberg
Natriumfluorid	Sigma, Deisenhofen
<i>di</i> -Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat	Sigma, Deisenhofen
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Petroleum-Benzin	Riedel - de Haën, Seelze
Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma, Deisenhofen
Ponceau S	Sigma, Deisenhofen
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
Tergitol NP-40	Sigma, Deisenhofen
Trichloressigsäure	Roth, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid	Roth, Karlsruhe
Triton® X-100	Roche Diagnostics, Mannheim
Trypton	Difco, Detroit, MI (USA)
Tween 20®	BioRad, München
Xylencyanol	Sigma, Deisenhofen

2.2 Fertigprodukte und Reagenzienkits

α-MEM	Invitrogen, Karlsruhe
AdenoVator™-Kit	QBiogene, Heidelberg
Antibiotika-Antimykotikum-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
AquaSafe 300 plus-Szintillationsflüssigkeit	Zinsser, Frankfurt/M.
BD Adeno-X™ Purification Kit	BD Biosciences, Heidelberg
Complete™ Proteasen-Inhibitoren-Cocktail	Roche Diagnostics, Mannheim
DMEM	Invitrogen, Karlsruhe
DNA Ladder 100 bp / 1 kb	New England Biolabs, Frankfurt/M.
dNTP-Mix	Roche Diagnostics, Mannheim
EndoFree™ Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
ExcelGel™ SDS-Gradienten-Fertiggel (8 - 18 %)	Amersham Biosciences, Freiburg
ExcelGel® SDS-Pufferstreifen	Amersham Biosciences, Freiburg
Fötale Kälberserum	Invitrogen, Karlsruhe
FuGENE 6	Roche Diagnostics, Mannheim
Gesamt-ChemiRNA™ (Rattenherz bzw. -leber)	Chemicon, Temecula, CA (USA)

Gesamt-RNA (Mausherz bzw. -leber)	Stratagene, Heidelberg
Glutathion-Sepharose 4B	Amersham Biosciences, Freiburg
Lambda DNA-Mono Cut Mix	New England Biolabs, Frankfurt/M.
Magermilchpulver	Applichem, Darmstadt
Nichtessentielle Aminosäuren-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
Nutrient Mixture Ham's F-12	Invitrogen, Karlsruhe
Oligonukleotide	MWG Biotech, Ebersberg
OneStep RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung	Roth, Karlsruhe
Phosphat-gepufferte Salzlösung	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
Protein Assay Kit	BioRad, München
Protein-Marker Broad Range	New England Biolabs, Frankfurt/M.
Protein-Marker Prestained Broad Range	New England Biolabs, Frankfurt/M.
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Heidelberg
SOC-Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Skeletal Muscle Cell Growth Medium	PromoCell, Heidelberg
SuperSignal® West Femto Chemiluminescent Kit	Pierce, Rockford, IL (USA)
SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Kit	Pierce, Rockford, IL (USA)
Trypanblau-Lösung	Sigma, Deisenhofen
Trypsin-EDTA-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
Western Blot Recycling Kit	Alpha, San Antonio, TX (USA)

2.3 Enzyme

Alkalische Phosphatase (Shrimp)	Roche Diagnostics, Mannheim
DNase I	Roche Diagnostics, Mannheim
Klenow-Enzym	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>PfuTurbo</i> ®-Polymerase	Stratagene, Heidelberg
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Frankfurt/M.
	QBiogene, Heidelberg
	Roche Diagnostics, Mannheim
Ribonuklease-Inhibitor RNaseOut™	Invitrogen, Karlsruhe
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt/M.

2.4 Vektoren

Name	Verwendung	Herkunft
pAdenoVator-CMV5-IRES-GFP	Herstellung von adenoviralen Infektionspartikeln	QBiogene, Heidelberg
pCMV	Transfektion von Ratten-Kardiomyoblasten (H9c2-E2)	Invitrogen, Karlsruhe
pGEX-5X-3	Herstellung von GST-Rab11A-Fusionsproteinen	Amersham Biosciences, Freiburg

Tab. 5 Übersicht der verwendeten Amplifikations- und Expressionsvektoren.

2.5 Bakterienstämme

Name	Genotyp	Herkunft
BJ5183	<i>F⁻ endA sbcBC recBC galK met thi-1 bioT hsdR (Str^r)</i>	QBiogene, Heidelberg
BL21-CodonPlus [®] -RP	<i>F⁻ endA ompT hsdS (r_B⁻, m_B⁻) dcm⁺ Tet^r gal Hte [argU proL Cam^r]</i>	Stratagene, Heidelberg
DH5α	<i>F⁻ endA1 deoR recA1 hsdR17(rk⁻,mk⁺) supE44 λ⁻ thi-1 gyrA96 relA1</i>	QBiogene, Heidelberg
One Shot [®] TOP10	<i>F⁻ endA1 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80 lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) nupG</i>	Invitrogen, Karlsruhe
XL1-Blue	<i>F⁻ endA1 recA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [proAB lac^fΔM15 Tn10 (Tet^r)^c</i>	Stratagene, Heidelberg

Tab. 6 Übersicht der verwendeten kompetenten *E. coli*-Zellen.

2.6 Primärzellen und Zelllinien

Name	Beschreibung	Herkunft
H9c2	Ratten-Kardiomyoblasten-Zelllinie (ATCC CRL-1446)	American Type Culture Collection, Manassas, VA (USA)
HEK-293	Humane embryonale Nieren-Zelllinie (ATCC CRL-1573)	QBiogene, Heidelberg
HeLa	Humane Zervix-Karzinom-Zelllinie (ATCC CCL-2)	Deutsches Diabetes-Zentrum, Düsseldorf
	Humane proliferierende Myoblasten	PromoCell, Heidelberg

Tab. 7 Übersicht der verwendeten Primärzellen und Zelllinien.

2.7 Antikörper

2.7.1 Primärantikörper

anti-Akt (Cell Signaling, Beverly, MA, USA), VD 1:1000

Polyklonales Antiserum aus Kaninchen, gerichtet gegen ein synthetisches, KLH-gekoppeltes Peptid der Akt (AS 466 - 479) aus *M. musculus*.

anti-phospho-Akt (Cell Signaling, Beverly, MA, USA), VD 1:1000

Polyklonales Antiserum aus Kaninchen, gerichtet gegen ein synthetisches, KLH-gekoppeltes phosphoryliertes Ser473-Peptid der Akt aus *M. musculus*.

anti-EEA1 (BD Biosciences, Heidelberg), VD 1:2500

Monoklonaler IgG-Antikörper aus Maus, gerichtet gegen die Aminosäuren 3 - 281 des humanen *Early Endosome Antigene* (EEA) 1.

anti-GM130 (BD Biosciences, Heidelberg), VD 1:250

Monoklonaler IgG-Antikörper aus Maus, gerichtet gegen die Aminosäuren 869 - 982 des Golgi-Matrix (GM)-Proteins mit 130 kDa aus *R. norvegicus*.

anti-GLUT4 C20 (Santa Cruz, Heidelberg), VD 1:2000

Polyklonaler IgG-Antikörper aus Ziege, gerichtet gegen die carboxyterminale Region des Glucosetransporters GLUT4 aus *R. norvegicus*.

anti-GST (Amersham Biosciences, Freiburg), VD 1:1000

Polyklonaler-IgG-Antikörper aus Ziege, gerichtet gegen Regionen der Glutathion-S-transferase aus *Sch. japonicum*.

anti-Insulin-Rezeptor Ab4 (Oncogene, San Diego, CA, USA), VD 1:2500

Monoklonaler IgG-Antikörper aus Maus, gerichtet gegen die carboxyterminale Region der β -Untereinheit des humanen Insulinrezeptors.

anti-Myc 9E10 (Upstate, Lake Placid, NY, USA), VD 1:2000

Monoklonaler IgG-Antikörper aus Maus, gerichtet gegen die Aminosäuren 408 - 437 der Leucin-Zipper-Region des humanen Myc-Proteins.

anti-Rab11 (BD Biosciences, Heidelberg), VD 1:2000

Monoklonaler IgG-Antikörper aus Maus, gerichtet gegen die Aminosäuren 86 - 207 des humanen Rab11.

anti-TGN38 (BD Biosciences, Heidelberg), VD 1:250

Monoklonaler IgG-Antikörper aus Maus, gerichtet gegen die Aminosäuren 31 - 244 des trans-Golgi-Netzwerk (TGN)-Proteins mit 38 kDa aus *R. norvegicus*.

anti-Transferrinrezeptor (Zymed, San Francisco, CA, USA), VD 1:2000

Monoklonaler IgG-Antikörper aus Maus, gerichtet gegen die Aminosäuren 3 - 28 des humanen Transferrinrezeptors.

2.7.2 Sekundärantikörper

anti-Kaninchen-IgG, H+L (Promega, Mannheim), VD 1:2000

Meerrettich-Peroxidase gekoppelt.

anti-Maus-IgG, H+L (Promega, Mannheim), VD 1:2000

Meerrettich-Peroxidase gekoppelt.

anti-Ziege-IgG, H+L (Santa Cruz, Heidelberg), VD 1:2000

Meerrettich-Peroxidase gekoppelt.

¹²⁵Iod-markierter anti-Maus-IgG (Amersham Biosciences, Freiburg)

Spezifische Aktivität: ≥ 750 Ci / mmol.

2.8 Puffer und Lösungen

Anodenpuffer I	Tris / HCl	300 mM
	Methanol	20 % (v/v)
Anodenpuffer II	Tris / HCl	25 mM
	Methanol	20 % (v/v)
Blockierlösung I	PBS-T + Magermilchpulver (5 % [m/v])	

Blockierlösung II	TBS-T + Bovines Serumalbumin (3 % [m/v])	
Bromphenolblau-Lösung (10x)	Bromphenolblau	0,25 % (m/v)
	EDTA	1,0 mM
	Glycerol	20 % (v/v)
	Natriumdodecylsulfat	1 % (m/v)
Coomassie Blue-Lösung	Coomassie R-250	0,2 % (m/v)
	Essigsäure (konz.)	10 % (v/v)
	Methanol	45 % (v/v)
Entfärbelösung	Essigsäure (konz.)	10 % (v/v)
	Methanol	45 % (v/v)
GST-Elutionspuffer	Tris / HCl	50 mM
	Glutathion	10 mM
GTPase-Bindungspuffer	HEPES	20 mM
	Dithiothreitol	1,0 mM
	EDTA	2,0 mM
GTPase-Waschpuffer	Tris / HCl	50 mM
	Dithiothreitol	1,0 mM
	EDTA	1,0 mM
	Magnesiumchlorid	10 mM
	Bovines Serumalbumin	0,025 % (m/v)
GTS-Puffer	Tris / HCl	20 mM
	Glycerol	2,5 % (m/v)
	Natriumchlorid	25 mM
HA-Puffer, pH 7,4	Tris / HCl	10 mM
	Dithiothreitol	2,6 mM
	Phenylmethylsulfonylfluorid	0,1 mM
IA-Puffer, pH 7,4	Tris / HCl	10 mM
	Dithiothreitol	2,6 mM
	Phenylmethylsulfonylfluorid	0,1 mM
	Saccharose	180 mM
Kathodenpuffer	6-Amino-n-hexansäure	40 mM
	Natriumdodecylsulfat	0,01 % (m/v)
	Methanol	20 % (v/v)

Laemmli-Probenpuffer (6x)	Tris / HCl	375 mM
	Bromphenolblau	0,3 % (m/v)
	Glycerol	45 % (v/v)
	β-Mercaptoethanol	15 % (v/v)
	Natriumdodecylsulfat	12 % (m/v)
LB-Agar-Platten	Agar	1,5 % (m/v)
	LB-Medium	1x
LB-Medium	Hefeextrakt	0,5 % (m/v)
	Natriumchlorid	1 % (m/v)
	Trypton	1 % (m/v)
MOPS-Puffer (10x)	MOPS	200 mM
	EDTA	50 mM
	Natriumacetat	50 mM
PBS, pH 7,4	Kaliumchlorid	3,0 mM
	Kaliumdihydrogenphosphat	1,5 mM
	Natriumchlorid	140 mM
	<i>di</i> -Natriumhydrogenphosphat	8,0 mM
PBS-T	PBS + Tween 20® (0,25 % [v/v])	
Ponceau S-Lösung	Ponceau S	0,1 % (m/v)
	Trichloressigsäure	3 % (v/v)
RIPA-Puffer, pH 7,4	Tris / HCl	50 mM
	EDTA	1,0 mM
	Natriumchlorid	150 mM
	Natriumdesoxycholat	0,25 % (v/v)
	Natriumfluorid	1,0 mM
	Natriumorthovanadat	1,0 mM
	NP-40	1 % (v/v)
	Complete™ Proteasen-Inhibitoren-Cocktail	
RNA-Probenlösung	Acridin-Orange	5 % (m/v)
	Ethidiumbromid	0,1 % (m/v)
	Glycerol	5 % (v/v)
	Formaldehyd	1 % (m/v)
	Formamid	45 % (v/v)
	MOPS-Puffer	10x

TAE-Puffer	Tris / HCl	40 mM
	EDTA	1,0 mM
	Essigsäure (konz.)	0,1 % (v/v)
TBS, pH 7,4	Tris / HCl	10 mM
	Natriumchlorid	100 mM
TBS-T	TBS + Tween 20® (0,1 % [v/v])	
Transportpuffer, pH 7,4	HEPES	20 mM
	Calciumchlorid	1,8 mM
	Kaliumchlorid	5,4 mM
	Magnesiumsulfat	0,8 mM
	Natriumchlorid	140 mM
	Bovines Serumalbumin	0,2 % (m/v)
Viruslysis-Puffer	Tris / HCl	10 mM
	EDTA	1,0 mM
	Natriumdodecylsulfat	10 % (m/v)
Xylencyanol-Lösung (6x)	Glycerol	20 % (v/v)
	Xylencyanol	0,4 % (m/v)
YTA-Medium (2x)	Hefeextrakt	1 % (m/v)
	Natriumchlorid	0,5 % (m/v)
	Trypton	1,6 % (m/v)

2.9 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Blotting-Apparatur LKB-Novablot	Amersham Biosciences, Freiburg
Brutschrank 6000	Heraeus, Hanau
Einmalskalpell	Swann Morton, Sheffield (UK)
Elektroporationsgerät ECM 399 / PEP	BTX, San Diego, CA (USA)
Faltenfilter 597½	Schleicher & Schuell, Dassel
Filmremover LKB	Amersham Biosciences, Freiburg
Flüssigstickstoff-Tank GT140	Air Liquide, Bussy St. Georges (F)
Flüssigszintillationsmessgerät Coulter LS 6000LL	Beckman Coulter, Krefeld
Geldokumentationssystem	LTF, Wasserburg
Homogenisator Potter-Elvehjem	Braun, Melsungen
Horizontal-Elektrophoresekammer Agagel Midi	Biometra, Göttingen
Horizontal-Elektrophoresekammer Multiphor II	Amersham Biosciences, Freiburg
Inverses Lichtmikroskop (Objektiv F10 - 0,25)	Carl Zeiss, Oberkochen
Kippschüttler Duomax 1000	Heidolph, Schwabach

Kryoröhrchen	BD Biosciences, Heidelberg
Lumi-Imager™	Roche Diagnostics, Mannheim
Mini-Gelkammer	BioRad, München
Mini-Gradientenmischer	Sartorius, Göttingen
3MM-CHR Whatman®	Whatman, Kent (UK)
Munktell® 1F-Filterpapier	Amersham Biosciences, Freiburg
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim
PCR-System Trio-Thermoblock™	Biometra, Göttingen
Peristaltikpumpe Minipuls 2	Gilson, Villiers le Bel (F)
Plastehomogenisator	Eppendorf, Hamburg
Poly-Prep-Chromatographie-Säule	BioRad, München
PVDF-Immobilon-P-Membran (0,45 µm)	Millipore, Eschborn
Reaktionsgefäße (200 µl / 1,5 ml / 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Refraktometer	Carl Zeiss, Oberkochen
Rollenmischer RM5	Hecht, Sondheim
Rundbodenröhrchen (Typ 55463)	Sarstedt, Nümbrecht
Schüttelinkubator KS-15	Bühler, Tübingen
Spektrophotometer DU® 650 / DU® 7400	Beckman, München
Sterilfilter Sterivex GV (0,22 µm)	Millipore, Eschborn
Szintillationsröhrchen Poly-Q™	Beckman Coulter, Krefeld
Überkopfschüttler Reax 2	Heidolph, Schwabach
Ultraschallgerät Labsonic U	Braun, Melsungen
Ultrazentrifuge Optima L70 (Rotor: Ti50 / SW60)	Beckman, München
Universal-Gamma-Zähler 1282 Compugamma CS	LKB Wallac, Turku (FIN)
Wärmeschrank	Heraeus, Hanau
Zellkulturgefäße	BD Biosciences, Heidelberg
Zellschaber	BD Biosciences, Heidelberg
Zentrifuge RC 5Bplus (Rotor: GSA / SS34)	DuPont, Bad Homburg v.d.H.
Zentrifuge RotantaR (Rotor: 5094)	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Universal 30 RF (Rotor: 1412)	Hettich, Tuttlingen
Zentrifugenröhrchen 15 ml / 50 ml (steril)	BD Biosciences, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen Ultra clear™ (Typ 344062)	Beckman, München

2.10 Zellkultur

Für die Untersuchungen zum Einfluss von Rab11A auf die Insulin-stimulierte Translokation des Glucosetransporters GLUT4 in Insulin-sensitiven peripheren Geweben wurden sowohl Primärzellen als auch Zelllinien verwendet, deren Kultivierung in den nachfolgenden Kapiteln beschrieben ist.

2.10.1 Primärzellen und Zelllinien

2.10.1.1 Humane Skelettmuskelzellen

Humane proliferierende Myoblasten wurden aus isolierten Satellitenzellen des *Musculus rectus abdominis* durch Trypsinverdau des Muskelgewebes mit einer nachfolgenden Eliminierung kontaminierender Fibroblasten gewonnen und von der Fa. PromoCell (Heidelberg) bezogen. Aus den Myoblasten der gesunden kaukasischen Spender M9 (männlich, 9 Jahre), W10 (weiblich, 10 Jahre), W48 (weiblich, 48 Jahre) entstanden nach der Wachstums- und Differenzierungsphase Skelettmuskelzellen, die als Primärzellen verwendet wurden. In Kap. 2.10.2.1 (S. 60) sind die Bedingungen für die Kultivierung dieser Zellen dargestellt.

2.10.1.2 Ratten-Kardiomyoblasten-Zelllinie H9c2-E2

Zellen der Ratten-Kardiomyoblasten-Zelllinie H9c2 (ATCC CRL-1446) wurden als geeignetes Zellmodell für die Charakterisierung von Herzmuskelzellen ausgewählt und zusätzlich mit der humanen Insulinrezeptor-cDNA stabil transfiziert, die von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. A. Maassen (Universität Leiden, NL) freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde. Die Zellkultivierung der H9c2- und H9c2-E2-Zellen ist in Kap. 2.10.2.2 (S. 61) beschrieben.

2.10.1.3 HEK-293- und HeLa-Zellen

Für die Herstellung von rekombinanten adenoviralen Infektionspartikeln wurden replikationskompetente Zellen der humanen embryonalen Nieren-Zelllinie HEK-293 eingesetzt, die Bestandteil des verwendeten AdenoVator™-Kit waren. Zur Prüfung der potentiellen Replikationsfähigkeit der rekombinanten adenoviralen Infektionspartikel wurden Zellen der humanen Zervix-Karzinom-Zelllinie HeLa verwendet, die von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. P. Rösen (DDZ, Düsseldorf) freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden. In Kap. 2.10.2.2 (S. 61) ist die Kultivierung von HEK-293- und HeLa-Zellen dargestellt.

2.10.2 Zellkultivierung

Alle Primärzellen und Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und einer CO₂-Konzentration von 5 % adhärent kultiviert. Als Zellkulturgefäße dienten sterile 6-Kavitäten-Platten mit einer Fläche von 9,6 cm² je Kavität, 10-cm-Petri-Schalen mit einer Fläche von 78,5 cm² oder 175-cm²-Zellkulturflaschen. Die Zellbeobachtung bzw. -zählung erfolgte mit Hilfe eines inversen Lichtmikroskops (IM / Objektiv F10 - 0,25).

2.10.2.1 Kultivierung von humanen Skelettmuskelzellen

Proliferierende Myoblasten von gesunden kaukasischen Spendern wurden in 6-Kavitäten-Platten (10^5 Zellen je Kavität) mit 3 ml Wachstumsmedium oder in 10-cm-Petri-Schalen (10^6 Zellen) mit 10 ml Wachstumsmedium ausgesät. Die Wachstumsphase dauerte 96 h, bis eine Konfluenz der Zellmonolayer-Schicht von ca. 80 % erreicht wurde. Danach wurden die Zellen mit dem Differenzierungsmedium kultiviert, sodass sie fusionierten und zu Skelettmuskelzellen differenzierten.

Wachstumsmedium

Für die Herstellung des Wachstumsmediums für proliferierende Myoblasten wurde der Inhalt je eines Päckchen α -MEM und Nutrient Mixture Ham's F-12 sowie 3,3 g Natriumhydrogencarbonat in 500 ml Aqua bidest. (steril) gelöst. Nach der Einstellung des pH-Wertes 7,4 wurde das Kulturmedium mit Hilfe eines Sterivex-Filters (GV 0,22 μ m) steril filtriert und bei 4°C gelagert. Unmittelbar vor Verwendung des Wachstumsmediums wurden die Einzelkomponenten des Supplement Pack / Skeletal Muscle Cell Growth Medium Kit zu dem α -MEM / Ham's F-12 - Medium hinzugegeben (siehe Tab. 8).

Wachstumsmedium (α -MEM / Ham's F-12)	Differenzierungsmedium (α -MEM)
Amphotericin B (50 ng/ml)	Amphotericin B (50 ng/ml)
Dexamethason (400 ng/ml)	Fötale Kälberserum (5 % [v/v])
Epidermaler Wachstumsfaktor, human (10 ng/ml)	Penicillin (20 U/ml)
Fetuin, Rind (50 g/ml)	Streptomycin (20 μ g/ml)
Fibroblasten-Wachstumsfaktor, human (1 ng/ml)	
Fötale Kälberserum (5 % [v/v])	
Gentamicin (50 μ g/ml)	
Insulin, Rind (10 μ g/ml)	

Tab. 8 Zusammensetzung der Kulturmedien für humane Skelettmuskelzellen.

Differenzierungsmedium

Bei der Herstellung des Differenzierungsmediums für proliferierende Myoblasten wurden der Inhalt von zwei Päckchen α -MEM und 4,4 g Natriumhydrogencarbonat in 500 ml Aqua bidest. (steril) gelöst und der pH-Wert 7,4 eingestellt. Danach wurde das Kulturmedium mit Hilfe eines Sterivex-Filters (GV 0,22 μ m) steril filtriert, bei 4°C gelagert und unmittelbar vor Gebrauch mit einer Antibiotika-Antimykotikum-Lösung versetzt (siehe Tab. 8, S. 60).

Drei Tage nach Zugabe des Differenzierungsmediums wurden die Skelettmuskelzellen adenoviral infiziert, weitere 48 h mit Differenzierungsmedium kultiviert und vor Beginn der nachfolgenden Experimente mit Differenzierungsmedium ohne Zusatz von fötalem Kälberserum (FKS) für die Dauer von 2 h im Brutschrank inkubiert (siehe Kap. 2.14.2, S. 88).

2.10.2.2 Kultivierung von Zelllinien

Als Kulturmedium für die Zellen der im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Zelllinien H9c2, H9c2-E2, HEK-293 und HeLa wurde Dulbecco’s modifiziertes Eagle-Medium (DMEM) eingesetzt, das durch die Zugabe von hitzeinaktiviertem FKS sowie nichtessentiellen Aminosäuren und Antibiotika komplettiert wurde (siehe Tab. 9). Für die Kultivierung von H9c2-E2-Zellen wurde zusätzlich Geneticin® G418 als Selektionsmarker hinzugegeben.

DMEM-Komplettmedium*
Fötales Kälberserum (10 % [v/v])
Nichtessentielle Aminosäuren-Lösung (1 % [v/v])
Penicillin G (100 U/ml)
Streptomycin (100 mg/ml)

Tab. 9 Zusammensetzung des DMEM-Komplettmediums.

* Das DMEM-Komplettmedium für H9c2-E2-Zellen enthält zusätzlich Geneticin® G418 (600 μ g/ml).

Bei Erreichen von ca. 90 % Konfluenz der Zellmonolayer-Schicht erfolgte die Passagierung der Zellen, die in 10-cm-Petri-Schalen kultiviert wurden. Nach dem Waschen mit 10 ml PBS wurden die Zellen mit 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung für die Dauer von 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Trypsinierung, die zu einem Abrunden der Zellen und Ablösen vom Schalenboden führt, wurde durch die Zugabe von 5 ml eines entsprechenden DMEM-Komplettmediums gestoppt. Die Zellsuspensionen wurden in sterile 15-ml- oder 50-ml-Zentrifugenröhrchen transferiert und mit Hilfe einer Zentrifuge (RotantaR / Rotor: 5094) bei 200 x g und Raumtemperatur für die Dauer von 10 min zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde verworfen und das Pellet in 5 - 20 ml des entsprechenden DMEM-Komplettmediums resuspendiert.

Nach der Zellzählung wurden die Zellen in neue Zellkulturplatten bzw. -schalen verteilt. Bei der Aussaat in 6-Kavitäten-Platten wurden die passagierten Zellen mit 3 ml des entsprechenden DMEM-Komplettmediums je Kavität inkubiert, bei 10-cm-Petri-Schalen wurden 10 ml des jeweiligen DMEM-Komplettmediums eingesetzt. Das Kulturmedium wurde zweimal wöchentlich gewechselt und der Zustand der Zellen lichtmikroskopisch kontrolliert. Eine erneute Passagierung der Zellen erfolgte nach einer Woche. H9c2-E2-Zellen wurden nach 10 aufeinanderfolgenden Passagierungen verworfen und durch kryokonservierte neue Zellen mit niedriger Passagenanzahl ersetzt.

Zellzählung

Die Zellzählung wurde bei der Passagierung vor der Aussaat bzw. vor der Kryokonservierung von H9c2-, H9c2-E2-, HEK-293- oder HeLa-Zellen durchgeführt. Aus den nach der Zentrifugation resuspendierten Zelllösungen wurden jeweils 20 µl entnommen und mit 20 µl Trypanblau-Lösung, die abgestorbene Zellen anfärbt, gemischt. Nach einer Inkubation bei Raumtemperatur für die Dauer von 5 min wurden 15 µl der Zell-Farbstoff-Suspension auf eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und die Anzahl der nicht-gefärbten, lebenden Zellen in vier Großquadraten lichtmikroskopisch ermittelt. Diese Zahl wurde mit dem Faktor 5000 multipliziert, das Resultat war die Anzahl lebender Zellen pro Milliliter Zellsuspension.

Kryokonservierung von Zellen

Die Zellen der H9c2-, H9c2-E2-, HEK-293- bzw. HeLa-Zelllinie wurden in einem Flüssigstickstoff-Tank bei -198°C kryokonserviert, um sie mit geringer Passagenanzahl bis

zu einer späteren Verwendung aufbewahren zu können. Dazu wurden die Zellen - wie oben beschreiben - kultiviert und geerntet. Die Resuspension der Zellpellets erfolgte mit 1 ml des entsprechenden DMEM-Komplettmediums pro 10^6 Zellen, das 10 % (v/v) Dimethylsulfoxid enthält. Die Zellsuspensionen wurden in Kryoröhrchen á 1 ml portioniert, über Nacht bei -80°C aufbewahrt und anschließend im Flüssigstickstoff-Tank gelagert.

Bei der Aussaat wurden die kryokonservierten Zellen in einer 10-cm-Petri-Schale mit 10 ml des entsprechenden DMEM-Komplettmediums inkubiert, das nach 24 h gewechselt wurde.

2.11 Molekularbiologische Methoden

2.11.1 RNA-Techniken

2.11.1.1 Isolation von Gesamt-RNA aus Primärzellen und Zelllinien

Die Gesamt-RNA aus H9c2- bzw. H9c2-E2-Zellen sowie aus Ratten-Herzmuskelzellen wurde mit einem modifizierten Protokoll der Methode von Chomczynski & Sacchi (1987) isoliert. Dazu wurden je 10^6 H9c2- bzw. H9c2-E2-Zellen geerntet, deren Kultivierung in 10-cm-Petri-Schalen erfolgte (siehe Kap. 2.10.2.2, S. 61). Die Zellsuspension wurde mit Hilfe einer Zentrifuge (Universal 30 RF / Rotor: 1412) bei $500 \times g$ und Raumtemperatur für die Dauer von 5 min pelletiert. Frisch isolierte Herzmuskelzellen (10^6 Zellen) von männlichen Wistar-Ratten wurden nach einer einstündigen Suspensionsphase unter identischen Zentrifugationsbedingungen pelletiert.

Die Zelllysis erfolgte durch Zugabe von 1 ml TRIzol[®]-Lösung je Pellet. Nach starkem Mischen wurden die Zelllysate in 2-ml-Reaktionsgefäße überführt, für die Dauer von 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und nach der Zugabe von 200 μl Chloroform mit Hilfe der Universal-Zentrifuge bei $12000 \times g$ und 4°C für die Dauer von 15 min zentrifugiert. Anschließend wurde die obere, wässrige Phase abgenommen, in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß transferiert, mit 500 μl Isopropanol gemischt und für die Dauer von 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die nachfolgende Zentrifugation mit Hilfe der Universal-Zentrifuge erfolgte bei $12000 \times g$ und 4°C für die Dauer von 15 min. Der Überstand wurde verworfen, das erhaltene Pellet (RNA-Präzipitat) mit 1 ml Ethanol (70 % [v/v] in DEPC-Lösung) gewaschen und mit Hilfe der Universal-Zentrifuge bei $7500 \times g$ und 4°C für die Dauer von 5 min zentrifugiert. Anschließend erfolgte die quantitative Entfernung des Überstandes und die Resuspension des erhaltenen Pellets in 20 μl autoklavierter DEPC-Lösung (1 % [m/v] in Aqua bidest.) bei 60°C für die Dauer von 10 min. Danach wurden die Konzentration und Reinheit sowie die Integrität der isolierten Gesamt-RNA bestimmt.

2.11.1.2 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Gesamt-RNA

Die Bestimmung von Konzentration und Reinheit der isolierten Gesamt-RNA erfolgte durch die Messung der Absorption bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm mit Hilfe eines Spektrophotometers (DU[®] 7400). Eine gereinigte Probe von Gesamt-RNA lag vor, wenn das Verhältnis beider Absorptionen (A) $A_{260\text{ nm}} / A_{280\text{ nm}}$ einen Wert von $1,7 \pm 0,1$ besaß. Die Konzentration der RNA ergab sich aus der Absorption bei 260 nm, wobei 1 OD einer Konzentration von 40 µg / ml einzelsträngiger RNA entspricht.

2.11.1.3 Analyse der Integrität von Gesamt-RNA

Die Integrität der isolierten Gesamt-RNA wurde mittels denaturierender Agarose-Gelelektrophorese überprüft [Sambrook *et al.*, 1989]. Für die Gelherstellung wurde 1 % (m/v) SeaKem[®] ME-Agarose als Gelmatrix mit Aqua bidest. aufgekocht und nach Abkühlung mit 10x MOPS-Puffer und 37 % (m/v) Formaldehyd versetzt. Die Proben der isolierten Gesamt-RNA wurden vor dem Auftragen mit 20 µl RNA-Probenlösung inkubiert, für die Dauer von 10 min bei 65°C denaturiert und unmittelbar danach auf Eis gestellt. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte in einer Mini-Gelkammer bei einer elektrischen Feldstärke von 10 V / cm für die Dauer von 1 h. Als Laufpuffer wurde 1x MOPS-Puffer verwendet. Die Visualisierung der RNA durch UV-Licht und die Gelauswertung erfolgten mit Hilfe eines LTF-Geldokumentationssystems oder eines Lumi-Imager[™].

2.11.1.4 Reverse Transkription - Polymerase-Kettenreaktion

Durch die Reverse Transkription - Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) wurde die Rab11A-spezifische mRNA-Sequenz aus isolierten Gesamt-RNA-Proben transkribiert und amplifiziert. Außerdem wurde Gesamt-RNA aus Mausherz bzw. -leber sowie ChemiRNA[™]-Gesamt-RNA aus Rattenherz bzw. -leber in der RT-PCR eingesetzt. Dabei erfolgte die Reverse Transkription der mRNA (Synthese der cDNA) und die Amplifikation des mRNA-cDNA-Hybrid-Doppelstranges mittels PCR in einem Ansatz (Einschritt-RT-PCR) unter Verwendung des OneStep RT-PCR Kit. Es wurden jeweils 1,5 µg Gesamt-RNA, Rab11A-spezifische Primer (je 20 pmol), die zusätzlich an ihrem 5'-Ende eine Schnittstelle für eine ausgewählte Restriktionsendonuklease enthielten (siehe Tab. 10, S. 65), und der Ribonuklease-Inhibitor RNaseOut[™] (20 U) mit den Kit-Komponenten nach Angaben des Herstellers in ein 200-µl-PCR-Reaktionsgefäß pipettiert.

Bezeichnung	Sequenz
PCRPri Rab11A Bgl II for	5'- AA <u>AGATCT</u> ATGGGCACCCGCGACGAC - 3'
PCRPri Rab11A Bgl II rev	5'- AA <u>AGATCT</u> TTAGATGTTCTGACAGCAC - 3'
PCRPri Rab11A Not I for	5'- AAGCGGCCG <u>C</u> ATGGGCACCCGCGACGAC - 3'
PCRPri Rab11A Not I rev	5'- AAGCGGCCG <u>C</u> TTAGATGTTCTGACAGCAC - 3'

Tab. 10 Sequenz der Rab11A-spezifischen RT-PCR-Primer.

Die Sequenzen der *Bgl* II- bzw. *Not* I-Restriktionsstelle sind unterstrichen dargestellt.

Nach der Reversen Transkription bei 50°C für die Dauer von 30 min erfolgte die Amplifikation der Rab11A-cDNA mittels PCR, deren Reaktionsschema in Tab. 11 dargestellt ist. Beide Reaktionen wurden in einem Trio-Thermoblock™ durchgeführt.

	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3
Denaturierung	95°C / 15 min	95°C / 1 min	-
Annealing	-	52°C / 1 min	-
Elongation	-	72°C / 1 min	72°C / 5 min
Zyklenanzahl	1	35	1

Tab. 11 Reaktionsschema für die PCR-Amplifikation der Rab11A-cDNA.

Die erhaltenen RT-PCR-Produkte wurden mittels nativer Agarose-Gelelektrophorese und nachfolgender Visualisierung analysiert (siehe Kap. 2.11.2.3, S. 68) und in Ligationsexperimenten eingesetzt (siehe Kap. 2.11.2.7, S. 70).

2.11.2 DNA-Techniken

2.11.2.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine selektive enzymatische *in vitro* - Amplifikation einer DNA-Region, bei der innerhalb eines Reaktionszyklus nach der Denaturierung der doppelsträngigen DNA die Primer an den vorliegenden Einzelsträngen hybridisieren und

durch die nachfolgende Elongation neue komplementäre DNA-Stränge entstehen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die PCR zur Vorbereitung von Vektor-kompatiblen Doppelstrang-Enden der GLUT4myc-cDNA für die Ligation in den linearisierten adenoviralen Donorvektor pAV-CIG / Bgl II eingesetzt (siehe Kap. 2.14.1.1, S. 79). Die PCR wurde mit Hilfe der *PfuTurbo*[®]-Polymerase (2 U), GLUT4myc-spezifischen Primern (je 20 pmol), die zusätzlich an ihrem 5'-Ende eine Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease *Bgl* II enthielten (siehe Tab. 12), dNTP's (je 10 mM) sowie des Reaktionspuffers in einem Trio-Thermoblock[™] durchgeführt. Als DNA wurde das Plasmid pCXN2-GLUT4myc (1 ng) eingesetzt, das von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. A. Klip (The Hospital for Sick Children, Toronto, CAN) freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde.

Bezeichnung	Sequenz
PCRpri GLUT4myc Bgl II for	5'- AA <u>AGATCT</u> GATGCCGTCGGGTTTCCA - 3'
PCRpri GLUT4myc Bgl II rev	5'- AA <u>AGATCT</u> GGGTGGCTCTCCCACCA - 3'

Tab. 12 Sequenz der GLUT4myc-spezifischen PCR-Primer.

Die Sequenz der *Bgl* II-Restriktionsstelle ist unterstrichen dargestellt.

Das Reaktionsschema der PCR für die Vorbereitung von Vektor-kompatiblen Doppelstrang-Enden der GLUT4myc-cDNA ist in Tab. 13 dargestellt.

	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3
Denaturierung	95°C / 5 min	95°C / 1 min	-
Annealing	-	56°C / 1 min	-
Elongation	-	72°C / 2 min	72°C / 5 min
Zyklenanzahl	1	35	1

Tab. 13 Reaktionsschema für die PCR-Amplifikation der GLUT4myc-cDNA.

Das erhaltene PCR-Produkt wurde gereinigt und mittels nativer Agarose-Gelelektrophorese und nachfolgender Visualisierung analysiert (siehe Kap. 2.11.2.3, S. 68) und in Ligations-experimenten eingesetzt (siehe Kap. 2.11.2.7, S. 70).

2.11.2.2 Mutagenese-Polymerase-Kettenreaktion

Für den spezifischen Einbau von Punktmutationen in eine Plasmid-DNA wurde die ortsgerechte Mutagenese-Polymerase-Kettenreaktion (Mutagenese-PCR) durchgeführt. Durch den Einsatz von komplementären Primerpaaren, bei denen eine DNA-Base an identischer Sequenzposition spezifisch mutiert ist, kann eine gezielte Punktmutation generiert werden. Die Mutagenese-PCR erfolgte mit Hilfe des QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit und wurde für die Herstellung von Punktmutationen in der klonierten Rab11A- bzw. GLUT4myc-cDNA angewendet. Das Design der Mutagenese-PCR-Primer, deren Sequenzen in Tab. 14 dargestellt sind, wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

Bezeichnung	Sequenz
MutaPri Rab11A R70L for	5'- GGGACACAGCAGGGC <u>I</u> GGAGCGGTACAGGGCTATAACG - 3'
MutaPri Rab11A R70L rev	5'- CGTTATAGCCCTGTACCGCTCC <u>A</u> GCCCTGCTGTGTCCC - 3'
MutaPri Rab11A R70Q for	5'- GGGACACAGCAGGGC <u>A</u> GGAGCGGTACAGGGCTATAACG - 3'
MutaPri Rab11A R70Q rev	5'- CGTTATAGCCCTGTACCGCTCC <u>I</u> GCCCTGCTGTGTCCC - 3'
MutaPri Rab11A N124I for	5'- GTTATCATGCTTGTGGGCA <u>I</u> TAAAAGTGATTTACGTCATCTC - 3'
MutaPri Rab11A N124I rev	5'- GAGATGACGTAAATCACTTTTA <u>A</u> TGCCCACAAGCATGATAC - 3'
MutaPri GLUT4myc SB for	5'- AGAGGCCGGACATTTGACCA <u>A</u> ATCTCGGCCACCTTCCGA - 3'
MutaPri GLUT4myc SB rev	5'- TCGGAAGGTGGCCGAGAT <u>I</u> TGGTCAAATGTCCGGCCTCT - 3'

Tab. 14 Sequenz der Rab11A- und GLUT4myc-spezifischen Mutagenese-PCR-Primer.
Die DNA-Basen für die Einführung der Punktmutationen sind unterstrichen dargestellt.

Bei der Durchführung der Mutagenese-PCR wurden 20 ng einer Plasmid-DNA mit zwei komplementären Primern (je 125 ng) und den Kit-Komponenten in ein 200-µl-PCR-

Reaktionsgefäß pipettiert und in einem Trio-Thermoblock™ unter Reaktionsbedingungen amplifiziert, die vom Kit-Hersteller empfohlen werden (siehe Tab. 15).

	Schritt 1	Schritt 2
Denaturierung	95°C / 1 min	95°C / 1 min
Annealing	-	55°C / 1 min
Elongation	-	68°C / 2 min (pro kb)*
Zyklusanzahl	1	12

Tab. 15 Allgemeines Reaktionsschema der Mutagenese-PCR.

* Die Elongationszeit wurde in Abhängigkeit von der Plasmid-DNA-Gesamtlänge mit 2 min pro kb berechnet.

Nach der Mutagenese-PCR wurden die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt und mit der Restriktionsendonuklease *Dpn I* (10 U) für die Dauer von 1 h bei 37°C inkubiert, um die nicht-mutierte, methylierte Ausgangsplasmid-DNA abzubauen. Anschließend wurden superkompetente XL1-Blue-Zellen mit 1 µl des Restriktionsverdau-Produktes transformiert (siehe Kap. 2.11.2.8, S. 72).

2.11.2.3 Auftrennung und Visualisierung von DNA

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach Mutagenese-PCR-, RT-PCR- oder Restriktionsverdau-Experimenten erfolgte mit Hilfe der nativen Agarose-Gelelektrophorese. Dazu wurde SeaKem® ME-Agarose (0,8 - 3 % [m/v]) als Gelmatrix durch Aufkochen in TAE-Puffer gelöst und auf einen Gelträger gegossen, wo sie während des Erkaltes gelierte. Die DNA-Proben wurden mit 10x Bromphenolblau-Lösung und / oder 6x Xylencyanol-Lösung versetzt, für die Dauer von 15 min bei 65°C erhitzt, in die Geltaschen pipettiert und in einer Horizontal-Elektrophoresekammer (Agagel Midi-Wide) bei einer elektrischen Feldstärke von 10 V / cm aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde TAE-Puffer eingesetzt.

Nach der Gelelektrophorese wurde das Agarose-Gel in einer Ethidiumbromid-Lösung (0,002 % [m/v] in Aqua bidest.) für die Dauer von 15 min gefärbt. Die Visualisierung der DNA durch UV-Licht und die Gelauswertung erfolgten mit Hilfe eines LTF-Geldokumentationssystems oder eines Lumi-Imager™. Für die Längenbestimmung der aufgetrennten

DNA-Fragmente wurden DNA-Längenstandards (100 bp DNA Ladder, 1 kb DNA Ladder, Lambda DNA-Mono Cut Mix) eingesetzt.

2.11.2.4 Reinigung von DNA

Reinigung von DNA aus Reaktionsansätzen

Die Reinigung der DNA-Fragmente von Nukleotiden, Primern, Proteinen, Salzen etc. nach PCR- oder Restriktionsverdau-Experimenten wurde mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Elution der DNA wurde mit Aqua bidest. (steril) durchgeführt.

Die Verwendung von Phenol-Chloroform war eine alternative Methode zur Reinigung von DNA aus Reaktionsansätzen. Dazu wurden eine Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung (25:24:1) und die zu reinigende DNA-Lösung mit gleichen Volumina gemischt und anschließend mit Hilfe einer Zentrifuge (Universal 30 RF / Rotor: 1412) bei 14000 x g und 4°C für die Dauer von 5 min pelletiert. Die entstandene, obere wässrige Phase wurde in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß transferiert und mit 400 µl Ethanol (abs.), 25 µl Ammoniumacetat-Lösung (10 M in Aqua bidest. [steril]) und 5 µl Glykogen-Lösung (2 % [m/v] in Aqua bidest. [steril]) gemischt. Nach der Zentrifugation mit Hilfe der Universal-Zentrifuge bei 14000 x g und 4°C für die Dauer von 5 min wurde der Überstand verworfen und das entstandene Pellet mit 500 µl Ethanol (70 % in in Aqua bidest. [steril]) gewaschen. Dieser Schritt einschließlich der Zentrifugation wurde wiederholt und das entstandene Pellet danach bei Raumtemperatur getrocknet. Die Resuspension des gereinigten Pellets erfolgte mit 50 µl TE-Puffer (steril).

Reinigung von DNA aus Agarose-Gelen

Der Gesamtansatz einer PCR bzw. eines Restriktionsverdaus wurde in einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und die gewünschte Ethidiumbromid-gefärbte Bande mit einem sterilen Einmal-Skalpell aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten. Die Reinigung der DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit. Für die Elution der DNA wurde Aqua bidest. (steril) eingesetzt.

2.11.2.5 Bestimmung von DNA-Konzentration und -Reinheit

Die Konzentration und Qualität von gereinigten DNA-Fragmenten wurde mit Hilfe eines Spektrophotometers (DU® 7400) bestimmt. Dabei wurde die Absorption bei den Wellen-

längen 260 nm und 280 nm gemessen. Eine gereinigte DNA-Probe lag vor, wenn das Verhältnis der beider Absorptionen (A) $A_{260 \text{ nm}} / A_{280 \text{ nm}}$ einen Wert von $1,9 \pm 0,1$ besaß. Die Konzentration der DNA ergab sich aus der Absorption bei 260 nm, wobei 1 OD einer Konzentration von 50 µg / ml doppelsträngiger DNA entspricht.

2.11.2.6 Modifikation von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die enzymatische Spaltung von DNA erfolgte mit Restriktionsendonukleasen zur Modifikation von Doppelstrang-Enden, zur Linearisierung zirkulärer DNA oder zur Restriktionsanalyse von Plasmid-DNA nach der Minipräparation. Dazu wurden die von den Herstellern empfohlenen Enzymmengen und Reaktionsbedingungen angewendet. Bei einem gleichzeitigen Einsatz von zwei Restriktionsendonukleasen in einem Reaktionsansatz wurden solche Temperatur- und Pufferbedingungen gewählt, die eine maximale Aktivität beider Enzyme gewährleisteten.

2.11.2.7 Ligation von DNA

Modifikation von DNA-Fragmenten

Vor der Insertion von DNA-Fragmenten in Amplifikations- oder Expressionsvektoren (siehe Tab. 5, S. 52) wurden die Doppelstrang-Enden der DNA-Fragmente durch Restriktionsendonukleasen modifiziert, da die PCR-Amplifikation der DNA-Fragmente mit Primern durchgeführt wurde, die an den Doppelstrang-Enden eine im gesamten DNA-Fragment einzigartige Schnittstelle einer Restriktionsendonuklease generierten (siehe Tab. 10, S. 65; Tab. 12, S. 66). Es konnten dabei ausschließlich solche Restriktionsendonukleasen eingesetzt werden, deren Reaktionen zu DNA-Fragmenten mit kohäsiven Doppelstrang-Enden führten. Zur Vorbereitung einer orientierten Insertion wurden DNA-Fragmente mit zwei verschiedenen Restriktionsendonukleasen inkubiert, sodass DNA-Fragmente mit nicht-komplementären, kohäsiven Doppelstrang-Enden entstanden. Nach den Restriktionsverdau-Experimenten wurden die DNA-Fragmente gereinigt und ihre Konzentration bestimmt.

Wurden DNA-Fragmente umklontiert, so folgte nach dem Restriktionsverdau des Ausgangs-plasmids die gelelektrophoretische Auftrennung der erhaltenen DNA-Fragmente sowie die Gelisolation, Reinigung und Konzentrationsbestimmung der Ziel-DNA.

Modifikation von Vektor-DNA

Vor der Ligation mit einem modifizierten DNA-Fragment wurde die zirkuläre Vektor-DNA durch Restriktionsendonukleasen hydrolytisch gespalten, sodass Doppelstrang-Enden

entstanden, die komplementär zu denen des DNA-Fragmentes waren (siehe Kap. 2.11.2.6). Nach der Reinigung der linearisierten Vektor-DNA erfolgte die enzymatische Abspaltung der Phosphatgruppen an den 5'-Enden des Vektor-DNA-Doppelstranges durch Alkalische Phosphatase aus Shrimps, um eine Religation der Vektor-DNA zu verhindern. Für die Dephosphorylierung von 50 ng linearisierter Vektor-DNA wurde 1 U Alkalische Phosphatase eingesetzt und für die Dauer von 10 min bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte die Enzymdenaturierung bei 65°C für die Dauer von 10 min sowie die Reinigung und Konzentrationsbestimmung der linearisierten dephosphorylierten Vektor-DNA.

Ligation von komplementären DNA-Doppelstrang-Enden

Die Ligation einer linearisierten dephosphorylierten Vektor-DNA mit einem DNA-Fragment, das Vektor-kompatible kohäsive Doppelstrang-Enden besaß, wurde unter Verwendung der T4-DNA-Ligase durchgeführt. Dabei entsprach das Längenverhältnis von Vektor-DNA und eingesetztem DNA-Fragment dem Fünffachen ihres Massenverhältnisses. Die Reaktion, die durch 400 U T4-DNA-Ligase katalysiert wurde, erfolgte bei Raumtemperatur für die Dauer von 10 min und wurde durch die Inkubation bei 65°C für die Dauer von 10 min gestoppt.

Ligation von nicht-komplementären DNA-Doppelstrang-Enden

Bei der Insertion eines DNA-Fragmentes in eine linearisierte Vektor-DNA mit einem der beiden kohäsiven Doppelstrang-Enden, das nicht-komplementär zu einem der kohäsiven Doppelstrang-Enden des DNA-Fragmentes ist, erfolgte nach der Primärligation der komplementären Doppelstrang-Enden von DNA-Fragment und Vektor-DNA eine Polymerase- / Exonuklease-Reaktion, die durch das Klenow-Enzym katalysiert wurde. Anschließend wurde die lineare DNA durch eine Sekundärligation zirkularisiert.

Bei der Primärligation entsprach das Längenverhältnis von Vektor-DNA und eingesetztem DNA-Fragment dem Fünffachen ihres Massenverhältnisses. Die Reaktion, die durch 800 U T4-DNA-Ligase katalysiert wurde, erfolgte bei Raumtemperatur für die Dauer von 1 h und wurde durch eine Inkubation bei 65°C für die Dauer von 10 min gestoppt. Das entstandene Ligationsprodukt wurde gereinigt und das Gesamtvolumen der eluierten DNA in der Polymerase- / Exonuklease-Reaktion eingesetzt. Bei dieser Modifikation kohäsiver Doppelstrang-Enden entstehen durch die Aktivität des Klenow-Enzyms stumpfe Doppelstrang-Enden, da das Enzym sowohl die Polymerisation des Doppelstranges in 5'-3'-Richtung katalysiert als auch kohäsive Nukleotide in

3'-5'-Richtung abbaut (Exonuklease-Aktivität). Die Reaktion, bei der 2 U Klenow-Enzym und je 20 µM dNTP's eingesetzt wurden, erfolgte bei 37°C für die Dauer von 40 min.

Nach der Reinigung der modifizierten DNA wurde die Sekundärligation durchgeführt. Die Zirkularisierung der linearen DNA erfolgte mit 2000 U T4-DNA-Ligase bei Raumtemperatur für die Dauer von 4 h. Danach wurde das Enzym durch eine Inkubation bei 65°C für die Dauer von 10 min denaturiert. Das entstandene Ligationsprodukt wurde in Transformationsexperimenten eingesetzt.

2.11.2.8 Transformation von *E. coli* - Zellen

Transformation von chemisch-kompetenten Zellen

Chemisch-kompetente Zellen der *E. coli* - Stämme BL21-CodonPlus[®]-RP, One Shot[®] TOP10 und XL1-Blue wurden für Transformationen mit Plasmid-DNA verwendet. Die genotypische Charakterisierung der Zellen ist in Tab. 6 (S. 52) dargestellt.

Vor Beginn der Transformation wurden 50 µl oder 100 µl Bakteriensuspension auf Eis aufgetaut, vorsichtig mit 4 µl eines Ligationsproduktes gemischt und für die Dauer von 30 min auf Eis inkubiert. BL21-CodonPlus[®]-RP-Zellen wurden vor der Zugabe einer Plasmid-DNA mit 2 µl XL10-Gold[®]-β-Mercaptoethanol-Lösung versetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Die Transformation der Zellen erfolgte durch einen Wärmeschock bei 42°C für die Dauer von 30 s. Anschließend wurden die Zellen für die Dauer von 2 min auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 250 µl vorgewärmtem SOC-Medium wurden die Zellen im Schüttelinkubator bei 270 U / min und 37°C für die Dauer von 1 h kultiviert. Anschließend wurden Portionen (50 µl bzw. 200 µl) der Bakteriensuspension auf LB-Agar-Platten, die Ampicillin (100 µg / ml) oder Kanamycin (100 µg / ml) als Selektionsmarker enthielten, ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Transformation von elektrokompetenten Zellen

Bei der Herstellung von rekombinanten adenoviralen Infektionspartikeln wurden elektrokompetente BJ5183- bzw. DH5α-Zellen verwendet (siehe Tab. 6, S. 52). Für die homologe Rekombination eines linearisierten rekombinanten Donorvektors und des zirkulären adenoviralen Akzeptorvektors wurden BJ5183-Zellen cotransformiert. Um die entstandene rekombinante adenovirale DNA zu amplifizieren, wurden DH5α-Zellen eingesetzt.

Für die Elektroporation der Zellen wurden je 40 µl der Bakteriensuspension mit Plasmid-DNA gemischt und in eine eisgekühlte 2-mm-Elektroporationsküvette (Plus™ 620) pipettiert. Die Transformation der elektrokompenten Zellen erfolgte mit Hilfe eines Elektroporationsgerätes (ECM 399 / PEP-Modul). Als Sollwert wurde eine Spannung von 2500 V eingestellt. Für die Dauer von 5 ms wurde ein Istwert erreicht, der mindestens 2450 V betrug. Danach wurden die Zellen mit 1 ml vorgewärmtem LB-Medium gemischt, in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen transferiert und im Schüttelinkubator bei 270 U / min und 37°C für die Dauer von 1 h kultiviert. Anschließend wurden 100 µl, 300 µl und 600 µl der Bakteriensuspension auf LB-Agar-Platten, die Ampicillin (100 µg / ml) als Selektionsmarker enthielten, ausplattiert und bei 37°C inkubiert. Auf Grund der geringen bakteriellen Amplifikationsrate der Plasmide dauerte die Inkubation bis zu 72 h.

2.11.2.9 Präparation von Plasmid-DNA

Minipräparation von Plasmid-DNA

Individuelle Klone einer LB-Agar-Platte wurden gepickt und in 5 ml LB-Medium, das 5 µl einer Ampicillin-Lösung (10 % [m/v] in Aqua bidest. [steril]) bzw. Kanamycin-Lösung (10 % [m/v] in Aqua bidest. [steril]) enthielt, im Schüttelinkubator bei 270 U / min über Nacht bei 37°C inkubiert. Danach wurden 1,5 ml der Bakteriensuspension mit Hilfe einer Zentrifuge (Universal 30 RF / Rotor: 1412) bei 14000 x g und Raumtemperatur für die Dauer von 10 min pelletiert und die Plasmid-DNA mit Hilfe des QIAprep® Spin Miniprep Kit nach Herstellerangaben isoliert. Die gereinigte Plasmid-DNA wurde mit Aqua bidest. (steril) eluiert. Nach der Bestimmung der DNA-Konzentration und -Reinheit wurde die Insertion der Plasmid-DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen analysiert (siehe Kap. 2.11.2.6, S. 70).

Maxipräparation von Plasmid-DNA

Für die Maxipräparation von Plasmid-DNA wurden 100 ml LB-Medium eingesetzt, das 100 µl einer Ampicillin-Lösung (10 % [m/v] in Aqua bidest. [steril]) bzw. Kanamycin-Lösung (10 % [m/v] in Aqua bidest. [steril]) enthielt. Das Kulturmedium wurde mit 1 ml der Minipräp-Kultur angeimpft und im Schüttelinkubator bei 270 U / min und 37°C über Nacht inkubiert. Die gesamte Bakteriensuspension wurde mit Hilfe einer Sorvall®-Zentrifuge (RC 5Bplus / Rotor: GSA) bei 6000 x g und 4°C für die Dauer von 15 min pelletiert und die Plasmid-DNA mit Hilfe des EndoFree™ Plasmid Maxi Kit nach Hersteller-

angaben isoliert. Die Resuspension der gereinigten Plasmid-DNA erfolgte mit Endotoxin-freiem Wasser.

2.11.2.10 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Nach der Charakterisierung der bei der Minipräparation erhaltenen Plasmid-DNA's durch Restriktionsverdau-Experimente wurden ausgewählte DNA-Proben durch das Biologisch-Medizinische Forschungszentrum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf oder durch die Fa. Qiagen (Hilden) sequenziert. Dabei wurden die interessierenden Regionen in beiden Strangrichtungen komplett sequenziert. Regionen, die länger als 700 bps waren, wurden durch Anwendung der Primer Walking - Methode sequenziert. Die Analyse der Sequenziergel-Elektropherogramme sowie die Auswertung der erhaltenen Daten und deren Vergleich mit publizierten Sequenzen erfolgten mit dem Software-Programm Chromas[®] 2.0 (Technelysium, Tewantin, AUS).

2.12 Proteinanalytische Methoden

Für die Analyse von Expressionsniveau und Phosphorylierungsgrad interessierender Proteine in den verwendeten Primärzellen oder Zelllinien wurden die Zellen lysiert, die Proteinkonzentration der Zelllysate bestimmt und die Proteine nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Proteintransfer immundetektiert.

2.12.1 Zelllysis

Die Lysis aller im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Zelltypen wurde mit RIPA-Puffer durchgeführt. Dazu wurden die Zellen, deren Kultivierung in 6-Kavitäten-Platten erfolgte, zweimal mit 2 ml PBS (eiskalt) je Kavität gewaschen und dann mit 200 µl RIPA-Puffer (eiskalt) je Kavität inkubiert. Zellen in 10-cm-Petri-Schalen wurden mit 10 ml PBS gewaschen und mit 1 ml RIPA-Puffer lysiert. Während der Zelllysis standen die Platten bzw. Schalen für die Dauer von ca. 5 min auf Eis. Die Zelllysate wurden mit Hilfe eines Zellschabers vom Platten- bzw. Schalenboden gelöst, in 1,5-ml-Reaktionsgefäße überführt und anschließend mit Hilfe eines Überkopfschüttlers bei 4°C für die Dauer von 2 h geschüttelt. Danach wurden die Zelllysate mit Hilfe einer Zentrifuge (Universal 30 RF / Rotor: 1412) bei 14000 x g und 4°C für die Dauer von 10 min zentrifugiert und von unlöslichen Zellbestandteilen getrennt. Der erhaltene Überstand (Zelllysat) wurde bei -20°C aufbewahrt.

2.12.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Zelllysate-Proben wurde mit Hilfe des BioRad Protein Assay Kit nach der Methode von Bradford (1976) durchgeführt. Das hierbei zugrunde liegende Messprinzip basiert auf der Verschiebung der Wellenlänge von 425 nm nach 595 nm bei maximaler Extinktion des Coomassie Brilliant Blue G-250-Farbstoffs infolge der Entstehung von Cu^{2+} -Protein-Komplexen. Die Kalibrierung erfolgte durch Proben mit definierter Konzentration aus einer Standardlösung von bovinem Serumalbumin. Sowohl die Eichlösungen als auch die Zelllysate-Proben wurden mit Aqua bidest. adäquat verdünnt und mit 200 μl BioRad-Farbstoffreagenz je Ansatz versetzt. Nach einer Inkubation bei Raumtemperatur für die Dauer von 10 min wurde die Extinktion bei 595 nm mit Hilfe eines Spektrophotometers (DU[®] 650) bestimmt und die Proteinkonzentration anhand der ermittelten Eichgerade berechnet.

2.12.3 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Die Auftrennung von Proteinen aus Membranfraktionen und Zelllysaten erfolgte mittels denaturierender SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970). Die SDS-PAGE wurde in einer Horizontal-Elektrophoresekammer (Multiphor II) mit 0,5 mm dicken, foliengebundenen ExcelGel[™] SDS-Gradienten-Fertiggelen (8 - 18 %) und ExcelGel[®] SDS Anoden- (0,45 M Tris / Acetat, 0,4 % [m/v] SDS, 0,5 % [m/v] Orange G; pH 6,6) bzw. Kathoden-Pufferstreifen (0,08 M Tris / Acetat, 0,8 M Tricin, 0,6 % [m/v] SDS; pH 7,1) durchgeführt. Für die Durchführung der SDS-PAGE wurde die temperierbare Kühlplatte (13°C) mit 3 ml Petroleum-Benzin beschichtet und das Gradienten-Fertiggel sowie der Anoden- bzw. Kathoden-Pufferstreifen aufgelegt. Danach erfolgte die Auftragung der Proben (max. Probenvolumen: 25 μl), die vorher mit 6x-Laemmli-Probenpuffer versetzt und für die Dauer von 10 min bei 95°C denaturiert wurden. Die SDS-PAGE wurde bei 30 V, 600 W sowie 20 mA durchgeführt und dauerte ca. 2,5 h, bis die blaue Lauffront den Anoden-Pufferstreifen erreichte. Zur Proteingrößen-Bestimmung wurden die Protein-Marker Broad Range bzw. Prestained Broad Range eingesetzt.

2.12.4 Proteintransfer

Zur Durchführung des Semidry-Blotting-Verfahrens wurden eine PVDF-Immobilon-P-Membran (0,45 μm) und Munktell[®] 1F-Filterpapiere im Format 10 x 25 cm (Normalgröße) oder 10 x 12,5 cm (halbe Gelgröße) vorbereitet. Sechs der 18 Filterpapiere wurden in

Anodenpuffer I getränkt, auf die untere, mit Aqua bidest. befeuchtete Anodenplatte einer Blotting-Apparatur (LKB-Novablot) gelegt und mit drei weiteren, in Anodenpuffer II inkubierten Filterpapieren überschichtet. Die PVDF-Membran wurde kurz in Methanol getränkt, mehrfach mit Aqua bidest. gewaschen und in Anodenpuffer II inkubiert. Das Gradienten-Fertiggel wurde für die Dauer von 5 min kopfüber in Anodenpuffer II gelegt, mit Hilfe eines LKB-Filmremovers von der Trägerfolie getrennt und die PVDF-Membran darüber gelegt. Danach wurde das Gel-Membran-Paket kopfüber auf das Filterpapier gelegt und nach der Entfernung der Trägerfolie mit neun Filterpapieren überschichtet, die vorher in Kathodenpuffer inkubiert wurden. Abschließend wurde das Gesamtpaket mit einem Roller luftblasenfrei geglättet, die Kathodenplatte aufgesetzt und der Proteintransfer bei konstant 20 V, 30 W und 200 mA ($0,8 \text{ mA} / \text{cm}^2$) für die Dauer von 1 h durchgeführt.

2.12.5 Protein-Färbetechniken

Die auf eine PVDF-Membran transferierten Proteine wurden nach dem Western Blotting mit Ponceau S gefärbt, um die Effektivität des Proteintransfers zu überprüfen. Als Kontrolle erfolgte die Färbung des entsprechenden Gels mit Coomassie Blue, um bei unvollständigem Proteintransfer im Gel verbliebene Proteine nachweisen zu können.

Proteinfärbung mit Ponceau S

Für die Visualisierung der Proteine wurden PVDF-Membranen nach dem Proteintransfer in einer Ponceau S - Lösung für die Dauer von 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach mit Aqua bidest. gewaschen, bis die rotgefärbten Proteinbanden sichtbar wurden. Da diese Färbetechnik reversibel ist, konnten die PVDF-Membranen durch wiederholtes Waschen mit PBS-T vollständig entfärbt werden und waren somit für nachfolgende Immun-detektionen verwendbar.

Proteinfärbung mit Coomassie Blue

Nach dem Proteintransfer wurden die Gradienten-Fertiggel mit Coomassie Blue-Lösung für die Dauer von 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit Entfärbelösung mehrfach unter Schütteln gewaschen, bis die gefärbten Proteinbanden vor einem klaren Hintergrund erschienen. Die nach dem Membranblotting noch im Gradienten-Fertiggel verbliebenen Proteine wurden als Banden sichtbar und dienten zur Beurteilung der Effektivität des Western Blotting-Verfahrens.

2.12.6 Immundetektion mit verstärkter Chemilumineszenz

Absättigung unspezifischer Bindungsstellen

Die PVDF-Membranen wurden nach dem Proteintransfer bzw. Membranstripping (siehe unten) in einer Blockierlösung für die Dauer von 1 h bei Raumtemperatur auf einem Kippschüttler oder Rollenmischer inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Für alle eingesetzten Antikörper wurde Blockierlösung I verwendet, lediglich die beiden Primärantikörper anti-Akt und anti-phospho-Akt sowie die entsprechenden Sekundärantikörper wurden in Blockierlösung II verdünnt.

Antikörperinkubation

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Primär- bzw. Sekundärantikörper und ihre eingesetzte Verdünnung sind in Kap. 2.7 (S. 53) aufgeführt. Die Inkubation von PVDF-Membranen mit einem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C unter Schütteln oder Rollen. Dazu wurde der Primärantikörper in der entsprechenden Blockierlösung verdünnt (siehe oben). Nach der Primärantikörper-Inkubation wurden die PVDF-Membranen in PBS-T oder TBS-T gewaschen (dreimal 15 min) und anschließend mit einem entsprechenden Meerrettich-Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper für die Dauer von 2 h bei Raumtemperatur unter Schütteln oder Rollen inkubiert. Danach wurde erneut mit PBS-T oder TBS-T gewaschen (dreimal 15 min).

Immundetektion mit verstärkter Chemilumineszenz

Zur Detektion der PVDF-Membran-gebundenen Sekundärantikörper mittels verstärkter Chemilumineszenz wurde der SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate Kit eingesetzt. Dabei wurden zwei im Kit enthaltene Lösungen (Stable Peroxid Solution / Luminol Enhancer) im Volumenverhältnis 1:2 gemischt und die PVDF-Membranen darin lichtgeschützt für die Dauer von 0,5 - 10 min inkubiert. Die durch die Meerrettich-Peroxidase-katalysierte Oxidation von Luminol durch Wasserstoffperoxid entstandene Chemilumineszenz wurde mit Hilfe eines Lumi-Imager™ densitometrisch erfasst und mit dem zugehörigen Software-Programm LUMI-Analyst™ ausgewertet. Bei Proben mit verminderter Proteinkonzentration erfolgte die Detektion mit Hilfe des SuperSignal® West Femto Chemiluminescent Substrate Kit, der eine geringere Nachweisgrenze besitzt.

Membranstripping

Die Methode des Membranstripping ermöglichte die Wiederverwendung von bereits detektierten Membranen durch die Abtrennung von gebundenen Antikörperkomplexen. Die Durchführung des Membranstripping erfolgte mit Hilfe des Western Blot Recycling Kit nach Herstellerangaben. Dabei wurden die PVDF-Membranen mit einer im Kit enthaltenen Stripping-Lösung bei Raumtemperatur für die Dauer von 13 min inkubiert und anschließend mit einem gebrauchsfertigen Blocking-Puffer zweimal gewaschen (5 min und 15 min). Danach erfolgte die Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit der entsprechenden Blockierlösung und die erneute Inkubation mit einem Primärantikörper (siehe oben).

2.13 Transiente Transfektion von H9c2-E2-Zellen

Zur Charakterisierung der funktionellen Interaktion von Rab11A und GLUT4myc in Ratten-Kardiomyoblasten wurden H9c2-E2-Zellen mit den Expressionsvektoren pCMV-GLUT4myc und pCMV-Rab11A bzw. pCMV-Rab11A N124I oder pCMV ohne Insert als Kontrollvektor transient cotransfiziert. Für die Durchführung der transienten Cotransfektion wurden 10⁵ H9c2-E2-Zellen je Kavität einer 6-Kavitäten-Platte bzw. 10⁶ Zellen pro 10-cm-Petri-Schale ausgesät und mit 3 ml bzw. 10 ml DMEM-Komplettmedium für die Dauer von 24 h im Brutschrank kultiviert (siehe Kap. 2.10.2.2, S. 61). Danach erfolgte die Cotransfektion der Zellen mit dem Transfektionsreagenz FuGENE 6 und jeweils 1 µg bzw. 10 µg der interessierenden Endotoxin-freien Plasmid-DNA. Die allgemeine Zusammensetzung der Transfektionsgemische für eine Kavität einer 6-Kavitäten-Platte bzw. eine 10-cm-Petri-Schale ist in Tab. 16 dargestellt. Bei Einzeltransfektionen wurde die Gesamtmenge der Plasmid-DNA durch die Zugabe von 1 µg bzw. 10 µg des Kontrollvektors pCMV komplettiert.

	DMEM	FuGENE 6	Plasmid-DNA
6-Kavitäten-Platte*	2 ml	12 µl	2 µg
10-cm-Petri-Schale	10 ml	120 µl	20 µg

Tab. 16 Allgemeine Zusammensetzung der Transfektionsgemische für H9c2-E2-Zellen.

* Die Angaben beziehen sich auf eine Kavität einer 6-Kavitäten-Platte.

Zur Vermeidung pipettierbedingter Transfektionsschwankungen wurden Gesamtansätze der Transfektionsgemische entsprechend der Kavitäten- bzw. Plattenanzahl hergestellt, die für die Dauer von 25 min bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Danach erfolgte die tropfenweise Zugabe von Aliquots á 2,2 ml je Kavität einer 6-Kavitäten-Platte bzw. 10,2 ml pro 10-cm-Petri-Schale zu den Zellen und eine Kultivierung im Brutschrank für die Dauer von 6 h. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml bzw. 10 ml PBS gewaschen und nach der Zugabe von 3 ml bzw. 10 ml DMEM-Komplettmedium für die Dauer von 48 h im Brutschrank kultiviert. Danach wurden die Zellen für die Analyse der Insulin-stimulierten Glucoseaufnahme bzw. Translokation von GLUT4myc eingesetzt oder zur Bestimmung der Protein-Überexpression lysiert.

2.14 Adenovirale Infektion von humanen Skelettmuskelzellen

2.14.1 Herstellung von rekombinanten Viruspartikeln

Für die Überexpression von Rab11A und GLUT4myc in humanen Skelettmuskelzellen wurden rekombinante adenovirale Infektionspartikel (Viruspartikel) unter Verwendung des AdenoVator™-Kit hergestellt und mit Hilfe des BD Adeno-X™ Virus Purification Kit gereinigt. Einige der zur Herstellung der rekombinanten Viruspartikel verwendeten molekularbiologischen Methoden sind bereits in Kap. 2.11 (S. 63) detailliert dargestellt, sodass diese Methoden in den folgenden Abschnitten nur allgemein erwähnt sind.

2.14.1.1 Herstellung von rekombinanten adenoviralen Donorvektoren

Bei der Herstellung von rekombinanten adenoviralen Donorvektoren wurde die cDNA von Rab11A bzw. GLUT4myc als Insert in den adenoviralen Donorvektor pAdenovator-CMV5-IRES-GFP (pAV-CIG) ligiert und kloniert.

Herstellung des Rab11A-rekombinanten adenoviralen Donorvektors

Die cDNA von Rab11A wurde aus der Gesamt-RNA von H9c2-E2-Zellen mittels RT-PCR unter Verwendung des OneStep RT-PCR Kit und mit Rab11A-spezifischen Primern generiert, die eine Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease *Bgl* II enthielten (siehe Kap. 2.11.1.4, S. 64). Die entstandene Rab11A-cDNA wurde mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit gereinigt (siehe Kap. 2.11.2.4, S. 69) und mittels Agarose-Gelelektrophorese und nachfolgender Visualisierung analysiert (siehe Kap. 2.11.2.3, S. 68). Zur Herstellung von Vektor-kompatiblen kohäsiven Doppelstrang-Enden der Rab11A-cDNA wurde die gereinigte cDNA anschließend mit der Restriktionsendonuklease *Bgl* II (5 U) für die Dauer von 1 h bei

37°C inkubiert. Danach erfolgte die Reinigung mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit sowie die Bestimmung von Konzentration und Reinheit der Rab11A-cDNA (siehe Kap. 2.11.2.5, S. 69). Nach der Ligation der Rab11A-cDNA in den linearisierten adenoviralen Donorvektor pAV-CIG / Bgl II wurden chemisch-kompetente One Shot® TOP10-Zellen mit dem Ligationsprodukt transformiert und auf LB-Agar-Platten kultiviert, die Kanamycin als Selektionsmarker enthielten (siehe Kap. 2.11.2.8, S. 72).

Herstellung des Rab11A N124I-rekombinanten adenoviralen Donorvektors

Der adenovirale Donorvektor pAV-CIG-Rab11A N124I wurde mittels Mutagenese-PCR unter Verwendung des Ausgangsplasmids pAV-CIG-Rab11A mit Hilfe des QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit generiert (siehe Kap. 2.11.2.2, S. 67). Die Sequenzen der eingesetzten Mutagenese-PCR-Primer sind in Tab. 14 (S. 67) dargestellt. Nach der Reinigung des PCR-Produktes mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit wurde die Probe mit der Restriktionsendonuklease *Dpn I* (10 U) für die Dauer von 1 h bei 37°C inkubiert, um die nicht-mutierte, methylierte DNA des Ausgangsplasmids abzubauen. Anschließend wurden chemisch-kompetente XL1-Blue-Zellen mit dem Produkt des Restriktionsverdaus transformiert und auf LB-Agar-Platten kultiviert, die Kanamycin als Selektionsmarker enthielten (siehe Kap. 2.11.2.8, S. 72).

Herstellung des GLUT4myc-rekombinanten adenoviralen Donorvektors

Für die Herstellung des GLUT4myc-rekombinanten adenoviralen Donorvektors wurde eine Mutagenese-PCR unter Verwendung des Ausgangsplasmids pCXN2-GLUT4myc und mit Hilfe des QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit durchgeführt (siehe Kap. 2.11.2.2, S. 67), da die GLUT4myc-cDNA eine intrinsische Schnittstelle der Restriktionsendonuklease *Bgl II* besitzt. Die Sequenzen der eingesetzten Mutagenese-PCR-Primer sind in Tab. 14 (S. 67) dargestellt. Nach der Reinigung des PCR-Produktes mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit wurde die Probe mit der Restriktionsendonuklease *Dpn I* (10 U) für die Dauer von 1 h bei 37°C inkubiert, um die nicht-mutierte, methylierte DNA des Ausgangsplasmids abzubauen. Anschließend wurden chemisch-kompetente XL1-Blue-Zellen mit dem Produkt des Restriktionsverdaus transformiert und auf LB-Agar-Platten kultiviert, die Ampicillin als Selektionsmarker enthielten (siehe Kap. 2.11.2.8, S. 72). Individuelle Klone wurden mittels Minipräparation amplifiziert und die Plasmid-DNA mit Hilfe des QIAprep® Spin Miniprep Kit isoliert (siehe Kap. 2.11.2.9, S. 73).

Zur Vorbereitung der Ligation der GLUT4myc-cDNA mit dem linearisierten adenoviralen Donorvektor pAV-CIG / Bgl II wurde das modifizierte Plasmid pCXN2-GLUT4myc amplifiziert, dessen intrinsische GLUT4myc-cDNA-Schnittstelle der Restriktionsendonuklease *Bgl* II substituiert war. Die Amplifikation erfolgte mittels PCR und GLUT4myc-spezifischen Primern, die an ihrem 5'-Ende eine Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease *Bgl* II enthielten (siehe Kap. 2.11.2.1, S. 65). Nach der Reinigung des PCR-Produktes mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit (siehe Kap. 2.11.2.4, S. 69) erfolgte die Herstellung von Vektor-kompatiblen Doppelstrang-Enden der GLUT4myc-cDNA durch den Einsatz der Restriktionsendonuklease *Bgl* II (5 U) für die Dauer von 1 h bei 37°C. Anschließend wurde das Produkt des Restriktionsverdau mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, die GLUT4myc-cDNA isoliert und mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit gereinigt (siehe Kap. 2.11.2.4, S. 69). Nach der Bestimmung von Konzentration und Reinheit der DNA wurde die GLUT4myc-cDNA mit dem linearisierten adenoviralen Donorvektor pAV-CIG / Bgl II ligiert (siehe Kap. 2.11.2.7, S. 70). Danach wurden chemisch-kompetente One Shot® TOP10-Zellen mit dem Ligationsprodukt transformiert und auf LB-Agar-Platten kultiviert, die Kanamycin als Selektionsmarker enthielten (siehe Kap. 2.11.2.8, S. 72).

Individuelle Klone der LB-Agar-Platten, die Kanamycin als Selektionsmarker enthielten, wurden kultiviert und die Plasmid-DNA von pAV-CIG-Rab11A, pAV-CIG-Rab11A N124I bzw. pAV-CIG-GLUT4myc isoliert. Die Bestimmung der Gesamtlänge der Plasmid-DNA's sowie der korrekten Insertion erfolgte durch den Einsatz spezifischer Restriktionsendonukleasen (siehe Kap. 2.11.2.6, S. 69) mit nachfolgender Agarose-Gelelektrophorese und Visualisierung der Ethidiumbromid-gefärbten DNA-Fragmente (siehe Kap. 2.11.2.3, S. 68). Ausgewählte Plasmide wurden durch die Fa. Qiagen (Hilden) sequenziert (siehe Kap. 2.11.2.10, S. 74).

Linearisierung der rekombinanten adenoviralen Donorvektoren

Für die nachfolgende homologe Rekombination wurde eine Plasmid-DNA der adenoviralen Donorvektoren pAV-CIG-Rab11A, pAV-CIG-Rab11A N124I bzw. pAV-CIG-GLUT4myc mit korrekter Insertion ausgewählt und durch den Einsatz der Restriktionsendonuklease *Pme* I linearisiert. Der Restriktionsverdau wurde mit 5 U des Enzyms für die Dauer von 3 h bei 37°C durchgeführt. Anschließend erfolgte die Auftrennung der entstandenen DNA-Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese sowie die Gelisolation und Reinigung der linearisierten adenoviralen Donorvektoren pAV-CIG-Rab11A, pAV-CIG-Rab11A N124I und pAV-CIG-

GLUT4myc mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (siehe Kap. 2.11.2.4, S. 69). Die Konzentration der rekombinanten adenoviralen Donorvektoren wurde bestimmt und eine Finalkonzentration von 0,2 µg / µl eingestellt (siehe Kap. 2.11.2.5, S. 69).

2.14.1.2 Homologe Rekombination

Der adenovirale Akzeptorvektor pAVG5-ΔE1/E3, der das Genom des Adenovirus-Serumtyp 5 ohne die replikationsrelevanten Regionen E1 und E3 beinhaltet, und der linearisierte adenovirale Donorvektor pAV-CIG-Rab11A, pAV-CIG-Rab11A N124I bzw. pAV-CIG-GLUT4myc wurden für die homologe Rekombination in elektrokompenten BJ5183-Zellen cotransformiert. Dazu wurden 40 µl der Bakteriensuspension mit 0,1 µg des adenoviralen Akzeptorvektors pAVG5-ΔE1/E3 und 1 µg eines linearisierten adenoviralen Donorvektors gemischt und in eine eisgekühlte 2-mm-Elektroporationsküvette (Plus™ 620) pipettiert. Die Durchführung der Elektroporation ist in Kap. 2.11.2.8 (S. 72) detailliert dargestellt. Nach der Elektroporation wurden die Zellen mit 1 ml vorgewärmtem LB-Medium gemischt, in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen transferiert und im Schüttelinkubator bei 270 U / min und 37°C für die Dauer von 1 h kultiviert. Anschließend wurden 100 µl, 300 µl und 600 µl der Bakteriensuspension auf LB-Agar-Platten, die Kanamycin (100 µg / ml) als Selektionsmarker enthielten, ausplattiert und bei 37°C inkubiert. Auf Grund der geringen bakteriellen Amplifikationsrate der entstandenen adenoviralen Plasmid-DNA von pAVG5-Rab11A, pAVG5-Rab11A N124I und pAVG5-GLUT4myc dauerte die Inkubation bis zu 72 h. Danach wurden individuelle Klone kultiviert und die rekombinanten adenoviralen Plasmid-DNA's mit Hilfe des QIAprep® Spin Miniprep Kit isoliert (siehe Kap. 2.11.2.9, S. 73).

Für die Prüfung der korrekten homologen Rekombination eines adenoviralen Donorvektors mit dem adenoviralen Akzeptorvektor wurden die Restriktionsendonukleasen *Bst*X I und *Pac* I eingesetzt. Die Analyse der Restriktionsverdau-Experimente erfolgte durch die nachfolgende Agarose-Gelelektrophorese und die Visualisierung der Ethidiumbromid-gefärbten DNA-Fragmente (siehe Kap. 2.11.2.3, S. 68).

2.14.1.3 Amplifikation von rekombinanter adenoviraler Plasmid-DNA

Zur Herstellung größerer und stabiler Mengen von rekombinanter adenoviraler Plasmid-DNA wurden elektrokompente DH5α-Zellen mit der Plasmid-DNA von pAVG5-Rab11A, pAVG5-Rab11A N124I bzw. pAVG5-GLUT4myc transformiert. Dazu wurden 40 µl der Bakteriensuspension und 4 µl einer gereinigten Plasmid-DNA gemischt und in eine eisgekühlte

2-mm-Elektroporationsküvette (Plus™ 620) pipettiert. Die Durchführung der Elektroporation ist in Kap. 2.11.2.8 (S. 72) detailliert dargestellt. Nach der Elektroporation wurden die Zellen mit 1 ml vorgewärmtem LB-Medium gemischt, in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen transferiert und im Schüttelinkubator bei 270 U / min und 37°C für die Dauer von 1 h kultiviert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension 1:10 und 1:100 mit LB-Medium verdünnt und davon jeweils 100 µl auf LB-Agar-Platten, die Kanamycin (100 µg / ml) als Selektionsmarker enthielten, ausplattiert und bei 37°C inkubiert. Individuelle Klone wurden mittels Maxipräparation kultiviert und die rekombinante adenovirale Plasmid-DNA mit Hilfe des EndoFree™ Plasmid Maxi Kit isoliert (siehe Kap. 2.11.2.9, S. 73). Nach der Resuspension der gereinigten adenoviralen Plasmid-DNA mit Endotoxin-freiem Wasser wurde die Konzentration und Reinheit der DNA bestimmt (siehe Kap. 2.11.2.5, S. 69).

2.14.1.4 Linearisierung von rekombinanter adenoviraler Plasmid-DNA

Zur Vorbereitung der Transfektion von replikationskompetenten HEK-293-Zellen mit einer rekombinanten adenoviralen Plasmid-DNA wurde die gereinigte Plasmid-DNA von pAVG5-Rab11A, pAVG5-Rab11A N124I bzw. pAVG5-GLUT4myc durch den Einsatz der Restriktionsendonuklease *Pac I* linearisiert. Die Inkubation von jeweils 20 µg Plasmid-DNA mit 10 U des Enzyms wurde für die Dauer von 3 h bei 37°C durchgeführt. Danach erfolgte die Phenol-Chloroform-Reinigung der Plasmid-DNA und die Einstellung der Finalkonzentration auf 100 ng / µl (siehe Kap. 2.11.2.4, S. 69).

2.14.1.5 Calciumphosphat-Transfektion von HEK-293-Zellen

Für die Transfektion von replikationskompetenten HEK-293-Zellen mit der linearisierten Plasmid-DNA von pAVG5-Rab11A, pAVG5-Rab11A N124I bzw. pAVG5-GLUT4myc wurden 10⁶ Zellen pro 10-cm-Petri-Schale ausgesät und mit 10 ml DMEM-Komplettmedium für die Dauer von 24 h im Brutschrank kultiviert (siehe Kap. 2.10.2.2, S. 61). Drei Stunden vor Beginn der Transfektion erfolgte ein Wechsel des Kulturmediums. Zur Vorbereitung des Transfektionspräzipitats wurden 169 µl Aqua bidest. (steril) und 5 µl einer 2 M CaCl₂-Lösung in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß pipettiert und 50 µl einer Plasmid-DNA-Lösung, die 5 µg einer linearisierten, rekombinanten adenoviralen Plasmid-DNA enthielt, tropfenweise hinzugegeben. Nach der Zugabe von 26 µl der 2 M CaCl₂-Lösung wurde die Gesamtlösung mit 250 µl HBS-Puffer versetzt, wobei während des Mischens Luftblasen mit Hilfe eines zweiten Pipettiergerätes erzeugt wurden. Dadurch entstanden Präzipitátskomplexe mit geringer Größe und erhöhter Transfektionseffizienz. Die Transfektionslösung (500 µl) wurde

tropfenweise zu den Zellen hinzugegeben, die danach für die Dauer von 24 h im Brutschrank kultiviert wurden. Anschließend wurden die Zellen einmal mit 10 ml EGTA-Lösung (1 mM in PBS) und zweimal mit 10 ml PBS vorsichtig gewaschen. Auf Grund des schwachen Anhaftens der transfizierten Zellen an der Schalenoberfläche erfolgte die Zellernte lediglich durch die Zugabe von 18 ml DMEM-Komplettmedium ohne vorherige Trypsinierung. Die Zellsuspension wurde in Aliquots á 3 ml pro Kavität einer 6-Kavitäten-Platte verteilt und für die Dauer von 6 h im Brutschrank kultiviert.

2.14.1.6 Amplifikation von rekombinanten Viruspartikeln

Plaque-Entstehung und -Selektion

Für die Plaqueentstehung wurden die transfizierten HEK-293-Zellen mit DMEM-Komplettmedium, das zusätzlich Agarose enthielt, überschichtet, um die Diffusion der freigesetzten Viruspartikel zu vermindern und somit die Infektion benachbarter Zellen zu beschleunigen. Dazu wurden 5 % (m/v) SeaPlaque[®]-Agarose durch Aufkochen in PBS gelöst, autoklaviert und danach in Aliquots á 10 ml portioniert und bei 4°C aufbewahrt. Unmittelbar vor Überschichtung der Zellen wurden 10 ml der gelierten Agarose erhitzt, auf 45°C abgekühlt und mit 30 ml DMEM-Komplettmedium versetzt. Nach der Entfernung des Kulturmediums wurden die Zellen mit 1,5 ml DMEM-Agarose (ca. 40°C) je Kavität einer 6-Kavitäten-Platte vorsichtig überschichtet und zur Entstehung der Agarose-Gelschicht für die Dauer von 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für die Dauer von 19 - 25 Tagen im Brutschrank kultiviert, bis die Plaquebildung (weiße Plaquehöfe) lichtmikroskopisch erkennbar war. Während dieser Kultivierungsphase wurden 1,2 ml DMEM-Agarose je Kavität einer 6-Kavitäten-Platte im Abstand von 5 Tagen hinzugegeben. Mit Hilfe eines Einmalskalpells wurden ausgewählte Plaques isoliert, jeweils in eine Kavität einer 6-Kavitäten-Platte transferiert und mit 1 ml DMEM-Komplettmedium für die Dauer von 24 h im Brutschrank kultiviert (Elution).

Minipräparation von rekombinanten Viruspartikeln

Für die Minipräparation von rekombinanten Viruspartikeln wurden 10⁵ HEK-293-Zellen je Kavität einer 6-Kavitäten-Platte ausgesät und mit 2 ml Komplettmedium für die Dauer von 24 h im Brutschrank inkubiert. Nach Entfernung des Kulturmediums wurden die Zellen mit je 200 µl der eluierten Virussuspension infiziert und für die Dauer von 1,5 h im Brutschrank kultiviert. Danach erfolgte die Zugabe von 2,8 ml DMEM-Komplettmedium und

eine weitere Zellkultivierung bis zum Auftreten des zytopathischen Effekts in allen Zellen (Dauer: 6 - 8 Tage). Die Lysis der infizierten Zellen geschah durch einen Kälte-Wärme-Schock. Dazu wurden die Zellen dreimal für jeweils 15 min bei -20°C und 35°C abwechselnd inkubiert. Anschließend wurde das Zelllysat mit Hilfe einer Zentrifuge (RotantaR / Rotor: 5094) bei 400 x g und Raumtemperatur für die Dauer von 10 min zentrifugiert. Der Überstand (3 ml) wurde als primäre Virussuspension der rekombinanten Viruspartikel AV-Rab11A, AV-Rab11A N124I bzw. AV-GLUT4myc für die nachfolgende Maxipräparation der Viruspartikel verwendet.

Maxipräparation von rekombinanten Viruspartikeln

Für die Maxipräparation der rekombinanten Viruspartikel AV-Rab11A, AV-Rab11A N124I und AV-GLUT4myc wurden jeweils 5×10^6 HEK-293-Zellen in einer 10-cm-Petri-Schale mit 10 ml DMEM-Komplettmedium für die Dauer von 24 h im Brutschrank inkubiert. Nach der Entfernung des Kulturmediums wurden die Zellen mit 1,5 ml der primären Virussuspension infiziert und für die Dauer von 1,5 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Kulturmedium mit 8,5 ml DMEM-Komplettmedium aufgefüllt und die Zellkultivierung bis zum vollständigen Erscheinen des zytopathischen Effektes durchgeführt (Dauer: 72 h). Danach erfolgte die Zelllysis durch einen Kälte-Wärme-Schock. Dazu wurden die Zellen dreimal für jeweils 20 min bei -20°C und 35°C abwechselnd inkubiert. Anschließend wurde das Zelllysat mit Hilfe einer Zentrifuge (RotantaR / Rotor: 5094) bei 400 x g und Raumtemperatur für die Dauer von 10 min zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde mit 40 ml DMEM-Komplettmedium versetzt (sekundäre Virussuspension) und für eine erneute Infektion von HEK-293-Zellen verwendet. Dazu wurden jeweils 10^7 Zellen in zehn 175-cm²-Zellkulturflaschen am Vortag ausgesät und mit 30 ml DMEM-Komplettmedium kultiviert. Nach der Entfernung des Kulturmediums wurden die Zellen mit 5 ml der sekundären Virussuspension je Zellkulturflasche infiziert und für die Dauer von 1,5 h im Brutschrank inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von jeweils 25 ml DMEM-Komplettmedium und die Fortsetzung der Zellkultivierung bis zum zytopathischen Effekt aller Zellen (Dauer: 72 h). Dieser Zyklus wurde zweimal wiederholt.

2.14.1.7 Reinigung von rekombinanten Viruspartikeln

Die Reinigung der rekombinanten Viruspartikel AV-Rab11A, AV-Rab11A N124I und AV-GLUT4myc wurde mit Hilfe des BD Adeno-X™ Virus Purification Kit nach Herstellerangaben

durchgeführt. Dazu wurde der erhaltene Überstand aus dem letzten Zyklus der Maxipräparation (ca. 350 ml) vorfiltriert und mit *DNase I* (2000 U) im Schüttelinkubator bei 80 U / min und 37°C für die Dauer von 1 h inkubiert, um die zelluläre DNA abzubauen. Anschließend wurde das Filtrat mit 150 ml Verdünnungspuffer versetzt und über ein Schlauchsystem durch eine sterile 60-ml-Spritze als Vakuumerzeuger auf den Adeno-X™ Standard Filter transferiert und filtriert (ca. 15 ml / min). Danach wurde der Filter mit 150 ml Waschpuffer gewaschen und die gereinigten Viruspartikel AV-Rab11A, AV-Rab11A N124I bzw. AV-GLUT4myc mit 5 ml Elutionspuffer eluiert.

2.14.1.8 Bestimmung der Konzentration von rekombinanten Viruspartikeln

Zur Vorbereitung der Bestimmung der Konzentration von rekombinanten Viruspartikeln wurden gereinigte Proben von AV-Rab11A, AV-Rab11A N124I bzw. AV-GLUT4myc mit Viruslysis-Puffer verdünnt und durch die Inkubation bei 56°C für die Dauer von 20 min lysiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Konzentration von rekombinanten Viruspartikeln durch die Messung der Absorption bei 260 nm mit Hilfe eines Spektrophotometers (DU® 7400), wobei 1 OD einer Konzentration von 10^{12} Viruspartikeln entspricht.

Außerdem wurde die Anzahl von *Plaque forming units* (PFU) und der *Multiplicity of infection* (MOI)-Wert ermittelt, der das Verhältnis der Anzahl von Viruspartikeln zu Zellen angibt. Für die Bestimmung der PFU wurden 10^6 HEK-293-Zellen je 10-cm-Petri-Schale mit 10 ml DMEM-Komplettmedium inkubiert und für die Dauer von 24 h im Brutschrank kultiviert. Danach erfolgte die Zugabe von Aliquots einer gereinigten Viruspartikel-Suspension, die in DMEM-Komplettmedium verdünnt wurden. Nach der Infektion wurden die Zellen im Schüttelinkubator bei 80 U / min und 37°C für die Dauer von 4 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 10 ml DMEM-Agarose überschichtet und im Brutschrank kultiviert (siehe Kap. 2.14.1.6, S. 84). Nach einer Dauer von 20 - 25 Tagen wurde die Anzahl der entstandenen Plaques gezählt und die Gesamtmenge der PFU durch die Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor berechnet.

Für die Bestimmung des MOI-Wertes wurden 10^6 HEK-293-Zellen je Kavität einer 6-Kavitäten-Platte ausgesät und mit 2 ml DMEM-Komplettmedium für die Dauer von 2 h im Brutschrank kultiviert. Danach wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen mit 500 µl DMEM-Komplettmedium inkubiert. Anschließend wurden Proben aus einer gereinigten Viruspartikel-Suspension mit GTS-Puffer verdünnt und davon Aliquots á 1 µl, 2 µl, 5 µl, 10 µl und 20 µl je Kavität einer 6-Kavitäten-Platten appliziert. Jeweils eine Kavität blieb als

Kontrolle unbehandelt. Nach der Infektion wurden die Zellen im Schüttelinkubator bei 80 U / min und 37°C für die Dauer von 4 h inkubiert. Anschließend wurden 2,5 ml DMEM-Komplettmedium je Kavität einer 6-Kavitäten-Platte hinzugegeben und die Kultivierung im Brutschrank bis zum Erreichen des vollständigen zytopathischen Effekts fortgesetzt, der durch das Abrunden und Ablösen aller Zellen vom Plattenboden charakterisiert ist. Für diejenige Verdünnung einer gereinigten Viruspartikel-Suspension, die einen vollständigen zytopathischen Effekt der Zellen drei Tage nach der Infektion induzierte, wurde ein MOI-Wert von 10 als Konzentration der rekombinanten Viruspartikel gemäß den Angaben des Kit-Herstellers definiert. Die PFU- und MOI-Werte wurden durch die Analyse von Triplikaten der ausgewählten Verdünnungen einer gereinigten Viruspartikel-Suspension verifiziert.

2.14.1.9 Analyse der Replikationsdefizienz von rekombinanten Viruspartikeln

Für die Herstellung der rekombinanten Viruspartikel wurden HEK-293-Zellen eingesetzt, die die replikationsrelevanten Regionen E1 und E3 aus dem Genom des Adenovirus-Serumtyp 5 *per se* besitzen. Dadurch können HEK-293-Zellen nach der Transfektion mit rekombinanten adenoviralen Plasmiden, bei denen die replikationsrelevanten Regionen E1 und E3 deletiert sind, replikationsdefiziente Viruspartikel generieren. Zur Prüfung einer potentiellen Replikationsfähigkeit der hergestellten rekombinanten Viruspartikel wurden replikationsdefiziente HeLa-Zellen eingesetzt, deren Kultivierung in Kap. 2.10.2.2 (S. 61), beschrieben ist.

Für die Bestimmung einer potentiellen Replikationsfähigkeit wurden 10^6 HEK-293-Zellen je 10-cm-Petri-Schale mit 10 ml DMEM-Komplettmedium inkubiert und für die Dauer von 24 h im Brutschrank kultiviert. Danach erfolgte die Zugabe einer gereinigten Viruspartikel-Suspension mit 10^{10} Viruspartikeln. Nach der Infektion wurden die Zellen im Schüttelinkubator bei 80 U / min und 37°C für die Dauer von 4 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 10 ml DMEM-Agarose überschichtet und im Brutschrank kultiviert (siehe Kap. 2.14.1.6, S. 84). Nach einer Dauer von 25 Tagen erfolgte die Bestimmung der potentiellen Replikationsfähigkeit der rekombinanten Viruspartikel. Durch die lichtmikroskopische Analyse der Schalen wurde geprüft, ob während der Inkubation Plaques als Resultat von replikationskompetenten Viruspartikeln entstanden.

2.14.2 Adenovirale Infektion der humanen Skelettmuskelzellen

Für die Untersuchung der Interaktion von Rab11A und GLUT4myc in humanen Skelettmuskelzellen wurden proliferierende Myoblasten in 6-Kavitäten-Platten (10^5 Zellen je Kavität) mit 3 ml Wachstumsmedium oder in 10-cm-Petri-Schalen (10^6 Zellen) mit 10 ml Wachstumsmedium ausgesät und nach einer Wachstumsdauer von 96 h differenziert (siehe Kap. 2.10.2.1, S. 60). Die adenovirale Infektion der differenzierten Skelettmuskelzellen erfolgte mit AV-Rab11A, AV-Rab11A N124I bzw. AV-GLUT4myc oder dem nicht-rekombinanten Kontrollvirus AV-K am Tag 3 der Differenzierungsphase. Für die Einzel- und Coinfektionen wurden jeweils 100 PFU des entsprechenden Viruspartikel pro Zelle eingesetzt. Nach der Infektion wurden die Zellen im Schüttelinkubator bei 80 U / min und 37°C für die Dauer von 4 h inkubiert und anschließend für die Dauer von 48 h im Brutschrank kultiviert. Danach wurden die Zellen für die Analyse der Insulin-stimulierten Glucoseaufnahme bzw. Translokation von GLUT4myc eingesetzt oder zur Bestimmung der Protein-Überexpression lysiert.

2.15 Enzymatische Aktivität von Rab11A

Die Sequenzanalyse der Rab11A-cDNA aus H9c2-E2-Zellen ergab eine Punktmutation an der Position 209, die zu einem Aminosäure-Austausch (Q → R) an Position 70 von Rab11A führte. Diese Position ist für die enzymatische Aktivität der Rab-GTPasen, die die Hydrolyse von Guanosin-5'-triphosphat (GTP) in Guanosin-5'-diphosphat (GDP) und anorganisches Phosphat katalysieren, essentiell. Um den Einfluss der Aminosäure-Substitution auf die enzymatische Aktivität von Rab11A zu untersuchen, wurden die Fusionsproteine GST-Rab11A R70 (H9c2), GST-Rab11A Q70 (Wildtyp) und GST-Rab11A L70 (konstitutiv-aktive Variante) hergestellt und deren GTPase-Aktivität bestimmt (GTPase-Assay).

2.15.1 Herstellung von GST-Rab11A-Fusionsproteinen

2.15.1.1 Expression von GST-Rab11A-Fusionsproteinen

Für die Expression der Fusionsproteine GST-Rab11A L70, GST-Rab11A Q70 und GST-Rab11A R70 wurde zuerst die Rab11A-cDNA aus H9c2-Zellen (Rab11A R70) in den Expressionsvektor pGEX-5X-3 an das carboxyterminale Ende der Glutathion-S-transferase (GST)-cDNA inseriert (siehe Kap. 2.11.2.7, S. 70). Danach erfolgte die Herstellung der Expressionsvektoren pGEX-5X-3-Rab11A L70 und pGEX-5X-3-Rab11A Q70 durch die Mutation der klonierten Rab11A-cDNA mittels ortsgerechter Mutagenese-PCR

(siehe Kap. 2.11.2.2, S. 67). Anschließend wurden BL21-CodonPlus[®]-RP-Zellen mit den Expressionsvektoren transformiert und auf LB-Agar-Platten ausplattiert, die Ampicillin als Selektionsmarker enthielten (siehe Kap. 2.11.2.8, S. 72). Nach der Restriktionsanalyse der isolierten Plasmid-DNA aus Minipröp-Kulturen wurden Plasmid-DNA's von GST-Rab11A L70, GST-Rab11A Q70 und GST-Rab11A R70 mit korrekter Insertion ausgewählt und durch die Fa. Qiagen (Hilden) sequenziert.

Für die Expression der GST-Fusionsproteine wurde 2xYTA-Medium als Kulturmedium verwendet, das Ampicillin (100 µg / ml) als Selektionsmarker enthält. Zuerst wurden 5 ml Kulturmedium mit 5 µl einer ausgewählten Minipröp-Kultur versetzt und im Schüttelinkubator bei 270 U / min und 37°C über Nacht kultiviert. Anschließend wurden 2 ml aus dieser Bakteriensuspension mit 200 ml frischem Kulturmedium gemischt und im Schüttelinkubator bei 225 U / min und 30°C inkubiert, bis die Suspension eine optische Dichte (OD₆₀₀) von 0,6 bei einer Wellenlänge von 600 nm erreicht hatte (Dauer: ca. 3 h). Die Messung wurde mit Hilfe eines Spektrophotometers (DU[®] 650) durchgeführt. Danach erfolgte die Expressionsinduktion durch Zugabe von 200 µl IPTG-Lösung (100 mM in Aqua bidest. [steril]) und eine Fortsetzung der Kultivierung für die Dauer von 3 h. Anschließend wurden die Bakterienzellen mit Hilfe einer Sorvall[®]-Zentrifuge (RC 5Bplus / Rotor: GSA) bei 7700 x g und 4°C für die Dauer von 10 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Zellpellet mit 10 ml PBS resuspendiert, aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

2.15.1.2 Reinigung von GST-Rab11A-Fusionsproteinen

Die exprimierten Fusionsproteine GST-Rab11A L70, GST-Rab11A Q70 und GST-Rab11A R70 wurden mittels Glutathion-Sepharose-Affinitätschromatographie gereinigt. Dabei wird die Fähigkeit der Fusionsproteine genutzt, mit ihrer GST-Domäne an Sepharose-immobilisiertes Glutathion reversibel zu binden. Zuerst erfolgte die Solubilisierung der Bakterienzellen durch Ultraschall. Dazu wurden je 2,5 ml eines resuspendierten Zellpellets mit Hilfe eines Ultraschallgerätes (Labsonic U) viermal für die Dauer von 5 s sonifiziert. Durch die Zugabe von 25 µl Triton[®] X-100 (20 % [v/v] in PBS) mit einer nachfolgenden Inkubation für die Dauer von 30 min bei Raumtemperatur auf einem Rollenmischer wurde die Zellsolubilisierung fortgesetzt. Danach wurde das Zelllysats mit Hilfe einer Sorvall[®]-Zentrifuge (RC 5Bplus / Rotor: SS34) bei 7000 x g und 4°C für die Dauer von 30 min zentrifugiert und das Pellet verworfen.

Anschließend wurde der erhaltene Überstand mittels Glutathion-Sepharose-Affinitätschromatographie im Batch-Verfahren gereinigt. Dazu wurden 90 µl Glutathion-Sepharose 4B dreimal mit 2 ml PBS gewaschen und mit Hilfe einer Zentrifuge (Universal 30 RF / Rotor: 1412) bei 500 x g und 4°C für die Dauer von 5 min zentrifugiert. Nach der Mischung der vorgewaschenen Glutathion-Sepharose mit 90 µl PBS wurde das Zelllysate hinzugegeben und bei Raumtemperatur auf einem Rollenmischer für die Dauer von 2 h inkubiert. Anschließend wurde die Suspension in eine Poly-Prep-Chromatographie-Säule gefüllt und mit 3 ml PBS gewaschen, der mit dem Complete™ Proteasen-Inhibitoren-Cocktail supplementiert war. Die Elution der gebundenen GST-Rab11A-Fusionsproteine erfolgte durch die sukzessive Zugabe von dreimal 150 µl GST-Elutionspuffer, die nach der Elution vereint wurden. Nach der gelelektrophoretischen Analyse mit anschließender Immundetektion von Proben der gereinigten Proteinlösungen wurde die Bestimmung der enzymatischen Aktivität der GST-Rab11A-Fusionsproteine durchgeführt.

2.15.2 Bestimmung der enzymatischen Aktivität der GST-Rab11A-Fusionsproteine

Die Fusionsproteine GST-Rab11A L70, GST-Rab11A Q70 und GST-Rab11A R70 wurden zur Bestimmung ihrer enzymatischen Aktivität, der hydrolytischen Spaltung von Guanosin-5'-triphosphat (GTP) in Guanosin-5'-diphosphat (GDP) und anorganisches Phosphat, mit einem modifizierten Protokoll der Methode von Li *et al.* (2001) analysiert. Dazu wurden die GST-Rab11A-Varianten mit dem radioaktiv-markierten Substrat [γ -³²P]-GTP, dessen terminale Phosphatgruppe radioaktiv markiert war, inkubiert. Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität erfolgte durch die Quantifizierung der Menge von nicht-hydrolysiertem GST-Rab11A-gebundenem GTP (GTPase-Assay).

Für die Ermittlung der enzymatischen Aktivität wurden je 6 µg eines gereinigten, in GST-Elutionspuffer gelösten Fusionsproteins mit GTPase-Bindungspuffer gemischt (Finalvolumen 230 µl) und nach der Zugabe von 10 µM [γ -³²P]-GTP (0,1 µCi) für die Dauer von 15 min bei 30°C vorinkubiert. Nach der Mischung des Reaktionsansatzes mit 27 µl GTP (10 µM) wurde die Reaktion durch die Zugabe von 27 µl MgCl₂ (100 mM) gestartet. Unmittelbar danach (Zeitpunkt 0) wurden aus dem Reaktionsansatz 20 µl entnommen und auf ein Filterpapier (3MM-CHR Whatman®) getropft, das für die Dauer von 30 min bei Raumtemperatur getrocknet wurde. Nach 20 min, 40 min und 60 min wurden ebenfalls Aliquots á 20 µl entnommen, auf Filterpapiere getropft und getrocknet. Anschließend wurden die Filterpapiere viermal mit 200 µl GTPase-Waschpuffer für die Dauer von 10 min gewaschen

und 2 h bei Raumtemperatur getrocknet. Danach wurden die Filterpapiere in Poly-Q™-Szintillationsröhrchen gegeben und die gebundene Radioaktivität in Zerfällen pro Minute (cpm) mit Hilfe eines Universal-Gamma-Zählers (1282 Compugamma CS) ermittelt. Dazu wurde das Programm „ID:32P“ innerhalb der Parametergruppe 1 ausgewählt. Alle Proben wurden dreimal für die Dauer von 10 min gemessen und der Mittelwert (\pm SEM) berechnet. Reaktionsansätze ohne Magnesiumionen als Kofaktor der Hydrolyse dienten als Kontrollexperimente.

2.16 Insulin-stimulierte Glucoseaufnahme

Für die funktionelle Charakterisierung von Rab11A wurde die Insulin-stimulierte Glucoseaufnahme in Zellen der Ratten-Kardiomyoblasten-Zelllinie H9c2-E2 und in humanen Skelettmuskelzellen bestimmt, die sowohl den Glucosetransporter GLUT4myc als auch Rab11A überexprimierten.

2.16.1 Insulin-stimulierte Glucoseaufnahme in H9c2-E2-Zellen

Transfektion der H9c2-E2-Zellen

Für die Bestimmung der Insulin-stimulierten Glucoseaufnahme in H9c2-E2-Zellen wurden 10^5 Zellen je Kavität einer 6-Kavitäten-Platte ausgesät, mit 3 ml DMEM-Komplettmedium für die Dauer von 24 h im Brutschrank kultiviert und anschließend transient cotransfiziert (siehe Kap. 2.13, S. 78). Dabei wurden Zellen in jeweils drei Kavitäten pro Transfektions- und Stimulationssituation identisch transfiziert (Transfektionstriplikate). Anschließend erfolgte die Inkubation der transfizierten Zellen mit 3 ml DMEM-Komplettmedium für die Dauer von 48 h im Brutschrank.

Insulinstimulation der H9c2-E2-Zellen

Vor Beginn der Stimulation wurden die Zellen zweimal mit 2 ml PBS (37°C) gewaschen und mit 2 ml DMEM + 1 % (m/v) Zellkultur-BSA für die Dauer von 2,5 h im Brutschrank inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit 1 ml Transportpuffer (37°C) erfolgte die Stimulation der Zellen mit Insulin. Dazu wurde Schweine-Insulin in 1 N HCl gelöst, in Transportpuffer verdünnt und in einer Endkonzentration von 1 μ M je Kavität eingesetzt. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank für die Dauer von 30 min. Für die Bestimmung der Basalsituation wurden Zellen mit 1 ml Transportpuffer je Kavität inkubiert.

Zelluläre Aufnahme radioaktiv-markierter Glucose

Die radioaktiv-markierten Substanzen 2-Desoxy-D-[1-¹⁴C]-glucose (Spez. Aktivität: 61,0 Ci / mol) und L-[1-¹⁴C]-Glucose (Spez. Aktivität: 55,0 Ci / mol) wurden in Transportpuffer verdünnt. Zur Bestimmung der Insulin-stimulierten Glucoseaufnahme wurde 0,1 µCi 2-Desoxy-D-[1-¹⁴C]-glucose je Kavität hinzugegeben und die Zellen erneut für die Dauer von 30 min im Brutschrank inkubiert. Für die Ermittlung der unspezifischen Glucoseaufnahme wurde 0,1 µCi L-[1-¹⁴C]-Glucose je Kavität eingesetzt. Anschließend wurde der Zellüberstand verworfen und die Zellen mit einer eiskalten Cytochalasin B - Lösung (25 µM in PBS) zweimal gewaschen. Cytochalasin B zerstört das Aktin-Zytoskelett und inhibiert dadurch die Translokation des Glucosetransporters GLUT4 zur Plasmamembran.

Zellsolubilisierung und Messung der zellulär aufgenommenen Radioaktivität

Nach der Disruption der GLUT4-Translokation erfolgte die Zugabe von 1 ml 1 N NaOH je Kavität und die Inkubation in einem Wärmeschrank bei 70°C für die Dauer von 30 min. Anschließend wurden die Zellsuspensionen aus den Kavitäten in 1,5-ml-Reaktionsgefäße quantitativ überführt. Zur weiteren Durchführung der Bestimmung der Insulin-stimulierten Glucoseaufnahme wurden Poly-Q™-Szintillationsröhrchen mit je 10 ml AquaSafe 300 plus - Szintillationsflüssigkeit und 100 µl konzentrierter Essigsäure gefüllt. Danach wurden aus den 1,5-ml-Reaktionsgefäßen je 500 µl Zellsuspension in die Szintillationsröhrchen transferiert und stark geschüttelt. Die Bestimmung des radioaktiven Zerfalls pro Minute (cpm) der zellulär-aufgenommenen radioaktiv-markierten Glucose erfolgte mit Hilfe eines Flüssigszintillationsmessgerätes (Coulter LS 6000LL). Alle Proben wurden zweimal für die Dauer von 10 min gemessen und der Mittelwert (± SEM) der Transfektionstriplikate ermittelt. Proben nicht-transfizierter Zellen wurden als Kontrollen bestimmt. Als Leerwert-Kontrolle wurden Lösungen aus 10 ml AquaSafe 300 plus - Szintillationsflüssigkeit und 100 µl konzentrierter Essigsäure eingesetzt.

2.16.2 Insulin-stimulierte Glucoseaufnahme in humanen Skelettmuskelzellen

Zur Untersuchung der Insulin-stimulierten Glucoseaufnahme in humanen Skelettmuskelzellen wurden 10⁵ proliferierende Myoblasten je Kavität einer 6-Kavitäten-Platte ausgesät, differenziert und adenoviral coinfiziert (siehe Kap. 2.14.2, S. 88). Dabei wurden differenzierte Skelettmuskelzellen in jeweils drei Kavitäten pro Infektions- und Stimulationssituation identisch infiziert (Infektionstriplikate). Anschließend erfolgte die

Inkubation der infizierten Zellen mit 3 ml Differenzierungsmedium für die Dauer von 48 h im Brutschrank. Danach wurden die Zellen zweimal mit 2 ml PBS gewaschen und mit 2 ml FKS-freiem Differenzierungsmedium, das 1 % (m/v) Zellkultur-BSA enthielt, für die Dauer von 2 h im Brutschrank inkubiert.

Die weitere experimentelle Durchführung zur Bestimmung der Insulin-stimulierten Glucoseaufnahme in humanen Skelettmuskelzellen (Insulinstimulation – Zelllysis – Messung der radioaktiv-markierten Glucose) folgte dem Protokoll zur Bestimmung in H9c2-E2-Zellen (siehe Kap. 2.16.1, S. 91).

2.17 Insulin-stimulierte Translokation des Glucosetransporters GLUT4

Der Einfluss von Rab11A auf die Insulin-stimulierte Translokation des Glucosetransporters GLUT4 wurde sowohl in Zellen der Ratten-Kardiomyoblasten-Zelllinie H9c2-E2 als auch in humanen Skelettmuskelzellen untersucht. Nach der transienten Cotransfektion bzw. adenoviralen Coinfektion der Zellen wurde neben Rab11A eine modifizierte Form von GLUT4 überexprimiert, dessen cDNA durch eine Insertion von 14 Aminosäuren (AEEQKLISEEDLLK) der humanen c-myc-Region variiert war (GLUT4myc). Nach der Translokation der GLUT4myc-enthaltenden Membranvesikel und der Fusion mit der Plasmamembran wird das myc-Epitop in der ersten extrazellulären Schleife des Glucosetransporters GLUT4 exponiert, ohne die Aktivität des Transportproteins zu beeinträchtigen [Kanai *et al.*, 1993]. Durch den Einsatz eines anti-myc-Antikörpers und eines radioaktiv-markierten Sekundärantikörpers kann der Glucosetransporter GLUT4myc direkt in der Plasmamembran ohne Permeabilisierung immunodetektiert und quantifiziert werden.

2.17.1 Insulin-stimulierte Translokation von GLUT4myc in H9c2-E2-Zellen

Transfektion der H9c2-E2-Zellen

Für die Charakterisierung der Insulin-stimulierten Translokation von GLUT4myc in H9c2-E2-Zellen wurden 10^5 Zellen je Kavität einer 6-Kavitäten-Platte ausgesät, mit 3 ml DMEM-Komplettmedium für die Dauer von 24 h im Brutschrank kultiviert und anschließend transient cotransfiziert (siehe Kap. 2.13, S. 78). Dabei wurden Zellen in jeweils drei Kavitäten pro Transfektions- und Stimulationssituation identisch transfiziert (Transfektionstriplikate). Anschließend erfolgte die Inkubation der transfizierten Zellen mit 3 ml DMEM-Komplettmedium für die Dauer von 48 h im Brutschrank.

Insulinstimulation der H9c2-E2-Zellen

Vor Beginn der Stimulation wurden die Zellen zweimal mit 2 ml PBS (37°C) gewaschen und mit 2 ml DMEM + 1 % (m/v) Zellkultur-BSA für die Dauer von 2 h im Brutschrank inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit 1 ml Transportpuffer (37°C) erfolgte die Stimulation der Zellen mit Insulin. Dazu wurde Schweine-Insulin gelöst (siehe Kap. 2.16.1, S. 91), in Transportpuffer verdünnt und in einer Endkonzentration von 1 µM je Kavität appliziert. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank für die Dauer von 30 min. Für die Bestimmung der Basalsituation wurden Zellen mit 1 ml Transportpuffer je Kavität inkubiert.

Herstellung der Fixierlösung

Zur Herstellung der Fixierlösung wurde 1 g Paraformaldehyd in 49 ml PBS gelöst, auf 60°C erwärmt und mit einigen Tropfen einer 1 N NaOH-Lösung bis zur Klärung der Suspension versetzt. Anschließend wurde die Lösung mit einem Faltenfilter 597½ filtriert und der pH-Wert des Filtrats auf 7,4 bei Raumtemperatur eingestellt. Die Fixierlösung wurde am Vortag angesetzt, über Nacht bei 4°C aufbewahrt und unmittelbar vor Gebrauch auf Raumtemperatur erwärmt.

Zellfixierung und Antikörper-Inkubation

Nach dem Absaugen des Zellüberstandes wurden die Zellen mit 2 ml Fixierlösung je Kavität versetzt und bei Raumtemperatur für die Dauer von 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen viermal mit 2 ml PBS gewaschen und mit 2 ml Blockierlösung I je Kavität bei Raumtemperatur für die Dauer von 1 h versetzt. Nach dem Absaugen des Zellüberstandes wurde der anti-Myc-IgG-Antikörper 9E10 appliziert. Der Primärantikörper wurde 1:500 in Blockierlösung I verdünnt, davon wurden 600 µl (1,2 µg anti-Myc-IgG-Antikörper) je Kavität eingesetzt und die Zellen für die Dauer von 2 h auf einem Kippschüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der Überstand verworfen, erneut viermal mit 2 ml Blockierlösung I gewaschen und der ¹²⁵Iod-markierte anti-Maus-IgG-Antikörper (Spez. Aktivität: ≥ 750 Ci / mmol) eingesetzt. Dazu wurde der Sekundärantikörper in Blockierlösung I verdünnt und 1 ml ¹²⁵Iod-IgG-Antikörperlösung (0,2 µCi) je Kavität appliziert. Diese Inkubation wurde für die Dauer von 1 h auf einem Kippschüttler bei Raumtemperatur durchgeführt. Danach wurden die Zellen intensiv gewaschen: zweimal mit 2 ml Blockierlösung I, zweimal mit 2 ml PBS und abschließend dreimal mit 2 ml PBS-T je Kavität.

Zellsolubilisierung und Messung der Plasmamembran-gebundenen Radioaktivität

Die Zellen wurden nach dem Waschen durch die Zugabe von 1 ml SDS-Lösung (1 % [m/v] in Aqua bidest.) je Kavität für die Dauer von 1 h bei Raumtemperatur solubilisiert. Anschließend wurden die Zellsuspensionen in verschließbare Rundbodenröhrchen (Typ 55463) quantitativ transferiert und die Kavitäten mit je 1 ml PBS gewaschen, der danach in das entsprechende Röhrchen hinzugegeben wurde. Die Bestimmung der Plasmamembran-gebundenen Radioaktivität in Zerfällen pro Minute (cpm) wurde mit Hilfe eines Universal-Gamma-Zählers (1282 Compugamma CS) durchgeführt. Dazu wurde das Programm „ID:Myc“ innerhalb der Parametergruppe 1 ausgewählt. Alle Proben wurden zweimal für die Dauer von 10 min gemessen und der Mittelwert (\pm SEM) der Transfektionstriplikate ermittelt. Als Kontrolle wurden nicht-transfizierte H9c2-E2-Zellen eingesetzt.

2.17.2 Insulin-stimulierte Translokation von GLUT4myc in humanen Skelettmuskelzellen

Für die Bestimmung der Insulin-stimulierten Translokation von GLUT4myc in humanen Skelettmuskelzellen wurden 10^5 proliferierende Myoblasten je Kavität einer 6-Kavitäten-Platte ausgesät, differenziert und adenoviral coinfiziert (siehe Kap. 2.14.2, S. 88). Dabei wurden differenzierte Skelettmuskelzellen in jeweils drei Kavitäten pro Infektions- und Stimulationssituation identisch infiziert (Infektionstriplikate). Anschließend erfolgte die Inkubation der infizierten Zellen mit 3 ml Differenzierungsmedium für die Dauer von 48 h im Brutschrank. Danach wurden die Zellen zweimal mit 2 ml PBS gewaschen und mit 2 ml FKS-freiem Differenzierungsmedium, das 1 % (m/v) Zellkultur-BSA enthielt, für die Dauer von 2 h im Brutschrank inkubiert.

Alle weiteren experimentellen Schritte zur Bestimmung der Insulin-stimulierten Translokation von GLUT4myc in humanen Skelettmuskelzellen (Insulinstimulation – Antikörper-Inkubation – Messung der Plasmamembran-gebundenen Radioaktivität) erfolgten gemäß dem Protokoll zur Bestimmung in H9c2-E2-Zellen (siehe Kap. 2.17.1, S. 93).

2.18 Subzelluläre Lokalisation von GLUT4myc-enthaltenden Membranvesikeln

Um den Einfluss von Rab11A auf die subzelluläre Lokalisation von GLUT4myc-enthaltenden Membranvesikeln zu ermitteln, wurde die Gesamtmembran von transfizierten H9c2-E2-Zellen isoliert und mit Hilfe eines kontinuierlichen Saccharose-Dichtegradienten fraktioniert. Durch die Immundetektion der erhaltenen Gradientenschichten wurde die Verteilung von

GLUT4myc und Rab11A sowie von Markerproteinen verschiedener subzellulärer Kompartimente identifiziert.

Lysis und Homogenisation der Zellen

Zur Analyse der subzellulären Lokalisation von GLUT4myc-enthaltenden Membranvesikeln in H9c2-E2-Zellen wurden 10^6 Zellen pro 10-cm-Petri-Schale ausgesät und mit 10 ml DMEM-Komplettmedium für die Dauer von 24 h im Brutschrank kultiviert (siehe Kap. 2.10.2.2, S. 61). Anschließend erfolgte die transiente Cotransfektion der Zellen (siehe Kap. 2.13, S. 78), wobei pro Transfektionssituation Zellen in drei Schalen identisch transfiziert wurden (Transfektionstriplikate). Die transfizierten Zellen wurden mit 10 ml DMEM-Komplettmedium für die Dauer von 48 h im Brutschrank inkubiert, zweimal mit 10 ml PBS gewaschen und durch die Zugabe von 800 μ l HA-Puffer pro Schale lysiert. Die Inkubation erfolgte für die Dauer von 4 min, dabei standen die Schalen auf Eis. Danach wurden die erhaltenen Zelllysate mit Hilfe eines Zellschabers vom Schalenboden gelöst und in einen eisgekühlten Potter-Elvehjem-Homogenisator überführt, wobei die Zelllysate von Transfektionstriplikaten vereint wurden. Anschließend wurden die Schalen mit je 500 μ l HA-Puffer gewaschen und diese Suspensionen ebenfalls in den Homogenisator überführt. Die Gesamtsuspension wurde durch viermaliges Auf-und-Ab-Bewegen - verbunden mit leichtem Drehen des Teflonpistills - homogenisiert und danach in ein SS34-Zentrifugenröhrchen transferiert. Der Homogenisator wurde zweimal mit 400 μ l HA-Puffer gespült, diese Suspensionen ebenfalls in das Zentrifugenröhrchen überführt und das Gesamtvolumen des gesammelten Vollhomogenats bestimmt. Danach erfolgte die Zugabe von IA-Puffer mit einer Menge von 1/7 des Gesamtvolumens.

Präparation der Gesamtmembran

Die Zentrifugation des Vollhomogenats wurde mit Hilfe einer Sorvall[®]-Zentrifuge (RC 5Bplus / Rotor: SS34) bei $3000 \times g$ und 4°C für die Dauer von 10 min durchgeführt. Der erhaltene Überstand wurde in ein Ti50-Zentrifugenröhrchen überführt und anschließend mit Hilfe einer Ultrazentrifuge (Optima L-70 / Rotor: Ti50) bei $200000 \times g$ und 4°C für die Dauer von 2 h zentrifugiert. Danach wurde das entstandene Pellet, das die Gesamtmembran enthielt, in 200 μ l IA-Puffer resuspendiert, in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und mit Hilfe eines Plastehomogenisators durch fünfmaliges Auf-und-Ab-Bewegen homogenisiert. Der nach der Ultrazentrifugation erhaltene Überstand (Zytosol) wurde bei -20°C aufbewahrt.

Herstellung des kontinuierlichen Saccharose-Dichtegradienten

Für die Fraktionierung der Gesamtmembran wurde ein kontinuierlicher Saccharose-Dichtegradient (10 - 35 %) unmittelbar vor Gebrauch hergestellt. Dazu wurden zwei D-(+)-Saccharose-Lösungen (10 % [m/v] bzw. 35 % [m/v] in HA-Puffer) vorbereitet und jeweils 2 ml in die beiden Behälter eines Mini-Gradientenmischers gefüllt. Unter ständigem Rühren erfolgte die Herstellung des kontinuierlichen Saccharose-Dichtegradienten mit Hilfe einer Peristaltikpumpe (Minipuls 2). Die Gradientenlösung wurde in ein Ultra clear™-Zentrifugenröhrchen (Typ 344062) gepumpt und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C erschütterungsfrei aufbewahrt. Für die Bestimmung der Saccharose-Konzentration wurde das gesamte Volumen einer Kontroll-Gradientenlösung in 200- μ l-Aliquots portioniert und die Saccharose-Konzentration mit Hilfe eines Refraktometers ermittelt.

Fraktionierung der Gesamtmembran

Die Suspension der homogenisierten Gesamtmembran wurde auf die Lösung des kontinuierlichen Saccharose-Dichtegradienten (10 - 35 %) aufgetragen und mit Hilfe einer Ultrazentrifuge (Optima L-70 / Rotor: SW60) bei 40000 x g und 4°C für die Dauer von 17 h zentrifugiert. Danach wurden 200- μ l-Aliquots der Gradientenlösung aus dem Zentrifugenröhrchen vorsichtig entnommen (oben beginnend) und in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß transferiert. Diese Proben wurden mit Hilfe einer Zentrifuge (Universal 30 RF / Rotor: 1412) bei 14000 x g und 4°C für die Dauer von 1 h nochmals zentrifugiert. Anschließend wurden 180 μ l des erhaltenen Überstandes entnommen, die verbleibende Probe mit 4 μ l 6x-Laemmli-Probenpuffer versetzt und für die Dauer von 10 min bei 95°C denaturiert. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proben und dem Proteintransfer erfolgte die Analyse der subzellulären Lokalisation der GLUT4myc-enthaltenden Membranvesikel mittels Immundetektion (siehe Kap. 2.12, S. 74). Dabei wurden neben dem anti-GLUT4- bzw. anti-Rab11-Antikörper auch Antikörper verwendet, die gegen Markerproteine verschiedener subzellulärer Kompartimente gerichtet waren.

2.19 Berechnungsverfahren und Statistik

Alle biochemischen und funktionellen Messdaten sind als arithmetische Mittelwerte (\pm Standardfehler des Mittelwertes) der jeweiligen Anzahl von unabhängigen Einzelexperimenten dargestellt. Die Berechnungen der statistischen Signifikanzen erfolgten mit der Methode des zweiseitigen t-Tests nach Student oder mit der Varianzanalyse ANOVA für

gepaarte bzw. ungepaarte Daten und einem nachfolgenden Bonferroni-Test. Dazu wurden die Software-Programme t-ease (ISI, Philadelphia, PA, USA) bzw. Prism 3.02 (GraphPad, San Diego, CA, USA) verwendet. Das Signifikanzniveau wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ festgelegt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Klonierung von Rab11A- und GLUT4myc-cDNA

Die zelluläre Überexpression von Rab11A und GLUT4myc in Ratten-Kardiomyoblasten bzw. humanen Skelettmuskelzellen wurde unter Verwendung von rekombinanten Expressionsvektoren bzw. adenoviralen Infektionspartikeln durchgeführt, die die cDNA von Rab11A oder GLUT4myc enthielten. Dafür wurde die Rab11A-cDNA aus der isolierten Gesamt-RNA von Kardiomyoblasten generiert und amplifiziert. Die GLUT4myc-cDNA wurde aus dem Ausgangsplasmid pCXN2-GLUT4myc isoliert und umklont.

3.1.1 Isolation der Gesamt-RNA

Für die Transkription und Amplifikation sowie die Sequenzanalyse der Rab11A-cDNA wurde die Gesamt-RNA von jeweils 10^6 H9c2-Zellen bzw. H9c2-E2-Zellen, die den humanen Insulinrezeptor stabil überexprimierten, sowie aus frisch präparierten Ratten-Herzmuskelzellen isoliert. Dazu wurden die Zellen durch die Zugabe von TRIzol[®]-Lösung lysiert und die Gesamt-RNA aufgereinigt. Die Integrität der erhaltenen Gesamt-RNA wurde durch die Auftrennung der Gesamt-RNA in 18 S- und 28 S-RNA mittels denaturierender Agarose-Gelelektrophorese überprüft. In Abb. 4 ist die intakte Gesamt-RNA ohne Degradationsprodukte aus H9c2- bzw. H9c2-E2-Zellen sowie aus Ratten-Herzmuskelzellen gezeigt.

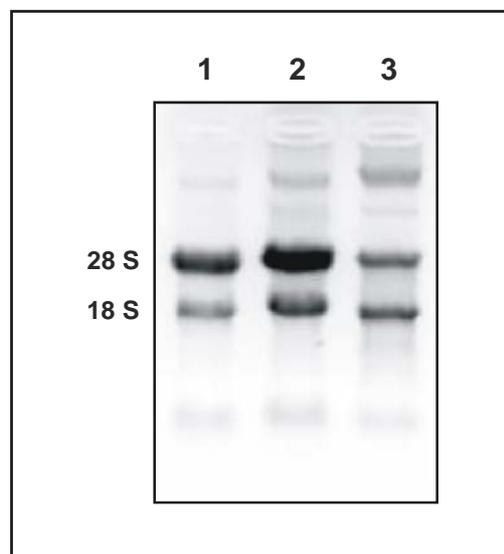


Abb. 4 Integrität der Gesamt-RNA aus H9c2- bzw. H9c2-E2-Zellen sowie aus Ratten-Herzmuskelzellen.

Inverse Darstellung der isolierten Gesamt-RNA aus H9c2-Zellen (1), H9c2-E2-Zellen (2) und Ratten-Herzmuskelzellen (3) in einem 1%igen Agarose-Gel nach denaturierender Gelelektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung.

3.1.2 Herstellung der Rab11A-cDNA

Die Transkription und Amplifikation der Rab11A-cDNA erfolgte aus der isolierten Gesamt-RNA von H9c2- bzw. H9c2-E2-Zellen sowie aus Ratten-Herzmuskelzellen mittels RT-PCR und Rab11A-spezifischen Primern, die eine Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease *Not*I enthielten. Zusätzlich wurde die Rab11A-cDNA aus kommerziell erworbener Gesamt-RNA von Rattenherz bzw. -leber sowie von Mausherz bzw. -leber generiert. Die entstandenen RT-PCR-Produkte, deren Länge 671 bps betrug, wurden mittels nativer Agarose-Gelelektrophorese analysiert. In Abb. 5 sind die entstandenen RT-PCR-Produkte aus den im Rahmen der vorliegenden Arbeit isolierten Gesamt-RNA-Proben dargestellt.

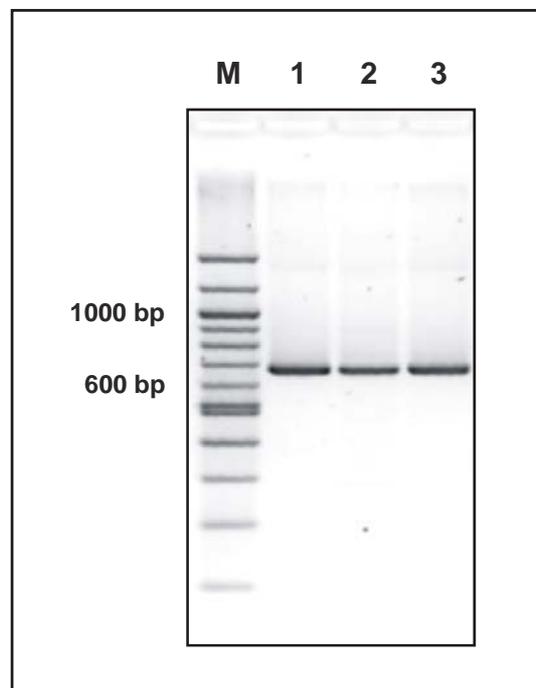


Abb. 5 RT-PCR-Amplifikation der Rab11A-cDNA.

Repräsentative inverse Darstellung der Rab11A-cDNA in einem 2%igen Agarose-Gel nach Gelelektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung. Isolierte Gesamt-RNA aus H9c2-Zellen (1), H9c2-E2-Zellen (2) und Ratten-Herzmuskelzellen (3) wurde mittels RT-PCR transkribiert und mit Rab11A-spezifischen Primern amplifiziert, die eine Restriktionsschnittstelle für *Not*I enthielten. (M, Marker DNA Ladder 100 bp).

3.1.3 Herstellung von pCMV-Rab11A

Durch den Restriktionsverdau der gereinigten RT-PCR-Produkte mit *Not*I entstanden Vektor-kompatible kohäsive Doppelstrang-Enden der Rab11A-cDNA, die die Ligation mit

dem linearisierten Expressionsvektor pCMV / Not I (3690 bps) ermöglichten. Nach der Transformation chemisch-kompetenter One Shot® TOP10-Zellen mit dem Ligationsprodukt und der Kultivierung individueller Klone wurde die Plasmid-DNA isoliert und analysiert. In Abb. 6 ist eine repräsentative Restriktionsanalyse von pCMV-Rab11A dargestellt, dessen Insert aus der isolierten Gesamt-RNA von H9c2-E2-Zellen generiert wurde. Für die Bestimmung der Gesamtlänge der Plasmid-DNA (4357 bps) und der korrekten Insertion (3690 bps + 659 bps) wurden spezifische Restriktionsendonukleasen verwendet.

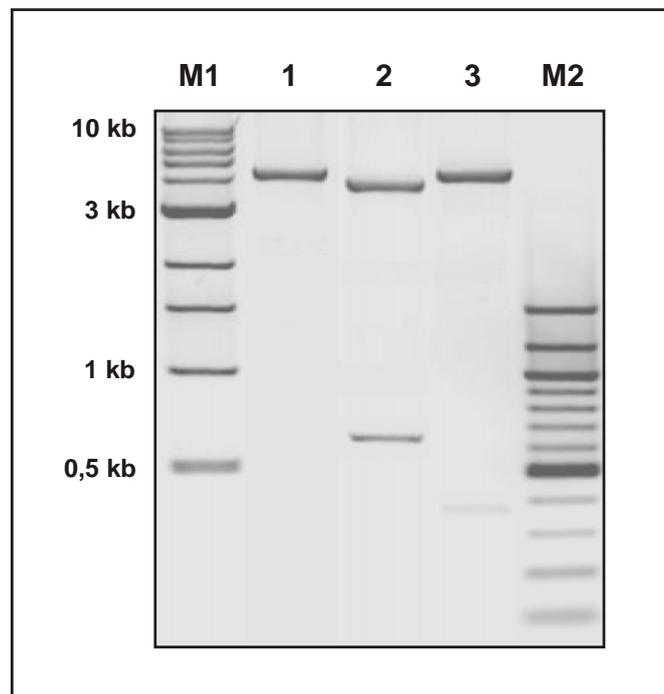


Abb. 6 Restriktionsanalyse von pCMV-Rab11A.

Repräsentative inverse Darstellung der Restriktionsverdau-Ergebnisse von pCMV-Rab11A in einem 1%igen Agarose-Gel nach Gelelektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung. Die Bestimmung der Gesamtlänge der Plasmid-DNA (1) erfolgte mit *Xho* I. Für die Insertkontrolle (2) wurde *Not* I eingesetzt und für die Orientierungskontrolle (3) wurden *Bst*X I und *Xho* I verwendet. (M1, Marker DNA Ladder 1 kb; M2, Marker DNA Ladder 100 bp).

Für die nachfolgende Sequenzbestimmung wurden jeweils fünf Plasmid-DNA's mit einer korrekten Insertion der Rab11A-cDNA ausgewählt, die aus der Gesamt-RNA von Ratten-Herzmuskelzellen, H9c2- bzw. H9c2-E2-Zellen oder aus der Gesamt-RNA von Rattenherz bzw. -leber oder Mausherz bzw. -leber generiert wurde. Bei der Sequenzbestimmung der Plasmid-DNA's wurde das Insert komplett in beiden Strangrichtungen sequenziert.

Die Auswertung der erhaltenen Elektropherogramme zeigte eine Punktmutation (A → G) der Rab11A-cDNA in allen Plasmid-DNA's, deren Rab11A-cDNA aus der isolierten Gesamt-RNA von H9c2- bzw. H9c2-E2-Zellen generiert wurde (siehe Abb. 7). Der Basenaustausch an der Position bp 209 der Rab11A-cDNA führt zu einer Aminosäure-Substitution (Q → R) an der Position 70 von Rab11A, die von zentraler Bedeutung bei der enzymatischen Aktivität der Rab-GTPase ist. Dieser Befund wurde ausschließlich in der Rab11A-cDNA aus Zellen der Ratten-Kardiomyoblasten-Zelllinie H9c2 bzw. H9c2-E2 erzielt und konnte in den anderen Rab11A-cDNA-Spezies, die aus den fünf zusätzlich untersuchten Gesamt-RNA-Proben generiert wurden, nicht nachgewiesen werden.

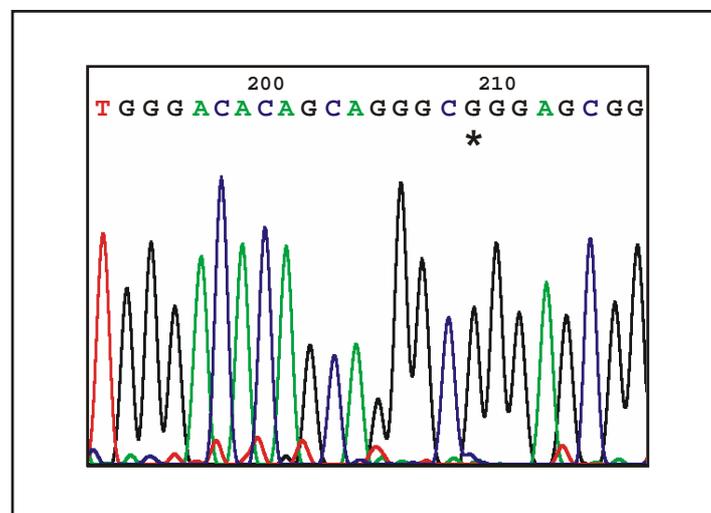


Abb. 7 Sequenzabschnitt der Rab11A-cDNA aus der Ratten-Kardiomyoblasten-Zelllinie H9c2.

Das Elektropherogramm zeigt den Sequenzabschnitt bp 193 - 216 (PM3-Motiv) der Rab11A-cDNA aus H9c2- bzw. H9c2-E2-Zellen mit der Punktmutation A → G an der Position bp 209 (*).

Für die Verifizierung der Mutation, die die einzige Variation in allen sequenzierten Plasmid-DNA's war, wurde die Gesamt-RNA von H9c2-E2-Zellen aus sechs verschiedenen Zellpassagen isoliert. Nach der Transkription und Amplifikation mittels RT-PCR sowie der Ligation, Transformation und Restriktionsanalyse der erhaltenen Plasmid-DNA's wurden jeweils sechs Plasmide mit korrekter Insertion der Rab11A-cDNA ausgewählt und sequenziert. Die Auswertung der Elektropherogramme bestätigte den Primärbefund der Mutation (A → G) an Position bp 209 der Rab11A-cDNA in allen sequenzierten Plasmiden.

Für die Bestimmung des Einflusses der Mutation auf die enzymatische Aktivität von Rab11A wurden die Fusionsproteine GST-Rab11A R70 (H9c2-E2), GST-Rab11A Q70 (Wildtyp) und GST-Rab11A L70 (konstitutiv-aktive Variante) hergestellt und deren GTPase-Aktivität bestimmt (siehe Kap. 3.2, S. 105).

3.1.4 Herstellung von pCMV-Rab11A N124I

Die cDNA der dominant-negativen Mutante Rab11A N124I wurde durch eine Punktmutation (A → T) an der Position bp 371 der Rab11A-cDNA mittels ortsgerichteter Mutagenese-PCR generiert. Die Mutagenese-PCR erfolgte mit pCMV-Rab11A (H9c2-E2) als Ausgangsplasmid und mit Mutagenese-PCR-Primern, die die interessierende Punktmutation enthielten. Nach dem Restriktionsverdau des nicht-mutierten Ausgangsplasmids wurden XL1-Blue-Zellen transformiert und die mutierte Plasmid-DNA von mehreren Klonen isoliert und sequenziert. Die Auswertung der Sequenzierung ergab, dass alle analysierten Plasmid-DNA's die interessierende Mutation besaßen und die übrige Sequenz der klonierten Rab11A-cDNA unverändert war.

Für die Durchführung der transienten Transfektion von H9c2-E2-Zellen mit pCMV-Rab11A N124I wurde ein sequenziertes Plasmid ausgewählt und mittels Maxipräparation amplifiziert. Anschließend erfolgte die Reinigung der Plasmid-DNA und die Resuspension des gereinigten Pellets mit Endotoxin-freiem Wasser.

3.1.5 Herstellung von pCMV-GLUT4myc

Für die Herstellung von pCMV-GLUT4myc wurde die GLUT4myc-cDNA aus dem Ausgangsplasmid pCXN2-GLUT4myc isoliert, das von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. A. Klip (The Hospital for Sick Children, Toronto, CAN) freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde. Nach der Reinigung wurde die GLUT4myc-cDNA (2128 bps) in den linearisierten Expressionsvektor pCMV / Not I (3690 bps) ligiert. Danach wurden chemisch-kompetente One Shot® TOP10-Zellen transformiert und die Plasmid-DNA individueller Klone isoliert. Die Gesamtlänge der Plasmid-DNA (5818 bps) und die korrekte Insertion (3690 bps + 2128 bps) wurden durch den Einsatz spezifischer Restriktionsendonukleasen bestimmt (siehe Abb. 8, S. 105).

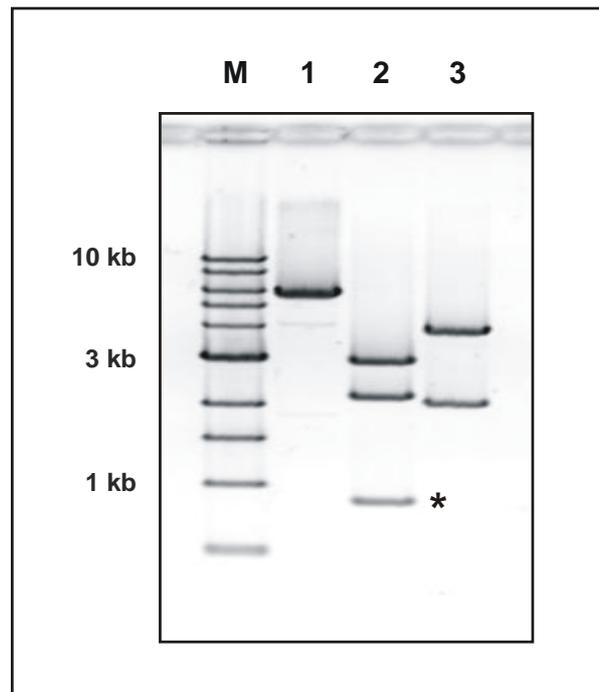


Abb. 8 Restriktionsanalyse von pCMV-GLUT4myc.

Inverse Darstellung der Restriktionsverdau-Ergebnisse von pCMV-GLUT4myc in einem 1%igen Agarose-Gel nach Gelelektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung. Die Bestimmung der Gesamtlänge der Plasmid-DNA (1) erfolgte mit *Xho*I. Für die Insertkontrolle (2) wurde *Eco*RI eingesetzt und für die Orientierungskontrolle (3) wurde *Hind*III verwendet. (M, Marker DNA Ladder 1 kb).

Anm.: Die zusätzliche Bande (*) entstand durch eine intrinsische Restriktionsschnittstelle von *Eco*RI in der Sequenz des pCMV-Vektors.

Nach der Sequenzierung mehrerer Plasmid-DNA's wurde ein Plasmid mit korrekter GLUT4myc-Sequenz ausgewählt und mittels Maxipräparation amplifiziert. Anschließend erfolgte die Reinigung der Plasmid-DNA und die Resuspension des gereinigten Pellets mit Endotoxin-freiem Wasser für die Verwendung bei der transienten Transfektion von H9c2-E2-Zellen.

3.2 Enzymatische Aktivität von Rab11A

Bei der Sequenzierung der klonierten Rab11A-cDNA aus Zellen der verwendeten Ratten-Kardiomyoblasten-Zelllinie H9c2 bzw. H9c2-E2 wurde ein Basenaustausch (A → G) an der Position bp 209 der Rab11A-cDNA festgestellt, der zu einer Aminosäure-Substitution (Q → R) an der Position 70 innerhalb des katalytisch-aktiven PM3-Motivs von Rab11A führt. Um den Einfluss dieser Aminosäure-Substitution auf die enzymatische Aktivität der

Rab-GTPase zu untersuchen, wurden die Varianten Rab11A R70 (H9c2-E2), Rab11A Q70 (Wildtyp) bzw. Rab11A L70 (konstitutiv-aktive Variante) als Fusionsproteine mit Hilfe des Glutathion-S-transferase (GST)-Expressionssystems hergestellt. Nach der affinitätschromatographischen Reinigung der GST-Rab11A-Fusionsproteine wurde die GTPase-Aktivität der Rab11A-Varianten ermittelt (GTPase-Assay).

3.2.1 Herstellung des Expressionsvektors pGEX-5X-3-Rab11A R70

Für die Expression der Fusionsproteine GST-Rab11A L70, GST-Rab11A Q70 und GST-Rab11A R70 wurde die Rab11A-cDNA aus H9c2-E2-Zellen (Rab11A R70) in den bakteriellen Expressionsvektor pGEX-5X-3 ligiert. Anschließend wurden chemisch-kompetente One Shot[®] TOP10-Zellen mit dem Ligationsprodukt transformiert und die Kultivierung von mehreren Klonen durchgeführt. Nach der Präparation der Plasmid-DNA von pGEX-5X-3-Rab11A R70 erfolgte die Restriktionsanalyse. Für die Bestimmung der Gesamtlänge der Plasmid-DNA (5641 bps) und der korrekten Insertion (4974 bps + 667 bps) wurden spezifische Restriktionsendonukleasen eingesetzt (siehe Abb. 9).

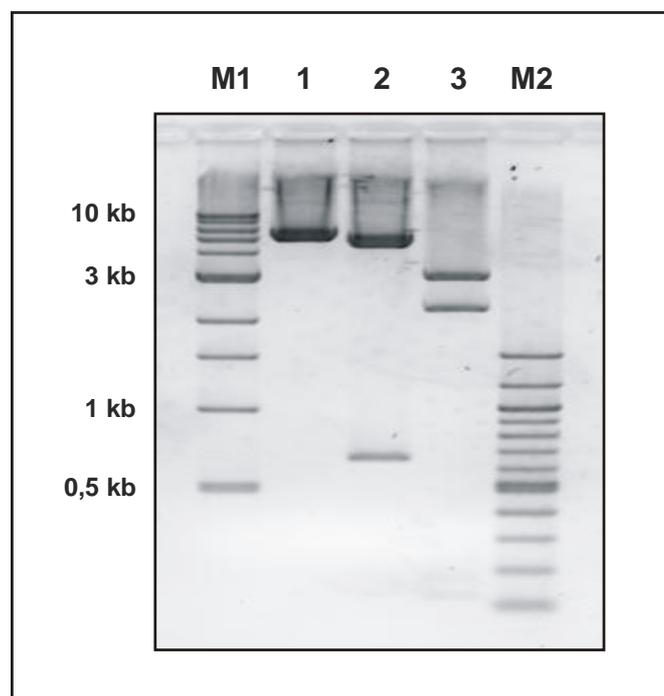


Abb. 9 Restriktionsanalyse von pGEX-5X-3-Rab11A R70.

Repräsentative inverse Darstellung der Restriktionsverdau-Ergebnisse von pGEX-5X-3-Rab11A R70 in einem 1,5%igen Agarose-Gel nach Gelelektrophorese und Ethidiumbromid-

Färbung. Die Bestimmung der Gesamtlänge der Plasmid-DNA (1) erfolgte mit *Xho*I. Für die Insertkontrolle (2) wurde *Not*I eingesetzt und für die Orientierungskontrolle (3) wurden *Bst*X I und *Xho*I verwendet. (M1, Marker DNA Ladder 1 kb; M2, Marker DNA Ladder 100 bp).

3.2.2 Herstellung der Expressionsvektoren pGEX-5X-3-Rab11A L70 und -Rab11A Q70

Für die Herstellung der beiden Varianten von GST-Rab11A, GST-Rab11A L70 und GST-Rab11A Q70, wurde das Ausgangsplasmid pGEX-5X-3-Rab11A R70 mittels Mutagenese-PCR und komplementären Primern amplifiziert, die die spezifischen Punktmutationen (R70L: G → T / R70Q: G → A) enthielten. Nach dem Restriktionsverdau der nicht-mutierten Ausgangsplasmide wurden XL1-Blue-Zellen mit dem Produkt der Restriktionsverdau-Experimente transformiert, kultiviert und die Plasmid-DNA individueller Klone isoliert. Zur Verifizierung der Mutagenese-PCR an der Position bp 209 der klonierten Rab11A-cDNA wurden jeweils vier Plasmide sequenziert. Die Auswertung der Sequenzierung ergab, dass die analysierten Plasmide die interessierende Mutation (R70L: G → T / R70Q: G → A) besaßen und die übrige Sequenz der klonierten Rab11A-cDNA unverändert war.

3.2.3 Expression der GST-Rab11A-Fusionsproteine

Für die Expression der GST-Rab11A-Fusionsproteine wurden chemisch-kompetente BL21-CodonPlus[®]-RP-Zellen mit den Expressionsvektoren pGEX-5X-3-Rab11A L70, -Rab11A Q70 und -Rab11A R70 transformiert. Anschließend wurden mehrere Klone kultiviert, die Plasmid-DNA isoliert und die Gesamtlänge der erhaltenen Plasmid-DNA bestimmt (siehe Abb. 10, S. 108).

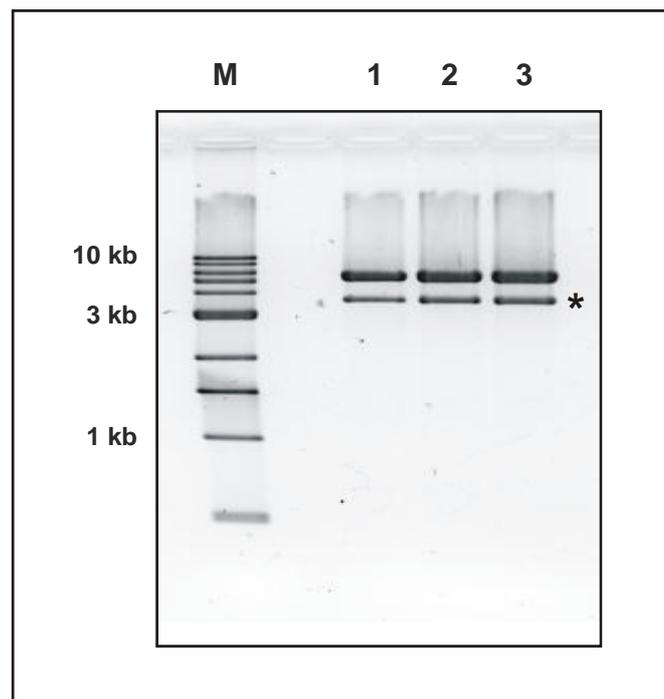


Abb. 10 Restriktionsanalyse von pGEX-5X-3-Rab11A L70, -Rab11A Q70 und -Rab11A R70.

Inverse Darstellung der Restriktionsverdau-Ergebnisse von pGEX-5X-3-Rab11A L70 (1), -Rab11AQ70 (2) und -Rab11A R70 (3) in einem 1,5%igen Agarose-Gel nach Gelelektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung. Die Bestimmung der Gesamtlänge der Plasmid-DNA's erfolgte mit *EcoR* I. (M, Marker DNA Ladder 1 kb).

Anm.: Die zusätzliche Bande (*) entstand durch den Restriktionsverdau von pACYC-RP, das in BL21-CodonPlus®-RP-Zellen endogen enthalten ist.

3.2.4 Reinigung der GST-Rab11A-Fusionsproteine

Nach der Expression der GST-Rab11A-Fusionsproteine in Maxipräparation-Kulturen und der Solubilisierung der Bakterienzellen durch Ultraschall wurden die erhaltenen Zelllysate mittels Glutathion-Sepharose-Affinitätschromatographie im Batch-Verfahren gereinigt. Dabei binden die Fusionsproteine mit der GST-Region hochaffin an Sepharose-immobilisiertes Glutathion und werden anschließend eluiert. Die Immundetektion der erhaltenen Zelllysate und der Eluate mit den gereinigten Fusionsproteinen GST-Rab11A L70, GST-Rab11A Q70 bzw. GST-Rab11A R70 (50 kDa) sowie von Rab11 (24 kDa) aus kardialer Ratten-Mikrosomalmembran als Kontrolle ist in Abb. 11 (S. 109) dargestellt.

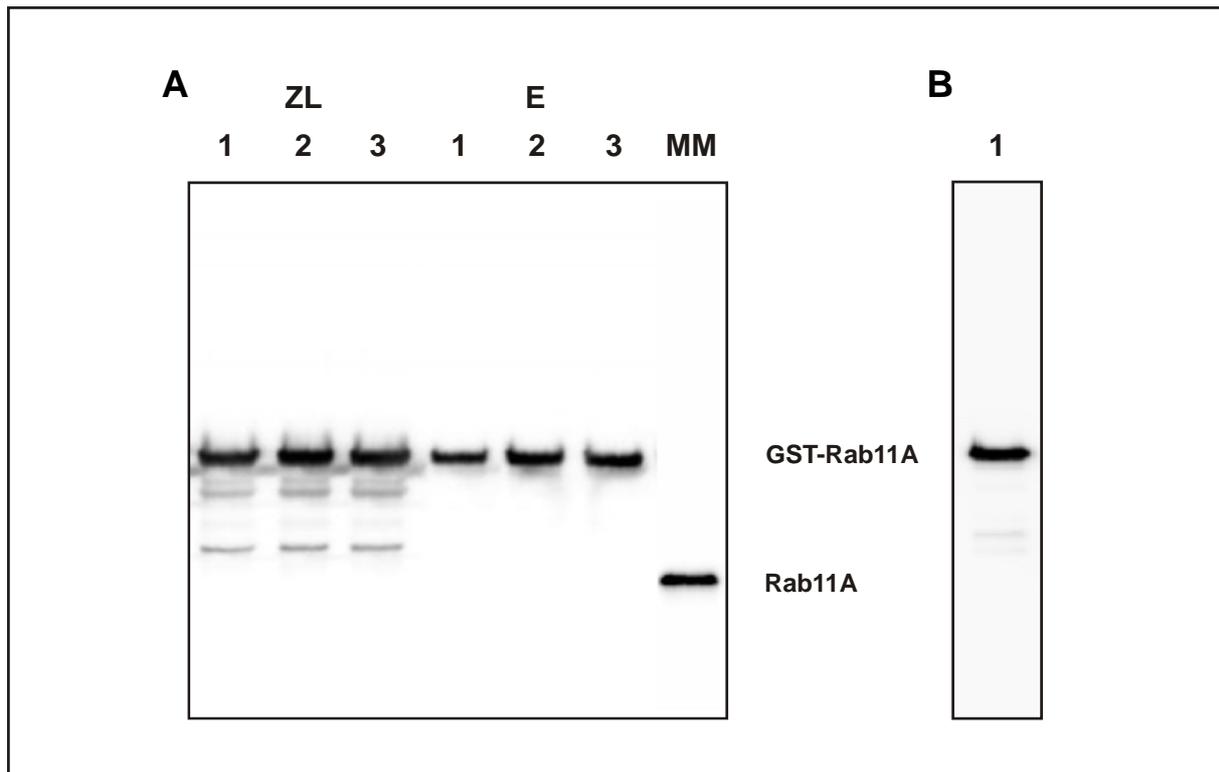


Abb. 11 Reinigung von GST-Rab11A-Fusionsproteinen.

Immundetektion der Fusionsproteine GST-Rab11A L70 (1), GST-Rab11A Q70 (2) und GST-Rab11A R70 (3) nach SDS-PAGE (8 - 18 %) und Proteintransfer. **A:** Zelllysate (je 20 µg Protein) und Eluate nach Aufreinigung mittels Glutathion-Sepharose-Affinitätschromatographie (je 0,5 µg Protein) mit anti-Rab11-Antikörper. **B:** Eluat von GST-Rab11A L70 (0,5 µg Protein) mit anti-GST-Antikörper. (E, Eluat; MM, kardiale Ratten-Mikrosomalmembran; ZL, Zelllysat).

3.2.5 Bestimmung der enzymatischen Aktivität von Rab11A-Fusionsproteinen

Die enzymatische Aktivität der gereinigten Fusionsproteine GST-Rab11A L70, GST-Rab11A Q70 und GST-Rab11A R70, die zur Hydrolyse von Guanosin-5'-triphosphat in Guanosin-5'-diphosphat und anorganisches Phosphat führt, wurde mittels GTPase-Assay bestimmt. Nach der Vorinkubation der GST-Fusionsproteine mit [γ - 32 P]GTP und der Applikation von GTP erfolgte der Start der enzymatischen Hydrolyse durch die Zugabe von Magnesiumionen als Cofaktor der Reaktion. Zu definierten Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen, auf Filterpapier transferiert und die Filterpapier-assoziierte Radioaktivität gemessen. Die ermittelte Radioaktivität zum Zeitpunkt 0 wurde als 100 % definiert und die enzymatische Aktivität der GST-Rab11A-Fusionsproteine als prozentualer Anteil bezüglich der initialen Bindung von GST-Rab11A und [γ - 32 P]GTP ermittelt (siehe Abb. 12 , S. 110).

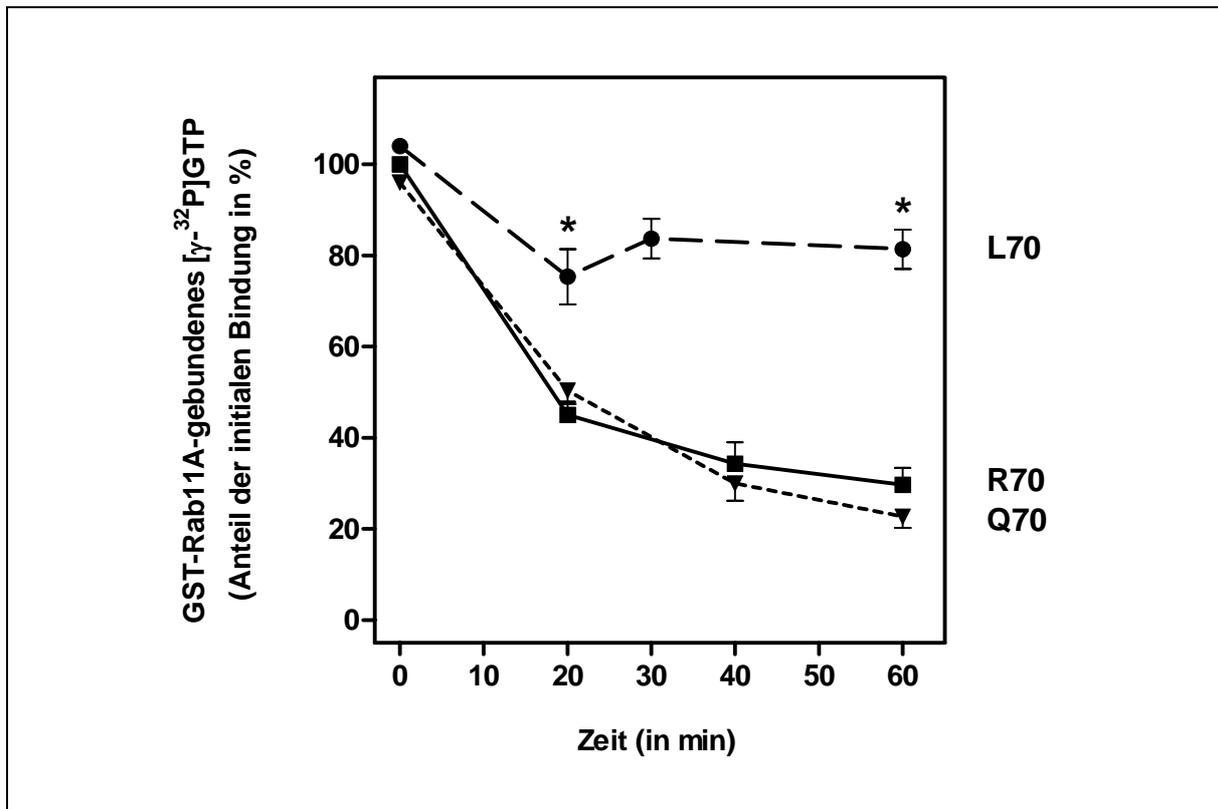


Abb. 12 Enzymatische Aktivität von GST-Rab11A-Fusionsproteinen.

Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Fusionsproteine GST-Rab11A L70, GST-Rab11A Q70 und GST-Rab11A R70 als Anteil an der initialen Bindung (100 %) von GST-Rab11A-Fusionsprotein und $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SEM) aus vier verschiedenen Einzelexperimenten. * Signifikant verschieden vs. GST-Rab11A Q70 bzw. R70 ($p < 0,05$).

Die Ergebnisse des GTPase-Assays zeigten, dass $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ durch GST-Rab11A L70 nicht hydrolysiert wurde, da die gemessene Radioaktivität als quantitatives Maß für die Bindung von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ und GST-Rab11A L70 nach einer initialen Abnahme für die Dauer von 60 min konstant blieb. Die Varianten GST-Rab11A Q70 und GST-Rab11A R70 besaßen eine gleichartige enzymatische Aktivität, die signifikant verschieden zu GST-Rab11A L70 war ($p < 0,05$). Als Kontrollexperimente dienten Reaktionsansätze mit GST-Rab11A L70, GST-Rab11A Q70 bzw. GST-Rab11A R70, die ohne Magnesiumionen als Kofaktoren der enzymatischen Hydrolyse inkubiert wurden. Die gemessene Radioaktivität der Kontrollproben zu den definierten Zeitpunkten war nicht-signifikant verschieden zu den entsprechenden Proben der konstitutiv-aktiven Variante GST-Rab11A L70 ($p > 0,05$).

Somit belegen die Ergebnisse des GTPase-Assays, dass die in H9c2- bzw. H9c2-E2-Zellen vorkommende Punktmutation der Rab11A-cDNA an der Position bp 209, die zu einer Aminosäure-Substitution (Q → R) an der Position 70 im PM3-Motiv des katalytischen Zentrums von Rab11A führt, keinen Einfluss auf die enzymatische Aktivität von Rab11A besitzt. Außerdem wurde die Aminosäure-Substitution Q → L als prinzipieller Mutationstyp der konstitutiv-aktiven Variante von Rab-Proteinen sowie aller Kleinen GTP-bindenden Proteine bestätigt.

3.3 Transiente Transfektion von H9c2-E2-Zellen

Die Zellen der Ratten-Kardiomyoblasten-Zelllinie H9c2-E2 wurden mit pCMV-GLUT4myc und pCMV-Rab11A bzw. pCMV-Rab11A N124I oder pCMV ohne Insert als Kontrollvektor transient cotransfiziert, um nach der Überexpression der Proteine den Einfluss von Rab11A auf die Insulin-stimulierte Glucoseaufnahme und Translokation von GLUT4myc zur Plasmamembran zu untersuchen. Außerdem erfolgte die transiente Cotransfektion der H9c2-E2-Zellen für die Analyse der subzellulären Lokalisation von GLUT4myc-enthaltenden Membranvesikeln.

H9c2-E2-Zellen wurden 24 h nach ihrer Aussaat mit einem Transfektionsgemisch inkubiert, das das Transfektionsreagenz FuGENE 6 und die interessierenden rekombinanten pCMV-Expressionsvektoren oder den Kontrollvektor pCMV in definierten Mengen enthielt. Nach einer Expressionsdauer von 24 - 72 h wurden die Zellen lysiert und das Expressionsniveau der interessierenden Proteine mittels Immundetektion nach SDS-PAGE und Proteintransfer analysiert. Die Optimierung der Transfektionsbedingungen, insbesondere das Verhältnis zwischen dem Volumen des Transfektionsreagenz und der eingesetzten Masse der Expressionsvektoren sowie die Expressionsdauer, ist in Abb. 13 (S. 112) repräsentativ dargestellt.

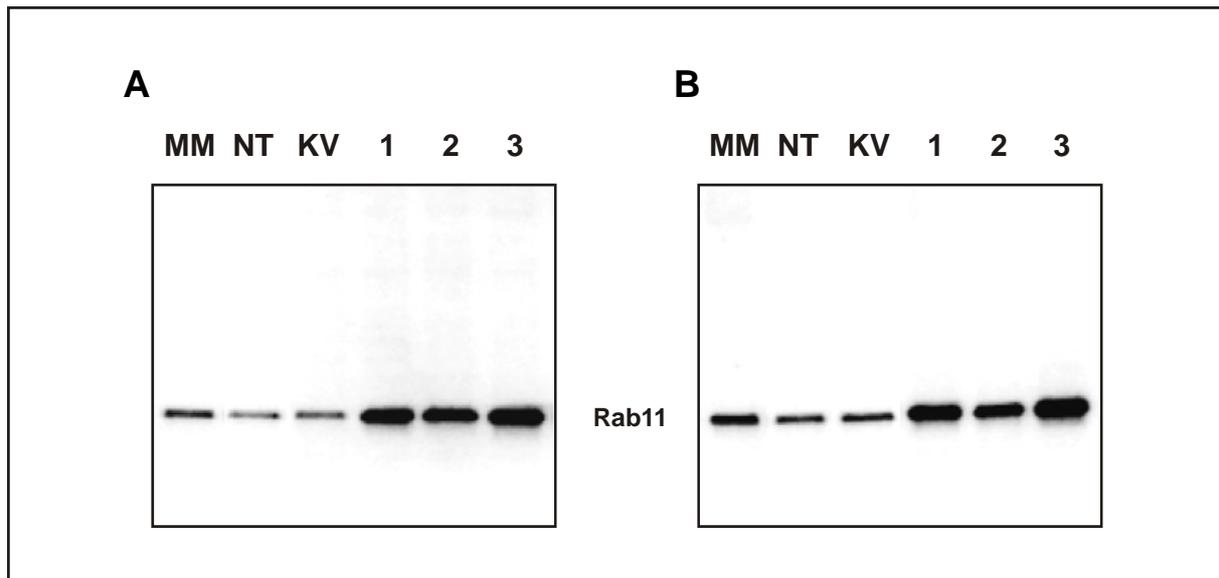


Abb. 13 Optimierung der transienten Transfektion von H9c2-E2-Zellen.

Immundetektion von Rab11 mit anti-Rab11-Antikörper nach transienter Transfektion von H9c2-E2-Zellen mit 6 μ l bzw. 12 μ l FuGENE 6-Transfektionsreagenz sowie gleicher Mengen pCMV-Rab11A und pCMV (je 0,5 μ g) in den Verhältnissen 6:1 (1), 6:2 (2) bzw. 12:2 (3). Nach der Transfektion und einer weiteren Kultivierung erfolgte die SDS-PAGE (8 - 18 %) der Zelllysate und der Proteintransfer. **A:** Expressionsdauer 48 h (je 10 μ g Protein). **B:** Expressionsdauer 72 h (je 20 μ g Protein). (KV, Kontrollvektor pCMV; MM, kardiale Ratten-Mikrosomalmembran; NT, nicht-transfizierte H9c2-E2-Zellen).

Die Immundetektion der Zelllysate von H9c2-E2-Zellen, die mit verschiedenen Mengenverhältnissen des Transfektionsreagenz FuGENE 6 und der Expressionsvektoren pCMV-Rab11A und pCMV transient cotransfiziert und danach unterschiedlich lang kultiviert wurden, zeigte eine maximale Überexpression von Rab11A (24 kDa) bei einem Verhältnis von 12 μ l Transfektionsreagenz und einer Masse der Expressionsvektoren von insgesamt 2 μ g (je 1 μ g pCMV-Rab11A bzw. pCMV) sowie einer Expressionsdauer von 48 h. Diese Transfektionsbedingungen waren ebenfalls optimal für die transiente Cotransfektion der H9c2-E2-Zellen mit pCMV-Rab11A N124I bzw. pCMV-GLUT4myc und wurden deshalb als Standard für alle durchgeführten transienten Cotransfektionen gewählt.

In Abb. 14 (S. 113) ist die Immundetektion von Rab11 nach transienter Cotransfektion von H9c2-E2-Zellen mit pCMV-GLUT4myc und pCMV-Rab11A bzw. pCMV-Rab11 N124I unter Standard-Transfektionsbedingungen dargestellt.

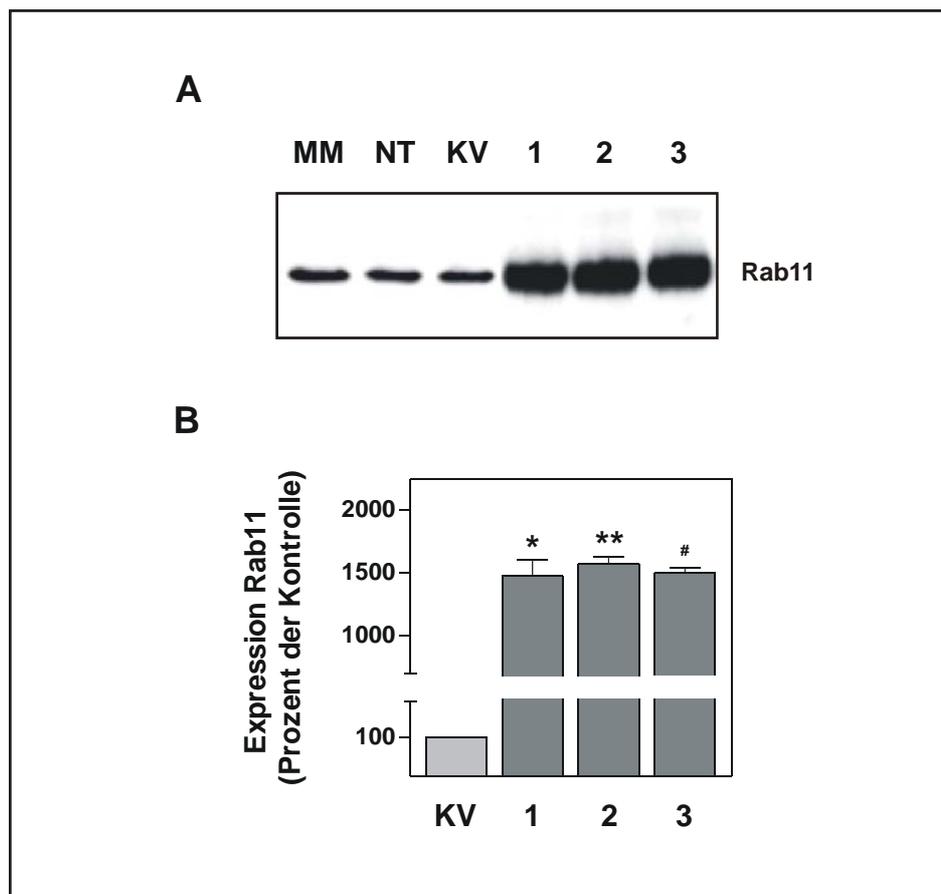


Abb. 14 Überexpression von Rab11A und Rab11A N124I in H9c2-E2-Zellen.

A: Repräsentative Darstellung der Immundetektion von Rab11 mit anti-Rab11-Antikörper nach transienter Cotransfektion von H9c2-E2-Zellen mit pCMV-GLUT4myc und pCMV-Rab11A (1), pCMV-Rab11A N124I (2) bzw. pCMV und pCMV-Rab11A (3). Nach der Transfektion und einer weiteren Kultivierung für die Dauer von 48 h erfolgte die SDS-PAGE (8 - 18 %) der Zelllysate (je 10 µg Protein) und der Proteintransfer. **B:** Prozentuale Darstellung der Chemilumineszenz als BLU-Mittelwert (\pm SEM) aus vier verschiedenen Einzelexperimenten. * Signifikant verschieden vs. KV-Transfektion ($p < 0,001$); ** signifikant verschieden vs. KV-Transfektion ($p < 0,001$); # signifikant verschieden vs. KV-Transfektion ($p < 0,001$). (KV, Kontrollvektor pCMV; MM, kardiale Ratten-Mikrosomalmembran; NT, nicht-transfizierte H9c2-E2-Zellen).

Die Quantifizierung der detektierten Chemilumineszenz, die als BLU-Signal gemessen wurde, ergab eine prozentuale Steigerung des Expressionsniveaus sowohl von Rab11A als auch Rab11A N124I im Vergleich zu der Menge von Rab11 in nicht-transfizierten H9c2-E2-Zellen um durchschnittlich 1400 % (siehe Abb. 14 B). Der Unterschied zwischen der Expression von Rab11A und Rab11A N124I war nicht signifikant ($p > 0,05$).

Die Überexpression von GLUT4myc (45 kDa) nach transients Cotransfektion von H9c2-E2-Zellen mit pCMV-GLUT4myc und pCMV-Rab11A bzw. pCMV-Rab11A N124I oder pCMV als Kontrollvektor unter Standard-Transfektionsbedingungen ist in Abb. 15 gezeigt. Die GLUT4myc-Proteine wurden sowohl mit anti-GLUT4-Antikörper (siehe Abb. 15 A) als auch mit anti-myc-Antikörper (siehe Abb. 15 B) immundetektiert. Die Quantifizierung der gemessenen Chemilumineszenz nach der Immundetektion mit anti-GLUT4-Antikörper (GLUT4myc + Rab11A: 71852 ± 6320 BLU; GLUT4myc + Rab11A N124I: 67454 ± 5411 BLU; GLUT4myc + pCMV: 76129 ± 5974 BLU) ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den unterschiedlichen Cotransfektionen ($p > 0,05$). Aufgrund der sehr geringen endogenen Expression von GLUT4 in H9c2-E2-Zellen, deren detektierte Chemilumineszenz nach der Immundetektion mit anti-GLUT4-Antikörper nicht quantifiziert werden konnte, wurde auf die Angabe der prozentualen Steigerung des Expressionsniveaus von GLUT4myc nach transients Cotransfektion verzichtet.

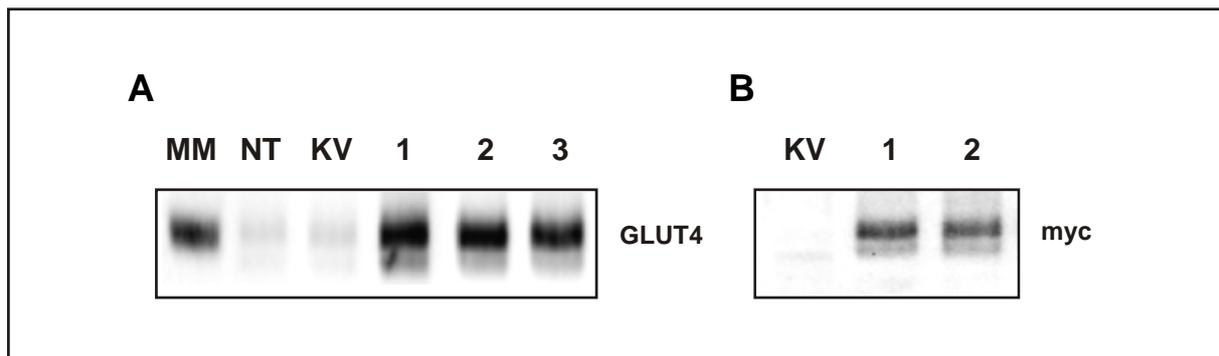


Abb. 15 Überexpression von GLUT4myc in H9c2-E2-Zellen.

Immundetektion von GLUT4myc nach transients Cotransfektion von H9c2-E2-Zellen mit pCMV-GLUT4myc und pCMV-Rab11A (1), pCMV-Rab11A N124I (2) bzw. pCMV (3). Nach der Transfektion und einer weiteren Kultivierung für die Dauer von 48 h erfolgte die SDS-PAGE (8 - 18 %) der Zelllysate (je 10 μ g Protein) und der Proteintransfer. **A:** Immundetektion mit anti-GLUT4-Antikörper. **B:** Immundetektion mit anti-myc-Antikörper. (KV, Kontrollvektor pCMV; MM, kardiale Ratten-Mikrosomalmembran; NT, nicht-transfizierte H9c2-E2-Zellen).

Innerhalb der Phosphatidylinositol-3 (PI3)-Kinase-vermittelten Insulinsignalkaskade stellt die Proteinkinase B (Akt) ein entscheidendes Effektorprotein dar, das auch an der Translokation von GLUT4-Speichervesikeln zur Plasmamembran in Muskel- und Fettzellen direkt beteiligt ist. Nach einer Insulinstimulation ist die Akt in Insulin-sensitiven GLUT4-Speichervesikeln

lokalisiert und wird mit dieser Vesikelpopulation entlang des Aktin-Zytoskeletts zur Plasmamembran transloziert. Zur Analyse einer möglichen Interaktion von Rab11A oder der dominant-negativen Mutante Rab11A N124I mit der Signaltransduktion der Akt oder anderer, proximal agierender Signalproteine der PI3-Kinase-vermittelten Insulinsignalkaskade wurde die Insulin-induzierte Phosphorylierung der Akt nach der Überexpression von Rab11A bzw. Rab11A N124I in H9c2-E2-Zellen ermittelt (siehe Abb. 16 A, S. 116).

Die Normierung der quantifizierten Chemilumineszenz (BLU-Mittelwerte) gegenüber der Insulin-stimulierten Kontrolle ergab keinen signifikanten Unterschied der Akt-Phosphorylierung im Vergleich zu Lysaten Insulin-stimulierter Zellen, die GLUT4myc und Rab11A bzw. Rab11A N124I überexprimierten (siehe Abb. 16 B, S. 116). Damit kann eine Interaktion von Rab11A bei der Insulinsignaltransduktion der Akt oder anderer, proximal agierenden Signalproteine ausgeschlossen werden.

3.4 Adenovirale Infektion von humanen Skelettmuskelzellen

Für die Analyse der Funktion von Rab11A in Insulin-sensitiven Zellen wurden humane Skelettmuskelzellen verwendet. Durch den Einsatz rekombinanter adenoviraler Infektionspartikel konnten die interessierenden Proteine Rab11A, Rab11A N124I und GLUT4myc in den differenzierten Primärzellen überexprimiert werden und die Insulin-stimulierte Glucoseaufnahme bzw. Translokation von GLUT4 zur Plasmamembran ermittelt werden.

3.4.1 Herstellung der rekombinanten adenoviralen Donorvektoren

Zur Herstellung eines rekombinanten adenoviralen Donorvektors wurde die Rab11A-cDNA aus der Gesamt-RNA von H9c2-E2-Zellen mittels RT-PCR und Rab11A-spezifischen Primern generiert, die eine Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease *Bgl* II besaßen (siehe Abb. 17 A, S. 117). Durch den Restriktionsverdau des RT-PCR-Produktes (667 bps) mit *Bgl* II erhielt die Rab11A-cDNA Vektor-kompatible kohäsive Enden und wurde danach in den linearisierten adenoviralen Donorvektor pAV-CIG / *Bgl* II (9456 bps) inseriert. Nach der Transformation mit dem Ligationsprodukt und der Kultivierung individueller Klone wurde die Plasmid-DNA präpariert und analysiert. Eine repräsentative Restriktionsanalyse des rekombinanten adenoviralen Donorvektors pAV-CIG-Rab11A und des adenoviralen Donorvektors pAV-CIG als Kontrolle ist in Abb. 17 B (S. 117) gezeigt. Für die Bestimmung der Gesamtlänge der Plasmid-DNA (10123 bps / 9456 bps) und der korrekten Insertion (9456 bps + 657 bps) wurden spezifische Restriktionsendonukleasen eingesetzt.

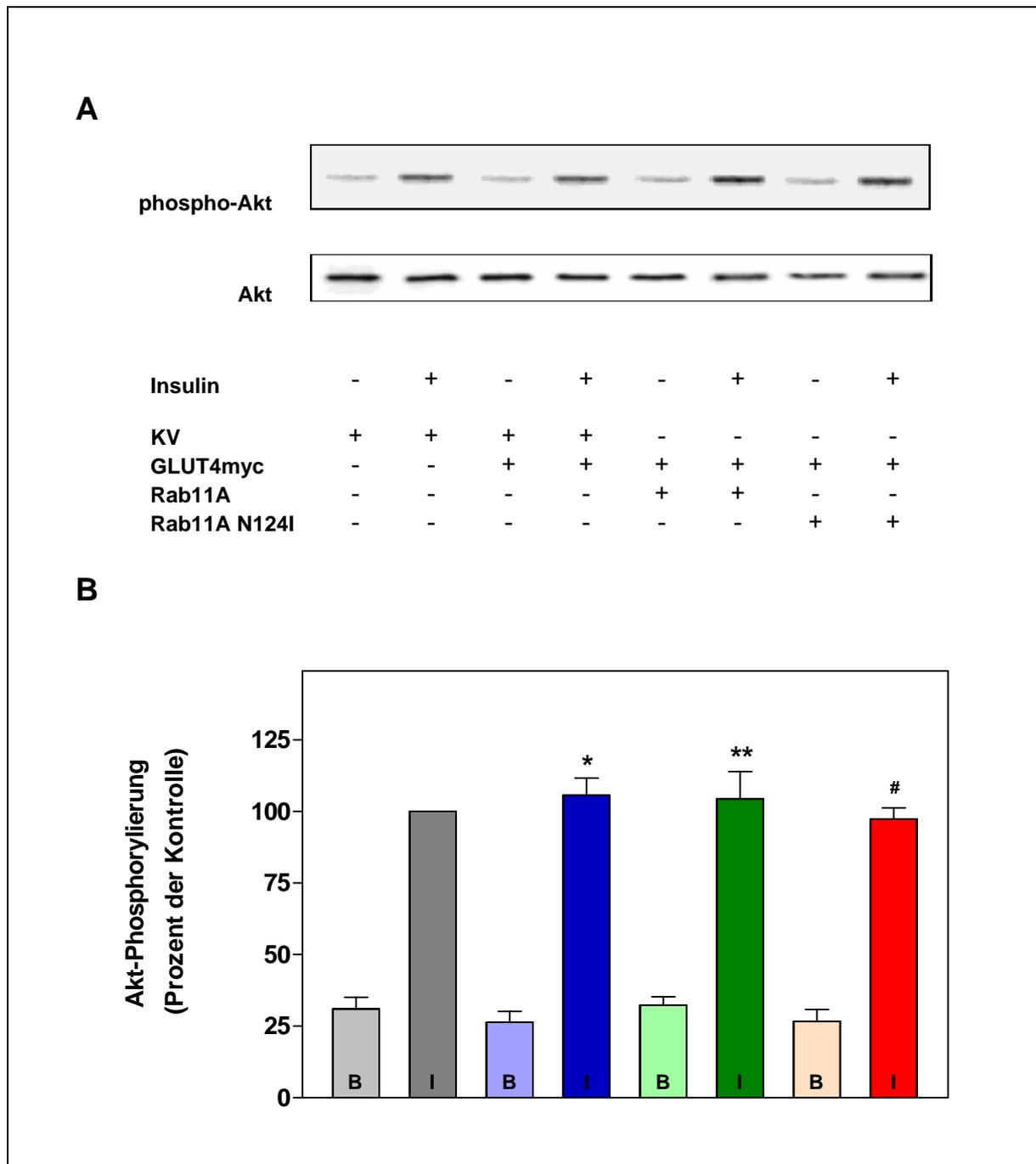


Abb. 16 Akt-Phosphorylierung in transfizierten H9c2-E2-Zellen.

H9c2-E2-Zellen wurden mit pCMV-GLUT4myc, -Rab11A, -Rab11A N124I bzw. pCMV als Kontrollvektor (KV) transient cotransfiziert. Nach einer Kultivierung für die Dauer von 48 h wurden die Zellen mit 1 μ M Insulin stimuliert. Nach der Zelllysis erfolgte die SDS-PAGE (8 - 18 %) der Lysate (je 10 μ g Protein) und der Proteintransfer. **A:** Repräsentative Darstellung der Immundetektion mit anti-phospho-Akt- bzw. anti-Akt-Antikörper. **B:** Quantifizierung der detektierten Chemilumineszenz (Normierung: Insulin-stimulierte Kontrolle)

aus drei verschiedenen Einzelexperimenten. * Nicht-signifikant verschieden vs. KV-Transfektion ($p > 0,05$); ** nicht-signifikant verschieden vs. KV-Transfektion ($p > 0,05$); # nicht-signifikant verschieden vs. KV-Transfektion ($p > 0,05$). (B, basal; I, Insulin).

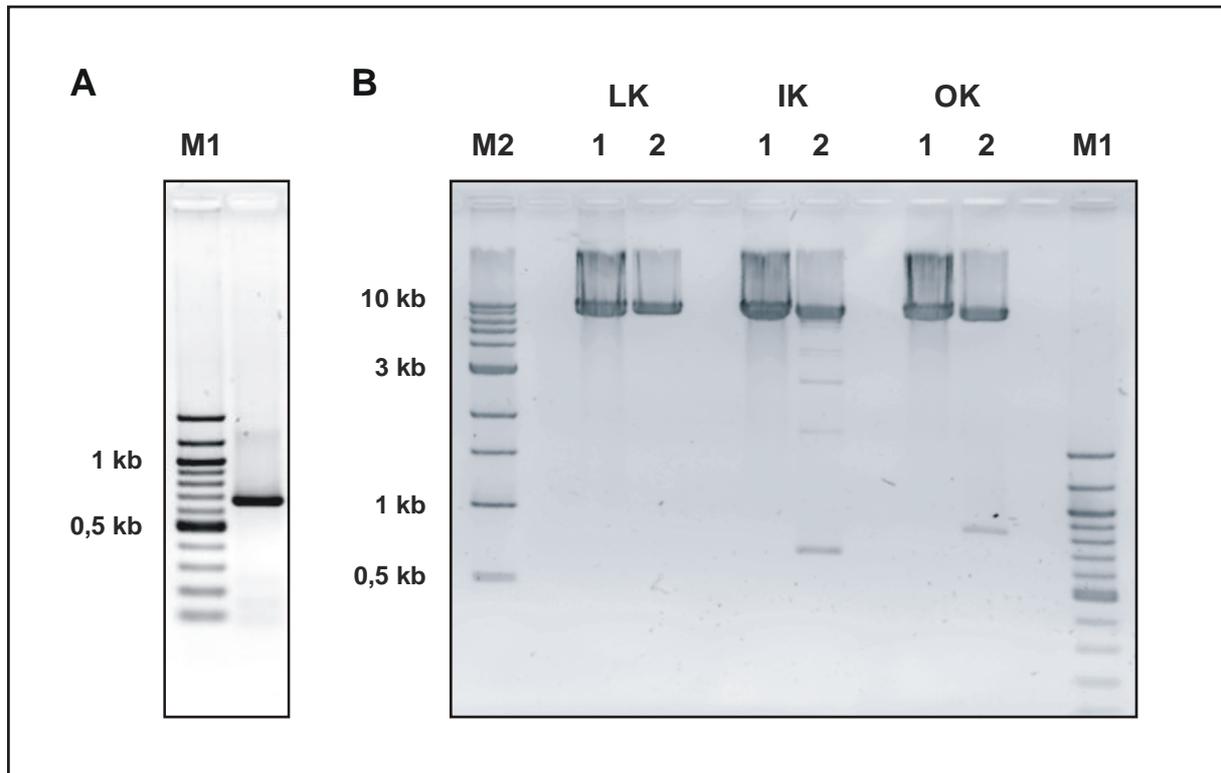


Abb. 17 RT-PCR von Rab11A-cDNA und Restriktionsanalyse von pAV-CIG-Rab11A.

A: Inverse Darstellung der Rab11A-cDNA nach RT-PCR aus Gesamt-RNA von H9c2-E2-Zellen in einem 2%igen Agarose-Gel nach Gelelektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung. **B:** Repräsentative inverse Darstellung der Restriktionsverdau-Ergebnisse von pAV-CIG (1) und pAV-CIG-Rab11A (2) in einem 1,25%igen Agarose-Gel nach Gelelektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung. Die Bestimmung der Gesamtlänge der Plasmid-DNA's (LK) erfolgte mit *Pme* I. Für die Insertkontrolle (IK) wurde *Bgl* II eingesetzt und für die Orientierungskontrolle (OK) wurden *Xba* I und *Xho* I verwendet. (M1, Marker DNA Ladder 100 bp; M2, Marker DNA Ladder 1 kb).

Die Herstellung des adenoviralen Donorvektors der dominant-negativen Mutante Rab11A N124I erfolgte mittels Mutagenese-PCR unter Verwendung des Ausgangsplasmids pAV-CIG-Rab11A und komplementären Primern, die eine Punktmutation (A → T) an der Position bp 371 der Rab11A-cDNA generierten. Nach dem Restriktionsverdau des nicht-mutierten Ausgangsplasmids wurden chemisch-kompetente XL1-Blue-Zellen transformiert und die Plasmid-DNA von pAV-CIG-Rab11A N124I von mehreren Klonen isoliert.

Für die Insertion der GLUT4myc-cDNA in den linearisierten adenoviralen Donorvektor pAV-CIG / Bgl II wurde das Ausgangsplasmid pCXN2-GLUT4myc mutiert, da die GLUT4myc-cDNA eine intrinsische Schnittstelle der Restriktionsendonuklease *Bgl* II besitzt. Die Substitution an der Position bp 1442 der GLUT4myc-cDNA erfolgte mittels Mutagenese-PCR und komplementären Primern, die die Punktmutation (G → A) enthielten. Nach dem Restriktionsverdau des nicht-mutierten Ausgangsplasmids und der Transformation von chemisch-kompetenten XL1-Blue-Zellen wurde die isolierte Plasmid-DNA eines Klons mit der Restriktionsendonuklease *Bgl* II inkubiert, um Vektor-kompatible kohäsive Doppelstrang-Enden der GLUT4myc-cDNA zu generieren. Anschließend wurde die GLUT4myc-cDNA mit dem linearisierten adenoviralen Donorvektor pAV-CIG / Bgl II ligiert und chemisch-kompetente One Shot® TOP10-Zellen mit dem Ligationsprodukt transformiert.

Ausgewählte rekombinante Plasmid-DNA's wurden nach der Restriktionsanalyse von pAV-CIG-Rab11A bzw. nach der Mutagenese-PCR zur Herstellung von pAV-CIG-Rab11A N124I und pAV-CIG-GLUT4myc sequenziert. Die Auswertung der Sequenzierung ergab eine korrekte Ligation der insertierten cDNA's sowie die Mutation der Rab11A N124I-cDNA an der Position bp 371 bzw. der GLUT4myc-cDNA an der Position bp 1442 ohne Sequenzvariationen in anderen Regionen der jeweiligen cDNA.

3.4.2 Homologe Rekombination

Nach der Linearisierung der rekombinanten adenoviralen Donorvektoren pAV-CIG-Rab11A, pAV-CIG-Rab11A N124I und pAV-CIG-GLUT4myc durch den Einsatz der Restriktionsendonuklease *Pme* I (siehe Abb. 17 B, S. 117) erfolgte die homologe Rekombination des adenoviralen Akzeptorvektors pAVG5-ΔE1/E3 mit einem rekombinanten adenoviralen Donorvektor. Dazu wurden elektrokompetente BJ5183-Zellen mit beiden Vektoren cotransformiert. Nach der Kultivierung individueller Klone wurde die Plasmid-DNA von pAVG-Rab11A, pAVG-Rab11A N124I und pAVG-GLUT4myc isoliert und durch den Einsatz spezifischer Restriktionsendonukleasen analysiert. In Abb. 18 (S. 119) ist die Restriktionsanalyse von pAVG-Rab11A nach der korrekten homologen Rekombination des adenoviralen Akzeptorvektors pAVG5-ΔE1/E3 mit dem rekombinanten adenoviralen Donorvektor pAV-CIG-Rab11A sowie die Restriktionsanalyse von pAVG5-ΔE1/E3 als Kontrollplasmid repräsentativ dargestellt. Durch den Einsatz von *Bgl* II wurde die Rab11A-cDNA (667 bps) als Einzelfragment nach dem Restriktionsverdau des Gesamtplasmids pAVG-Rab11A direkt nachgewiesen.

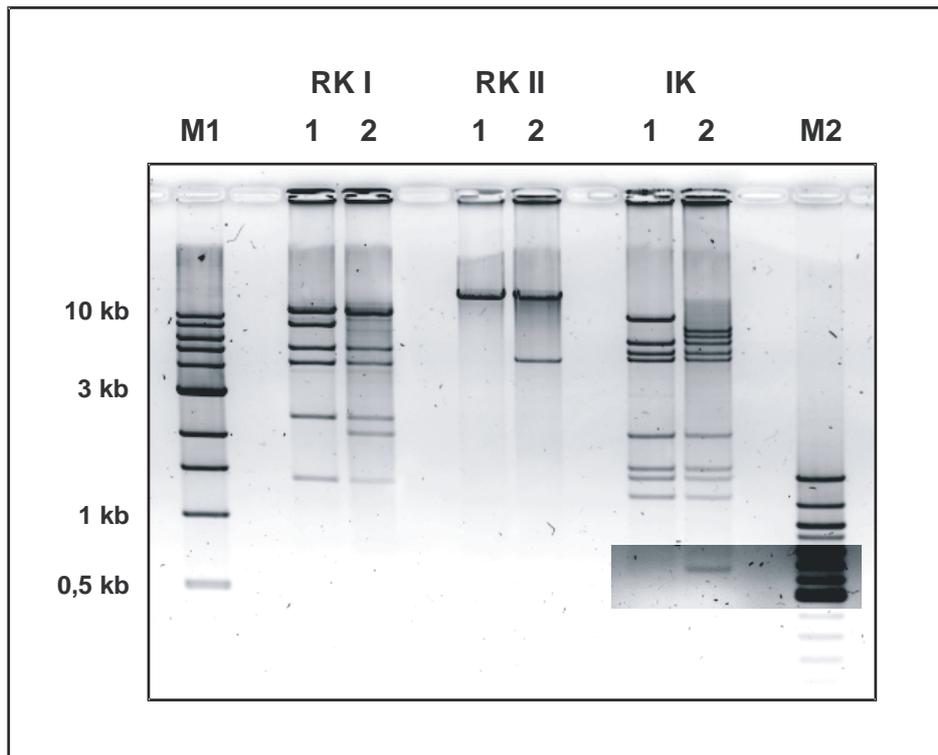


Abb. 18 Restriktionsanalyse von pAVG-Rab11A.

Repräsentative inverse Darstellung der Restriktionsverdau-Ergebnisse von pAVG5- Δ E1/E3 (1) und pAVG-Rab11A (2) in einem 1,25%igen Agarose-Gel nach Gelelektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung. Für die Kontrolle der homologen Rekombination wurde *Bst*X I (RK I) bzw. *Pac* I (RK II) eingesetzt. Zusätzlich wurde die Insertkontrolle (IK) mit *Bgl* II durchgeführt. (M1, Marker DNA Ladder 1 kb; M2, Marker DNA Ladder 100 bp).

3.4.3 Herstellung der rekombinanten Viruspartikel

Nach der Linearisierung der rekombinanten adenoviralen Plasmid-DNA von pAVG-Rab11A, pAVG-Rab11A N124I bzw. pAVG-GLUT4myc durch den Einsatz der Restriktionsendonuklease *Pac* I (siehe Abb. 18) wurden replikationskompetente HEK-293-Zellen mittels Calciumphosphat-Methode transfiziert und die rekombinanten Viruspartikel AV-Rab11A, AV-Rab11A N124I und AV-GLUT4myc hergestellt. In Tab. 17 (S. 120) ist die Anzahl der hergestellten rekombinanten Viruspartikel nach der Maxipräparation und die biologische Aktivität in *Plaque forming units* (PFU) dargestellt.

	Anzahl der Viruspartikel	Biologische Aktivität
AV-Rab11A	$6,1 \times 10^{13}$	$6,8 \times 10^{11}$ PFU
AV-Rab11A N124I	$4,8 \times 10^{13}$	$5,4 \times 10^{11}$ PFU
AV-GLUT4myc	$8,1 \times 10^{13}$	$7,3 \times 10^{11}$ PFU

Tab. 17 Anzahl und biologische Aktivität der hergestellten Viruspartikel.

3.4.4 Adenovirale Infektion der humanen Skelettmuskelzellen

Humane Skelettmuskelzellen wurden mit den im Rahmen der vorliegenden Arbeit hergestellten rekombinanten Viruspartikeln AV-Rab11A, AV-Rab11A N124I und AV-GLUT4myc adenoviral coinfiziert. Zusätzlich wurden Kontrollviren ohne rekombinantes Insert (AV-K) verwendet, die Bestandteil des AdenoVator™-Kit waren. Für die adenovirale Coinfektion wurden humane proliferierende Myoblasten ausgesät und nach einer Wachstumsdauer von vier Tagen differenziert. Drei Tage nach Differenzierungsbeginn erfolgte die Coinfektion der Skelettmuskelzellen mit einer definierten Menge der interessierenden Viruspartikel (100 PFU je ausgesäter Myoblastenzelle). Nach einer weiteren Kultivierung für die Dauer von 48 h wurden die Zellen lysiert und das Expressionsniveau der entsprechenden Proteine analysiert. Die lichtmikroskopische Kontrolle ergab bei den eingesetzten PFU-Mengen keine morphologischen Veränderungen der Zellen während der Infektion und der anschließenden Kultivierung. Eine repräsentative Immundetektion der Zelllysate von Skelettmuskelzellen, die zur Optimierung der adenoviralen Infektion mit 5 - 100 PFU AV-Rab11A je ausgesäter Myoblastenzelle infiziert wurden, und die Quantifizierung der detektierten Chemilumineszenz sind in Abb. 19 (S. 121) dargestellt.

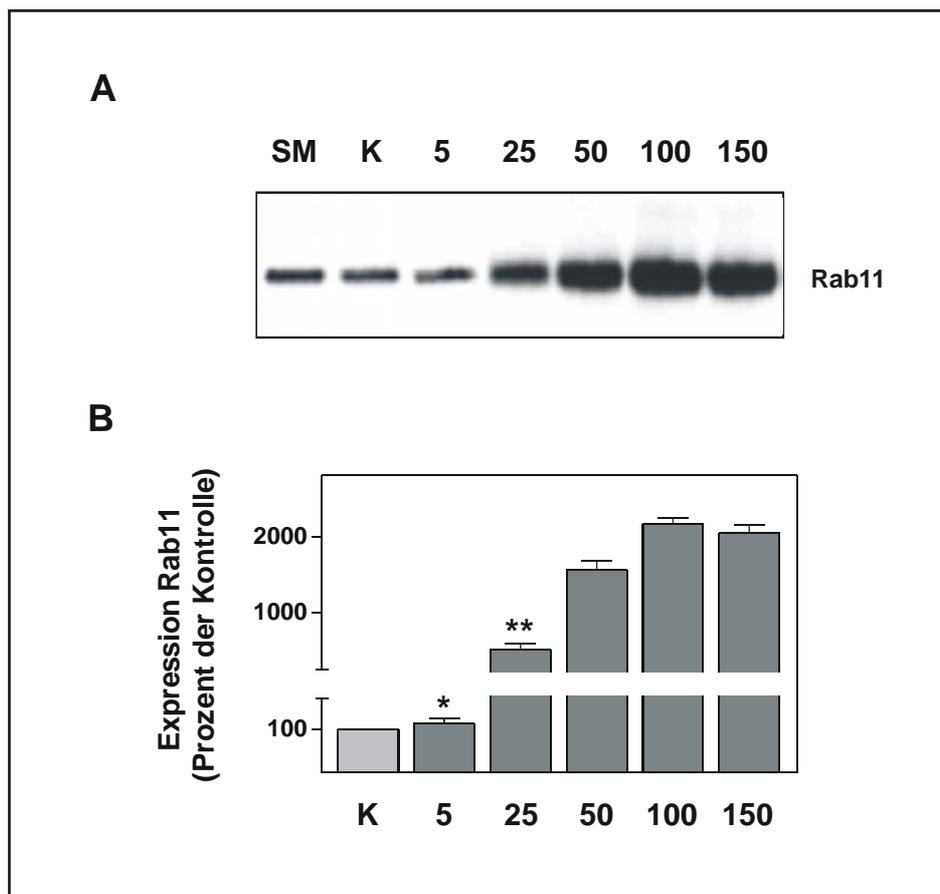


Abb. 19 Optimierung der adenoviralen Infektion von humanen Skelettmuskelzellen.

A: Repräsentative Darstellung der Immundetektion von Rab11 mit anti-Rab11-Antikörper nach adenoviraler Infektion von humanen Skelettmuskelzellen mit AV-Rab11A (5, 25, 50, 100 bzw. 150 PFU je ausgesäter proliferierender Myoblastenzelle) bzw. AV-K (150 PFU je ausgesäter proliferierender Myoblastenzelle). Nach der Infektion und einer weiteren Kultivierung für die Dauer von 48 h erfolgte die SDS-PAGE (8 - 18 %) der Zelllysate (je 10 µg Protein) und der Proteintransfer. **B:** Prozentuale Darstellung der Chemilumineszenz als BLU-Mittelwert (\pm SEM) aus drei verschiedenen Einzelerperimenten. * Nicht-signifikant verschieden vs. AV-K-Infektion ($p > 0,05$); ** signifikant verschieden vs. AV-K-Infektion ($p < 0,001$). (K, Kontrollviren AV-K; SM, humane Skelettmuskelzellen).

Die Immundetektion der Zelllysate von humanen Skelettmuskelzellen, die mit AV-Rab11A infiziert wurden, zeigte ein Maximum des Expressionsniveaus von Rab11A bei einer eingesetzten Menge von 100 PFU je ausgesäter proliferierender Myoblastenzelle nach einer Expressionsdauer von 48 h. Die Quantifizierung der detektierten Chemilumineszenz ergab, dass die Infektion von humanen Skelettmuskelzellen mit AV-Rab11A (100 PFU) zu einer Steigerung der zellulären Expression von Rab11A gegenüber Kontrollzellen um 1950 %

fürte. Die Coinfektion humaner Skelettmuskelzellen drei Tage nach Differenzierungsbeginn mit 100 PFU je ausgesäter Myoblastenzelle und eine anschließende Expressionsdauer von 48 h wurden als Standard für alle durchgeführten adenoviralen Coinfektionen von humanen Skelettmuskelzellen gewählt.

In Abb. 20 ist die Immundetektion der Zellysate von humanen Skelettmuskelzellen nach adenoviraler Coinfektion mit AV-GLUT4myc und AV-Rab11A bzw. AV-Rab11A N124I oder Kontrollviren (je 100 PFU) sowie die Quantifizierung der detektierten Chemilumineszenz repräsentativ dargestellt.

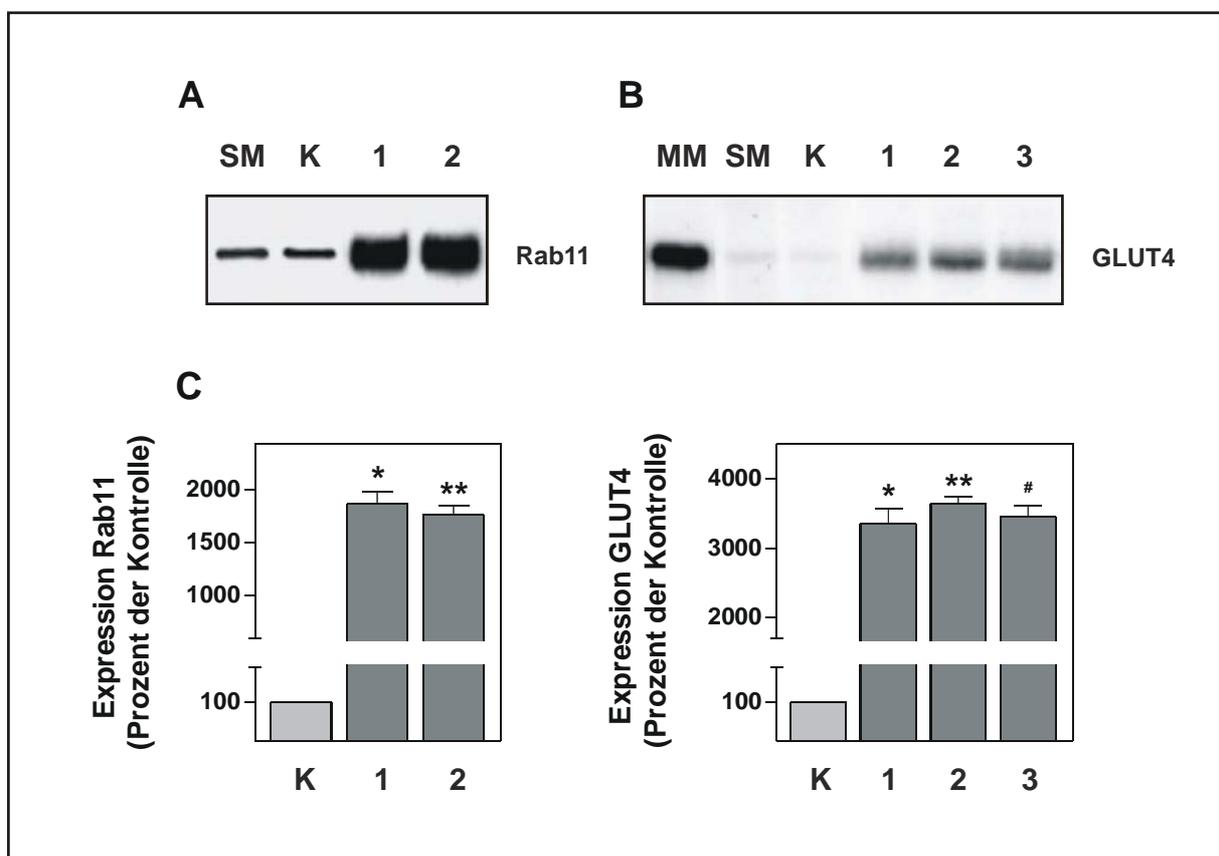


Abb. 20 Überexpression von Rab11A und GLUT4myc in humanen Skelettmuskelzellen.

Überexpression von Rab11A und GLUT4myc nach adenoviraler Coinfektion von humanen Skelettmuskelzellen mit AV-GLUT4myc und AV-Rab11A (1), AV-Rab11A N124I (2) bzw. AV-K (3). Nach der Infektion (je 100 PFU) und einer weiteren Kultivierung für die Dauer von 48 h erfolgte die SDS-PAGE (8 - 18 %) und der Proteintransfer. **A:** Repräsentative Darstellung der Immundetektion von Zellysaten (je 10 µg Protein) mit anti-Rab11-Antikörper. **B:** Repräsentative Darstellung der Immundetektion von Zellysaten (je 5 µg Protein) mit anti-GLUT4-Antikörper.

C: Prozentuale Darstellung der Chemilumineszenz als BLU-Mittelwert (\pm SEM) aus jeweils vier verschiedenen Einzelexperimenten. * Signifikant verschieden vs. AV-K-Infektion ($p < 0,001$); ** signifikant verschieden vs. AV-K-Infektion ($p < 0,001$); # signifikant verschieden vs. AV-K-Infektion ($p < 0,001$). (K, Kontrollviren AV-K; MM, kardiale Mikrosomalmembran; SM, humane Skelettmuskelzellen).

Die Quantifizierung der detektierten Chemilumineszenz ergab eine prozentuale Steigerung des Expressionsniveaus von Rab11A und Rab11A N124I in humanen Skelettmuskelzellen nach adenoviraler Coinfektion im Vergleich zu der Menge von Rab11 in Kontrollzellen um 1763 % (AV-Rab11A + GLUT4myc) bzw. 1639 % (AV-Rab11A N124I + GLUT4myc). Der Unterschied zwischen der Expression von Rab11A und Rab11A N124I war nicht-signifikant ($p > 0,05$). Die Expression von GLUT4myc war nach adenoviraler Coinfektion im Vergleich zu der Menge von GLUT4 in Kontrollzellen um 3247 % (AV-GLUT4myc + AV-Rab11A), um 3533 % (AV-GLUT4myc + AV-Rab11A N124I) bzw. um 3361 % (AV-GLUT4myc + AV-K) erhöht.

3.5 Insulin-stimulierte Glucoseaufnahme

3.5.1 Insulin-stimulierte Glucoseaufnahme in H9c2-E2-Zellen

Für die Untersuchung des Einflusses von Rab11A auf die Insulin-stimulierte Glucoseaufnahme wurde die Ratten-Kardiomyoblasten-Zelllinie H9c2 als etabliertes Modell zur funktionellen Analyse von Herzmuskelzellen ausgewählt und zusätzlich mit der humanen Insulinrezeptor-cDNA stabil transfiziert. Nach der Kontrolle der zellulären Rezeptor-Überexpression wurde die Insulin-stimulierte Glucoseaufnahme ausgewählter H9c2-Klone bestimmt [Pause, 2005]. Die Ergebnisanalyse aller untersuchten Klone ergab, dass der Klon E2 sowohl die höchste Insulinsensitivität besaß (IC_{50} : 4 nM) als auch eine 2,5fach höhere Glucoseaufnahme gegenüber nicht-transfizierten H9c2-Zellen zeigte und deshalb für die nachfolgenden Experimente eingesetzt wurde.

Für die funktionelle Charakterisierung von Rab11A in H9c2-E2-Zellen wurden die Ratten-Kardiomyoblasten mit pCMV-GLUT4myc und pCMV-Rab11A bzw. pCMV-Rab11A N124I oder mit dem Kontrollvektor pCMV in Transfektionstriplikaten cotransfiziert und kultiviert. Das Expressionsniveau der interessierenden Proteine ist in Abb. 14 (S. 113) bzw. Abb. 15 (S. 114) repräsentativ dargestellt. Nach der Inkubation der H9c2-E2-Zellen mit radioaktiv-markierter 2-Desoxy-D-[1- 14 C]-glucose (2-DOG) erfolgte die Stimulation mit 1 μ M Insulin und die Messung der zellulären 2-DOG-Aufnahme. In Abb. 21 (S. 124) ist die Quantifizierung

der 2-DOG-Aufnahme von H9c2-E2-Zellen unter Basalbedingungen und nach Hormonstimulus dargestellt.

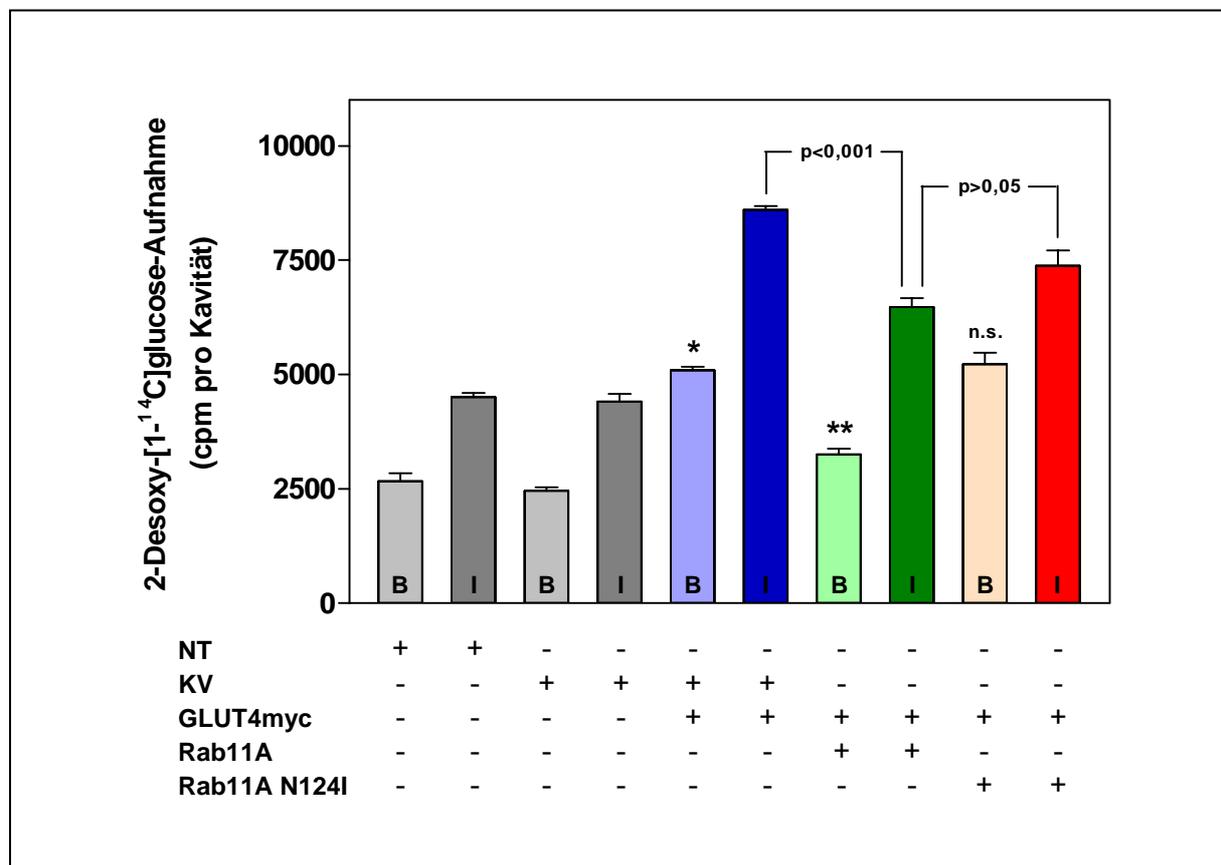


Abb. 21 Insulin-stimulierte Glucoseaufnahme von H9c2-E2-Zellen.

H9c2-E2-Zellen wurden mit pCMV-GLUT4myc, -Rab11A, -Rab11A N124I bzw. pCMV als Kontrollvektor (KV) transient cotransfiziert. Nach einer Kultivierung für die Dauer von 48 h wurde die zelluläre Aufnahme von 2-Desoxy-D-[1-¹⁴C]glucose unter Basalbedingungen (B) bzw. nach Insulinstimulation (I) ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte (± SEM) aus drei verschiedenen Einzelexperimenten. * Signifikant verschieden vs. KV-Transfektion (p < 0,001); ** signifikant verschieden vs. GLUT4myc-Transfektion (p < 0,01); n.s., nicht-signifikant verschieden vs. GLUT4myc-Transfektion (p > 0,05). (NT, nicht-transfizierte H9c2-E2-Zellen).

Die Überexpression von GLUT4myc führte zu einer Verdopplung der zellulären 2-DOG-Aufnahme unter Basalbedingungen im Vergleich zu H9c2-E2-Zellen, die mit dem Kontrollvektor pCMV (KV) transfiziert wurden (KV: 2455 ± 79 cpm; GLUT4myc: 5089 ± 81 cpm). Sowohl in KV-transfizierten als auch in GLUT4myc-transfizierten Zellen kam es nach der Insulinstimulation zu einer Erhöhung der zellulären 2-DOG-Aufnahme um 75 %

(KV: 4406 ± 148 cpm; GLUT4myc: 8597 ± 86 cpm). Die Überexpression von GLUT4myc und Rab11A verringerte die basale 2-DOG-Aufnahme im Vergleich zu GLUT4myc-transfizierten Zellen um 37 % (GLUT4myc: 5089 ± 81 cpm; GLUT4myc + Rab11A: 3254 ± 123 cpm). Die Insulinstimulation führte unter diesen Expressionsbedingungen zu einem zweifachen Anstieg der 2-DOG-Aufnahme (GLUT4myc + Rab11A: 3254 ± 123 cpm [basal] vs. 6474 ± 194 cpm [Insulin]).

H9c2-E2-Zellen, in denen GLUT4myc und die dominant-negative Mutante Rab11A N124I überexprimiert wurden, zeigten keine signifikante Änderung der basalen 2-DOG-Aufnahme im Vergleich zu GLUT4myc-transfizierten Zellen (GLUT4myc: 5089 ± 81 cpm; GLUT4myc + Rab11A N124I: 5226 ± 251 cpm). Der Insulineffekt war unter diesen Bedingungen im Vergleich zu GLUT4myc-transfizierten Zellen um 39 % reduziert (GLUT4myc: 3508 cpm; GLUT4myc + Rab11A N124I: 2148 cpm).

Die transiente Transfektion mit dem Kontrollvektor führte zu keiner signifikanten Änderung der basalen (Nicht-transfiziert: 2665 ± 125 cpm; KV: 2455 ± 79 cpm) bzw. Insulin-stimulierten 2-DOG-Aufnahme (Nicht-transfiziert: 4506 ± 92 cpm; KV: 4406 ± 148 cpm).

Die dargestellten Ergebnisse zeigen den Einfluss von Rab11A auf die 2-DOG-Aufnahme in H9c2-E2-Zellen. Die Überexpression von Rab11A und GLUT4myc führte zu einer starken Verringerung der basalen Glucoseaufnahme im Vergleich zu GLUT4myc-transfizierten Zellen. Der Insulineffekt blieb unter diesen Transfektionsbedingungen unverändert. Im Gegensatz zur Wildtyp-Form von Rab11A hatte die dominant-negative Mutante Rab11A N124I keinen signifikanten Einfluss auf die basale Glucoseaufnahme in H9c2-E2-Zellen, induzierte jedoch eine erhebliche Hemmung der Insulinwirkung.

3.5.2 Insulin-stimulierte Glucoseaufnahme in humanen Skelettmuskelzellen

Für die weitere Analyse der funktionellen Bedeutung von Rab11A bei der Insulin-stimulierten Glucoseaufnahme wurden primäre Skelettmuskelzellen eingesetzt. Humane proliferierende Myoblasten wurden ausgesät und drei Tage nach Beginn ihrer Differenzierung zu Skelettmuskelzellen mit AV-GLUT4myc und AV-Rab11A bzw. AV-Rab11A N124I (je 100 PFU) oder mit Kontrollviren ohne rekombinantes Insert (AV-K) adenoviral coinfiziert. Nach 48 h wurden die Skelettmuskelzellen von Infektionstriplikaten mit 1 μ M Insulin stimuliert und die zelluläre 2-DOG-Aufnahme ermittelt. Die Quantifizierung der 2-DOG-Aufnahme von humanen Skelettmuskelzellen unter Basalbedingungen und nach Insulinstimulation ist in Abb. 22 (S. 126) dargestellt.

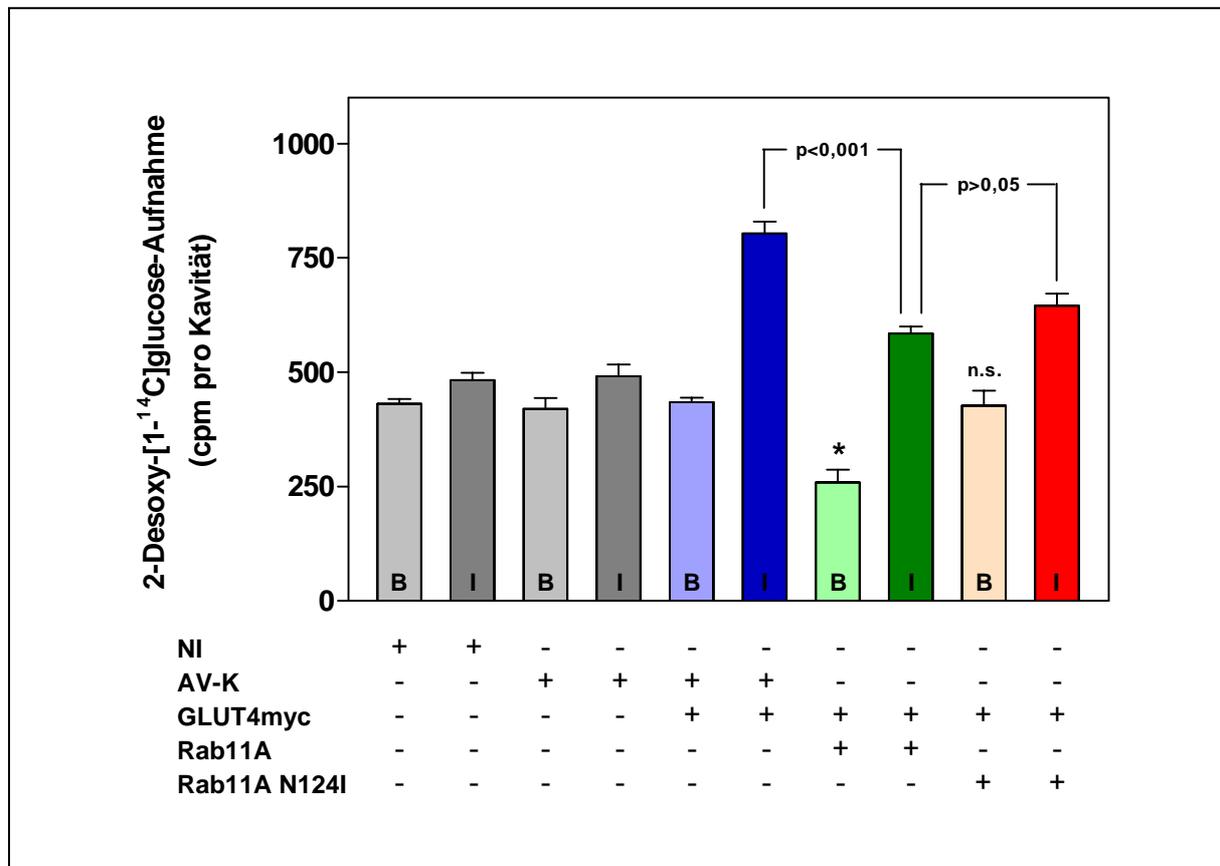


Abb. 22 Insulin-stimulierte Glucoseaufnahme von humanen Skelettmuskelzellen.

Humane Skelettmuskelzellen wurden mit AV-GLUT4myc, AV-Rab11A, AV-Rab11A N124I bzw. AV-K (je 100 PFU) adenoviral coinfiziert. Nach einer Kultivierung für die Dauer von 48 h wurde die zelluläre Aufnahme von 2-Desoxy-D-[1-¹⁴C]glucose unter Basalbedingungen (B) bzw. nach Insulinstimulation (I) ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte (± SEM) aus vier verschiedenen Einzelexperimenten. * Signifikant verschieden vs. GLUT4myc-Infektion (p < 0,01); n.s., nicht-signifikant verschieden vs. GLUT4myc-Infektion (p > 0,05). (AV-K, Kontrollviren; NI, nicht-infizierte humane Skelettmuskelzellen).

Die Bestimmung der zellulären 2-DOG-Aufnahme in humanen Skelettmuskelzellen ergab, dass diese Zellen aufgrund des geringen Expressionsniveaus von GLUT4 (siehe Abb. 20, S. 122) nur eine marginale Steigerung (12 %) der Glucoseaufnahme nach Insulinstimulation zeigten (NI: 430 ± 11 cpm [basal] vs. 481 ± 16 cpm [Insulin]). Die Überexpression von GLUT4myc ergab keine Änderung der zellulären 2-DOG-Aufnahme unter Basalbedingungen im Vergleich zu Skelettmuskelzellen, die mit AV-K infiziert wurden (AV-K: 420 ± 24 cpm; GLUT4myc: 412 ± 19 cpm). Die Insulinstimulation dieser Zellen führte zu einem zweifachen Anstieg der 2-DOG-Aufnahme (GLUT4myc: 412 ± 19 cpm [basal] vs. 803 ± 36 cpm [Insulin]).

Skelettmuskelzellen, die GLUT4myc und Rab11A überexprimierten, zeigten eine Reduktion der basalen 2-DOG-Aufnahme im Vergleich zu GLUT4myc-infizierten Zellen um 37 % (GLUT4myc: 412 ± 19 cpm; GLUT4myc + Rab11A: 259 ± 26 cpm). Der Insulineffekt war unter diesen Infektionsbedingungen marginal verringert (GLUT4myc: 391 cpm; GLUT4myc + Rab11A: 324 cpm). Die Überexpression von GLUT4myc und der dominant-negativen Mutante Rab11A N124I führte zu keiner signifikanten Änderung der basalen 2-DOG-Aufnahme im Vergleich zu GLUT4myc-infizierten Zellen (GLUT4myc: 412 ± 19 cpm; GLUT4myc + Rab11A N124I: 426 ± 33 cpm). Im Vergleich zu GLUT4myc-infizierten Zellen war der Insulineffekt nach der Coinfektion um 44 % reduziert (GLUT4myc: 391 cpm; GLUT4myc + Rab11A N124I: 219 cpm).

Die Infektion mit Kontrollviren (AV-K) hatte sowohl unter Basalbedingungen (Nicht-infiziert: 430 ± 11 cpm; AV-K: 412 ± 19 cpm) als auch nach Insulinstimulation (Nicht-infiziert: 481 ± 16 cpm; AV-K: 491 ± 26 cpm) keinen signifikanten Einfluss auf die 2-DOG-Aufnahme.

Die erzielten Befunde der infizierten Skelettmuskelzellen bestätigen den dualen Effekt von Rab11A bei der basalen und Insulin-stimulierten Glucoseaufnahme aus den Untersuchungen der H9c2-E2-Zellen. Auch in Primärzellen verringerte Rab11A die basale Glucoseaufnahme, während die Insulin-stimulierte Glucoseaufnahme nahezu unverändert blieb. Im Gegensatz dazu inhibierte die dominant-negative Mutante Rab11A N124I die Insulin-stimulierte Glucoseaufnahme erheblich, ohne die basale Glucoseaufnahme zu beeinträchtigen. Interessanterweise führte die singuläre Expression von GLUT4myc im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen zu keiner Zunahme der basalen Glucoseaufnahme. Die Insulinstimulation induzierte eine Verdoppelung der Glucoseaufnahme in GLUT4myc-infizierten Zellen.

3.6 Insulin-stimulierte Translokation des Glucosetransporters GLUT4

Der Einfluss von Rab11A auf die Insulin-stimulierte Translokation des Glucosetransporters GLUT4 wurde sowohl in Zellen der Ratten-Kardiomyoblasten-Zelllinie H9c2-E2 als auch in humanen Skelettmuskelzellen untersucht. Nach der transienten Cotransfektion bzw. adenoviralen Coinfektion der Zellen wurde neben Rab11A eine modifizierte Form des Glucosetransporters GLUT4 überexprimiert, dessen cDNA durch eine Insertion von 14 Aminosäuren (AEEQKLISEEDLLK) der humanen c-myc-Region variiert war (GLUT4myc). Nach der Insulin-stimulierten Translokation der GLUT4myc-enthaltenden Membranvesikel und der Fusion mit der Plasmamembran wird das myc-Epitop in der ersten extrazellulären Schleife des Glucosetransporters GLUT4 ohne Beeinträchtigung der Aktivität des

Transportproteins exponiert [Kanai *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1998 b]. Durch den Einsatz eines anti-myc-Antikörpers und eines radioaktiv-markierten Sekundäantikörpers konnte der Glucosetransporter GLUT4myc direkt und ohne Permeabilisierung der Plasmamembran quantifiziert werden.

3.6.1 Insulin-stimulierte Translokation von GLUT4myc in H9c2-E2-Zellen

Für die Translokationsuntersuchungen wurden H9c2-E2-Zellen mit pCMV-GLUT4myc und pCMV-Rab11A bzw. pCMV-Rab11A N124I oder dem Kontrollvektor pCMV in Transfektions-triplikaten cotransfiziert und kultiviert. Nach der Stimulation der H9c2-E2-Zellen mit 1 μ M Insulin erfolgte die Bestimmung der Menge von Plasmamembran-assoziiertem GLUT4myc durch die Inkubation mit anti-myc-Antikörper und radioaktiv-markiertem Sekundäantikörper. In Abb. 23 ist die Quantifizierung der Translokation von GLUT4myc in transfizierten H9c2-E2-Zellen unter Basalbedingungen und nach Hormonstimulus dargestellt.

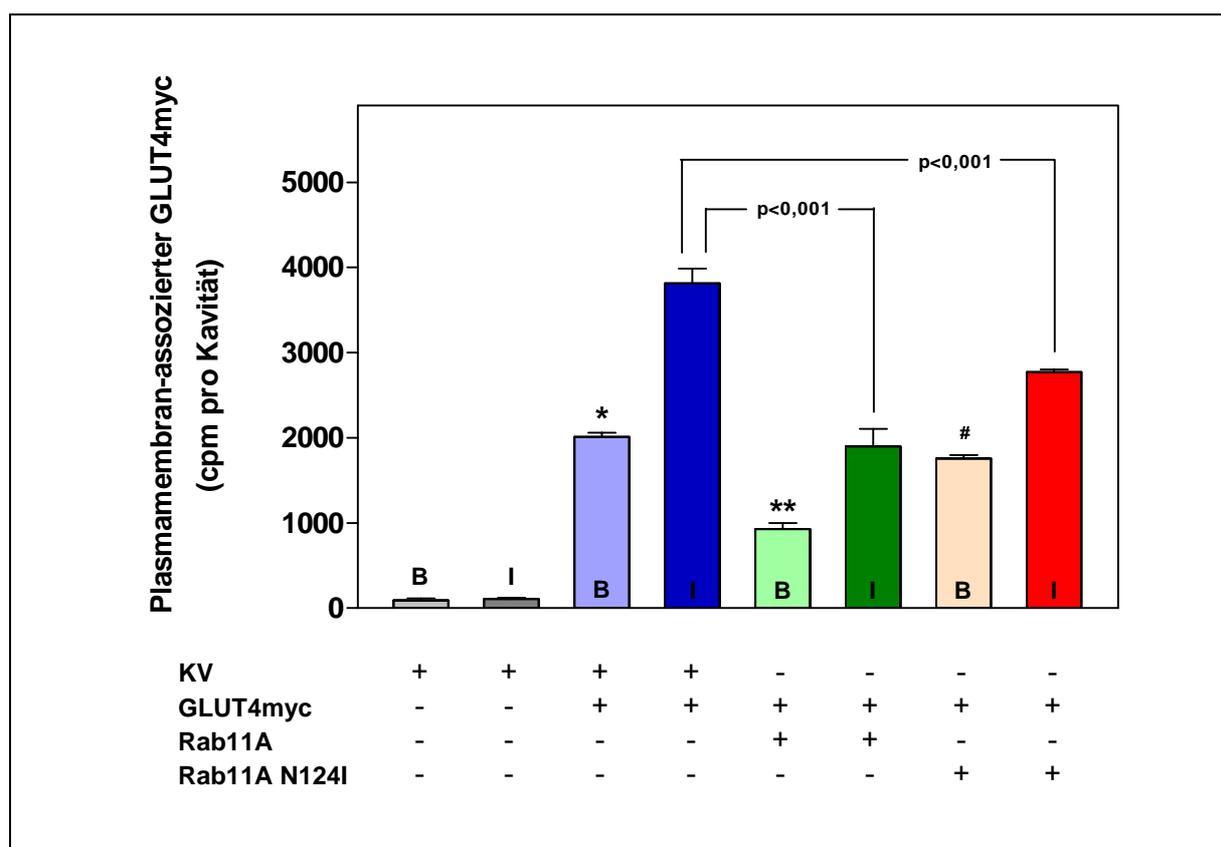


Abb. 23 Insulin-stimulierte Translokation von GLUT4myc in H9c2-E2-Zellen.

H9c2-E2-Zellen wurden mit pCMV-GLUT4myc, -Rab11A, Rab11A N124I bzw. pCMV als

Kontrollvektor (KV) transient cotransfiziert. Nach einer Kultivierung für die Dauer von 48 h wurde die Translokation von GLUT4myc unter Basalbedingungen (B) bzw. nach Insulinstimulation (I) bestimmt. Die Quantifizierung der Plasmamembran-assoziierten Menge von GLUT4myc erfolgte durch die Inkubation mit anti-myc-Antikörper und einem radioaktiv-markierten Sekundärantikörper. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SEM) aus vier verschiedenen Einzelexperimenten. * Signifikant verschieden vs. KV-Transfektion ($p < 0,001$); ** signifikant verschieden vs. GLUT4myc-Transfektion ($p < 0,001$); # signifikant verschieden vs. GLUT4myc + Rab11A-Transfektion ($p < 0,001$).

Die Auswertung der Translokationsuntersuchungen mit transfizierten H9c2-E2-Zellen ergab, dass die detektierte Plasmamembran-gebundene Radioaktivität vollständig aus der Überexpression von GLUT4myc resultierte (KV: 77 ± 4 cpm; GLUT4myc: 2096 ± 42 cpm). Nach der Insulinstimulation war die Menge von Plasmamembran-assoziiertem GLUT4myc in GLUT4myc-transfizierten Zellen zweifach erhöht (GLUT4myc: 2096 ± 42 cpm [basal] vs. 3853 ± 172 cpm [Insulin]). Die Überexpression von GLUT4myc und Rab11A reduzierte die Menge von Plasmamembran-assoziiertem GLUT4myc unter Basalbedingungen um 55 % (GLUT4myc: 2096 ± 42 cpm; GLUT4myc + Rab11A: 948 ± 67 cpm). Die Insulin-stimulierte Translokation von GLUT4myc war durch die Überexpression von GLUT4myc und Rab11A im Vergleich zu GLUT4myc-transfizierten Zellen gering erhöht (16 %).

Die Überexpression von GLUT4myc und der dominant-negativen Mutante Rab11A N124I hatte nur einen geringen Einfluss auf die Menge von Plasmamembran-assoziiertem GLUT4myc unter Basalbedingungen (GLUT4myc: 2096 ± 42 cpm; GLUT4myc + Rab11A N124I: 1857 ± 40 cpm). Der Insulineffekt in diesen cotransfizierten Zellen war jedoch in Vergleich zu GLUT4myc-transfizierten Zellen um 43 % reduziert (GLUT4myc: 1757 cpm; GLUT4myc + Rab11A N124I: 1014 cpm).

Die Ergebnisse der Translokationsuntersuchungen von H9c2-E2-Zellen nach Überexpression von GLUT4myc und Rab11A bzw. Rab11A N124I führten zu einer Differenzierung des dualen Effekts von Rab11A. Der direkte Nachweis von GLUT4myc in der Plasmamembran ergab eine Halbierung der Menge des Glucosetransporters nach der Überexpression von GLUT4myc und Rab11A unter Basalbedingungen. Der Vergleich mit den Ergebnissen der Insulin-stimulierten Glucoseaufnahme (siehe Abb. 21, S. 124) zeigt, dass die Translokation von GLUT4myc zur Plasmamembran nach Hormonstimulus durch Rab11A ebenfalls nur unwesentlich beeinflusst wurde. Im Gegensatz dazu verringerte Rab11A N124I die Insulin-stimulierte Translokation von GLUT4myc, während die Menge von GLUT4myc unter Basalbedingungen im Vergleich zu GLUT4myc-transfizierten Zellen

nicht-signifikant verändert war. Für die weitere Charakterisierung dieser Befunde wurde die subzelluläre Lokalisation von GLUT4-enthaltenden Membranvesikeln analysiert (siehe Kap. 3.7, S. 131).

3.6.2 Insulin-stimulierte Translokation von GLUT4myc in humanen Skelettmuskelzellen

In humanen Skelettmuskelzellen wurde die Translokation von GLUT4myc nach adenoviraler Infektion der Zellen durchgeführt. Dazu wurden humane proliferierende Myoblasten ausgesät und drei Tage nach Beginn ihrer Differenzierung zu Skelettmuskelzellen mit AV-GLUT4myc und AV-Rab11A bzw. AV-Rab11A N124I (je 100 PFU) oder mit Kontrollviren ohne rekombinantes Insert (AV-K) adenoviral coinfiziert. Nach der Stimulation der Skelettmuskelzellen mit 1 μ M Insulin erfolgte die Bestimmung der Menge von Plasmamembran-assoziiertem GLUT4myc durch die Inkubation mit anti-myc-Antikörper und radioaktiv-markierten Sekundärantikörper. Die Quantifizierung der Translokation von GLUT4myc in infizierten humanen Skelettmuskelzellen unter Basalbedingungen und nach Insulinstimulation ist in Abb. 24 (S. 131) dargestellt.

Die Überexpression von GLUT4myc nach adenoviraler Infektion führte zu einer massiven Erhöhung der Translokation von GLUT4myc zur Plasmamembran unter Basalbedingungen im Vergleich zu Zellen, die mit Kontrollviren (AV-K) infiziert wurden (AV-K: 158 ± 9 cpm; GLUT4myc: 936 ± 38 cpm). Die Insulinstimulation der GLUT4myc-infizierten Zellen induzierte eine Verdopplung der Plasmamembran-assoziierten Menge von GLUT4myc (GLUT4myc: 936 ± 38 cpm [basal] vs. 1965 ± 47 cpm [Insulin]). Skelettmuskelzellen, die GLUT4myc und Rab11A überexprimierten, zeigten im Vergleich zu GLUT4myc-infizierten Zellen eine Abnahme der Translokation unter Basalbedingungen um 41 % (GLUT4myc: 936 ± 38 cpm; GLUT4myc + Rab11A: 556 ± 59 cpm). Außerdem war der Insulineffekt unter diesen Bedingungen auf 73 % reduziert (GLUT4myc: 1029 cpm; GLUT4myc + Rab11A: 751 cpm).

Die Überexpression von GLUT4myc und der dominant-negativen Mutante Rab11A N124I führte zu einer nicht-signifikanten Erhöhung der basalen Translokation von GLUT4myc (GLUT4myc: 936 ± 48 cpm; GLUT4myc + Rab11A N124I: 1024 ± 55 cpm). Der Insulineffekt der coinfizierten Zellen war im Vergleich zu GLUT4myc-infizierten Zellen um 52 % reduziert (GLUT4myc: 1029 cpm; GLUT4myc + Rab11A N124I: 494 cpm).

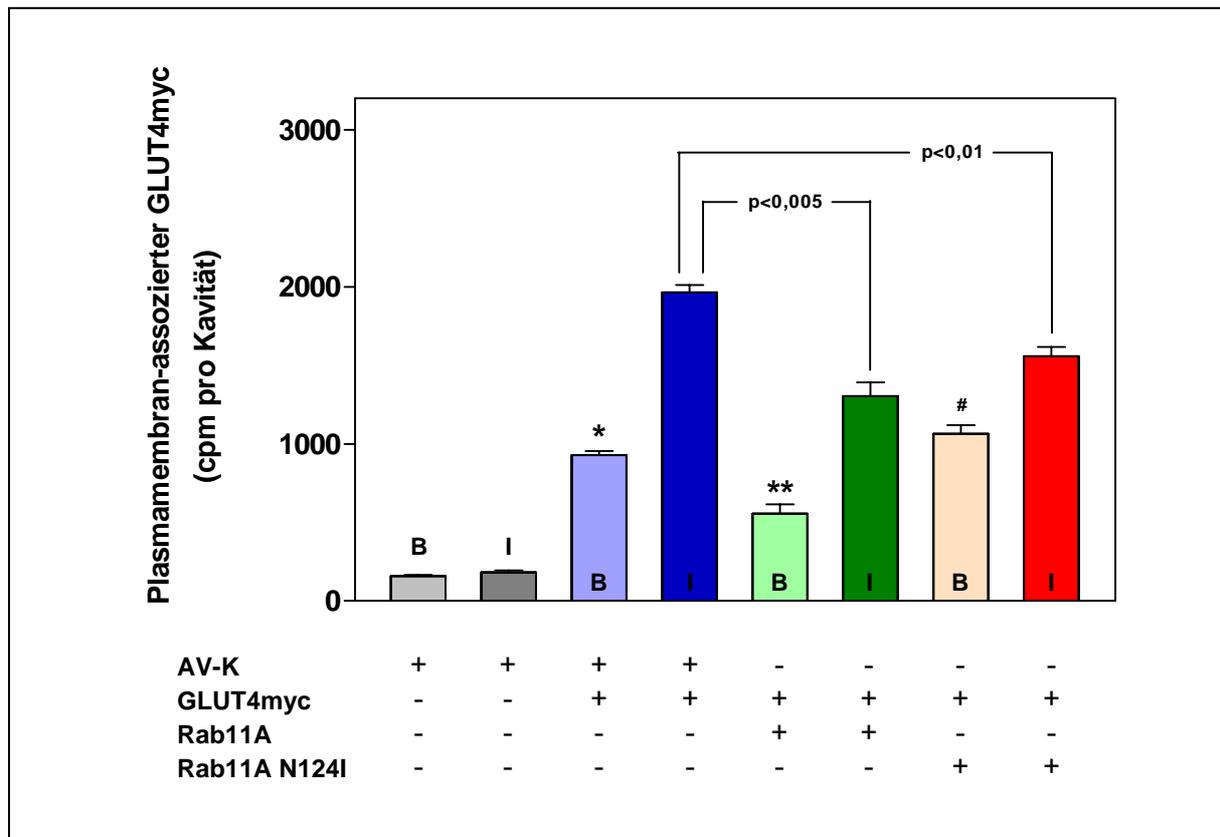


Abb. 24 Insulin-stimulierte Translokation von GLUT4myc in humanen Skelettmuskelzellen.

Humane Skelettmuskelzellen wurden mit AV-GLUT4myc, AV-Rab11A, AV-Rab11A N124I bzw. AV-K (je 100 PFU) adenoviral coinfiert. Nach einer Kultivierung für die Dauer von 48 h wurde die Translokation von GLUT4myc unter Basalbedingungen (B) bzw. nach Insulinstimulation (I) bestimmt. Die Quantifizierung der Plasmamembran-assoziierten Menge von GLUT4myc erfolgte durch die Inkubation mit anti-myc-Antikörper und einem radioaktiv-markierten Sekundärantikörper. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SEM) aus vier verschiedenen Einzelexperimenten. * Signifikant verschieden vs. AV-K-Infektion ($p < 0,001$); ** signifikant verschieden vs. GLUT4myc-Infektion ($p < 0,01$); # signifikant verschieden vs. GLUT4myc + Rab11A-Infektion ($p < 0,005$). (AV-K, Kontrollviren).

3.7 Subzelluläre Lokalisation von GLUT4-enthaltenden Membranvesikeln

Die subzelluläre Lokalisation von GLUT4-enthaltenden Membranvesikeln wurde in H9c2-E2-Zellen analysiert, um die Verteilung des Glucosetransporters in unterschiedlichen Vesikelkompartimenten nach der Überexpression von GLUT4myc und Rab11A zu identifizieren. Dadurch konnte der duale Effekt von Rab11A in Insulin-sensitiven Zellen, der

nach den Untersuchungen der Insulin-stimulierten Glucoseaufnahme und Translokation von GLUT4myc zur Plasmamembran postuliert wurde, detaillierter beschrieben werden.

Die isolierte Gesamtmembran von transfizierten H9c2-E2-Zellen, die GLUT4myc und Rab11A bzw. Rab11A N124I überexprimierten, wurde in einem kontinuierlichen Saccharose-Dichtegradienten mittels Ultrazentrifugation fraktioniert. Anschließend wurden die Schichten der zentrifugierten Gradientenlösung portioniert und die Verteilung von GLUT4myc und Rab11A in den erhaltenen Fraktionen mittels Immundetektion nach SDS-PAGE und Proteintransfer ermittelt. Zusätzlich wurde die Verteilung von charakteristischen Markerproteinen verschiedener subzellulärer Kompartimente wie des Membranproteins *Early endosome antigene 1* (EEA1; 180 kDa), das in Frühen Endosomen lokalisiert ist, und des Transferrinrezeptors (TfR; 95 kDa), der in Recycling-Endosomen enthalten ist, analysiert. Außerdem erfolgte der Nachweis des Golgi-Matrix-Proteins mit 130 kDa (GM130) und von TGN38 (90 kDa), eines Markerproteins des trans-Golgi-Netzwerkes.

H9c2-E2-Zellen exprimieren *per se* nur eine sehr geringe Menge des Glucosetransporters GLUT4 (siehe Abb. 15 A, S. 114). Die Membranfraktionierung der H9c2-E2-Zellen, die GLUT4myc überexprimierten, führte zur Detektion eines singulären endosomalen GLUT4(myc)-Pools, der charakteristisch für undifferenzierte Zellen ist (siehe Abb. 25, S. 134). Dieser GLUT4myc-Pool cosedimentierte sowohl mit Rab11 als auch partiell mit den Markerproteinen EEA1, TGN38 und TfR. Die Überexpression von Rab11A hatte keinen Einfluss auf das Sedimentationsverhalten des endosomalen GLUT4myc-Pools. Sowohl bei GLUT4myc-transfizierten H9c2-E2-Zellen als auch bei Zellen, die GLUT4myc und Rab11A überexprimierten, wurde der GLUT4myc-Pool in den Fraktionen 11 - 18 mit einem Maximum in Fraktion 14 nachgewiesen (siehe Abb. 26 A, S. 135).

H9c2-E2-Zellen, die GLUT4myc und die dominant-negative Mutante Rab11A N124I überexprimierten, zeigten ein verändertes Sedimentationsverhalten von GLUT4myc. Die Immundetektion der Fraktionen des Saccharose-Dichtegradienten ergab eine Verschiebung des singulären GLUT4myc-Pools in Richtung der Gradienten-Fractionen mit höherer Saccharose-Konzentration (Fraktionen 14 - 20), in denen auch die Markerproteine der Frühen Endosomen (EEA1) bzw. Recycling-Endosomen (TfR) cosedimentierten. Neben dem veränderten Sedimentationsverhalten konnte zusätzlich die Akkumulation eines neuen GLUT4myc-Pools nachgewiesen werden, der in den Gradienten-Fractionen 9 - 11 mit einer

maximalen GLUT4myc-Menge in Fraktion 11 auftrat und mit dem Markerprotein der Golgi-Matrix GM130 cosedimentierte. Dieses charakteristische Verteilungsmuster konnte in allen Experimenten nach Überexpression von GLUT4myc und der dominant-negativen Mutante Rab11A N124I reproduziert werden.

Die Quantifizierung der GLUT4myc-Gesamtmenge im Verhältnis zu der exprimierten Menge von Rab11A ergab bei der Überexpression von GLUT4myc und Rab11A einen Wert von $1,30 \pm 0,11$. Bei H9c2-E2-Zellen, die GLUT4myc und die dominant-negative Mutante Rab11A N124I überexprimierten, lag dieser Wert bei $1,78 \pm 0,14$ ($p < 0,001$).

Die Ergebnisse der subzellulären Lokalisation von GLUT4myc-enthaltenden Membranvesikeln verdeutlichen die Funktion von Rab11A bei der Insulin-stimulierten Translokation von GLUT4myc. Durch Rab11A wurden die GLUT4myc-enthaltenden Membranvesikel aus den Fraktionen, die mit dem Markerprotein der Recycling-Endosomen bzw. des trans-Golgi-Netzwerkes cosedimentierten, in Richtung der Fraktionen mit niedrigerer Saccharose-Konzentration verdrängt, die mit dem Markerprotein des Golgi-Apparates cosedimentierten. Das führt zu der Hypothese, dass Rab11A an der intrazellulären Sequestrierung beteiligt ist und GLUT4-enthaltende Membranvesikel in Insulin-insensitive Kompartimente transloziert. Die Überexpression der dominant-negativen Mutante von Rab11A induzierte ebenfalls ein verändertes Sedimentationsverhalten von GLUT4myc-enthaltenden Membranvesikeln. Die Entstehung eines zweiten GLUT4myc-Pools kann den dualen Effekt von Rab11A, der sich aus den Untersuchungen der Insulin-stimulierten Glucoseaufnahme und Translokation von GLUT4myc zur Plasmamembran ergab, bestätigen. Die Überexpression der dominant-negativen Mutante führte ebenfalls zu einer Verschiebung von GLUT4myc-enthaltenden Membranvesikeln in Insulin-insensitive Kompartimente und zu einer Blockade der Membranvesikel, die aus dem Endosomalen-Recycling-Kompartiment in das trans-Golgi-Netzwerk transloziert werden.

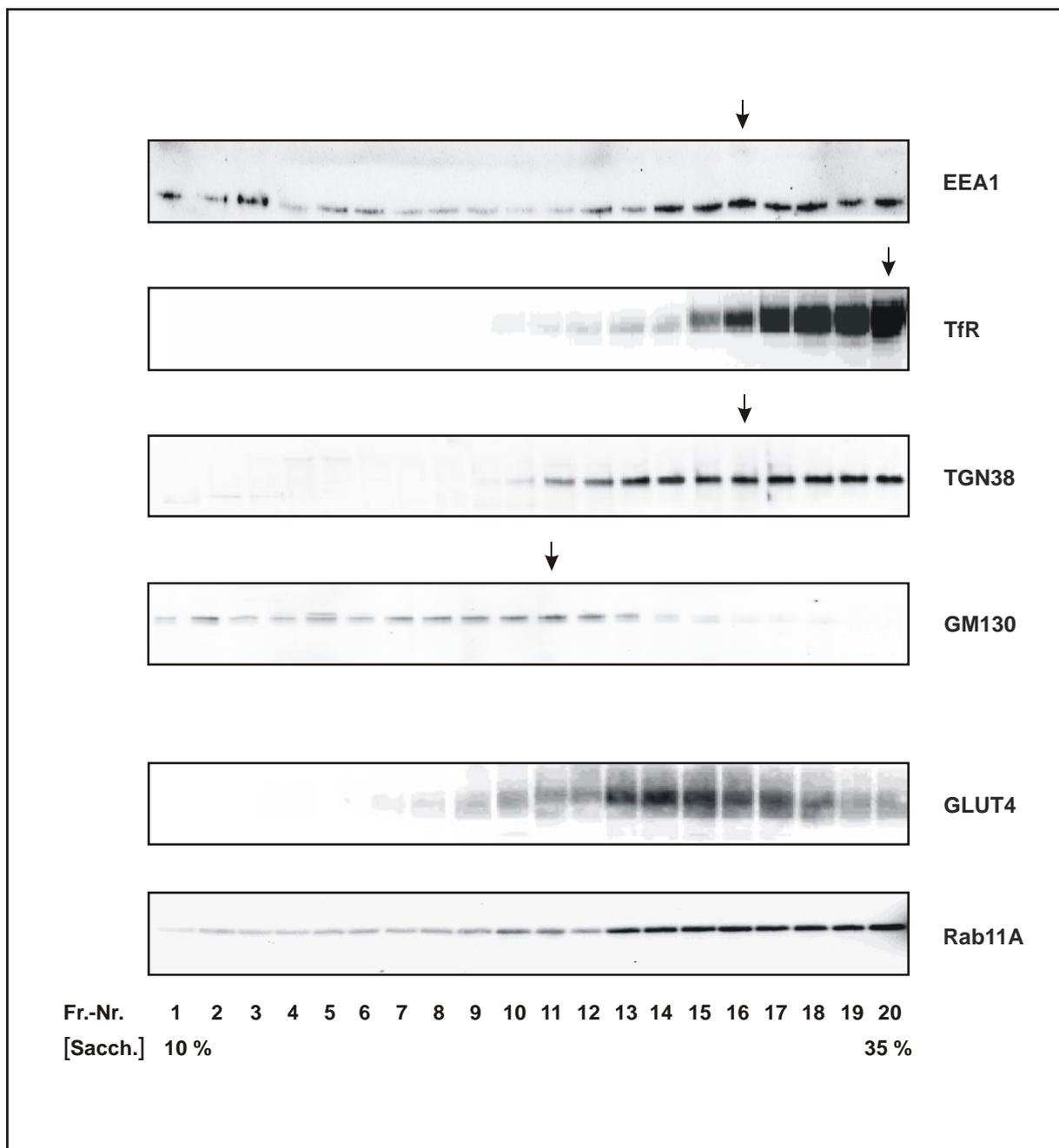


Abb. 25 Fraktionierung der Gesamtmembran von GLUT4myc-transfizierten H9c2-E2-Zellen.

H9c2-E2-Zellen wurden mit pCMV-GLUT4myc transient transfiziert und für die Dauer von 48 h kultiviert. Danach wurde die isolierte Gesamtmembran der Zellen homogenisiert und in einem kontinuierlichen Saccharose-Dichtegradienten (10 - 35 %) mittels Ultrazentrifugation fraktioniert. Anschließend erfolgte die SDS-PAGE (8 - 18 %) der Gradienten-Fractionen (Fr.-Nr. 1 - 20) und der Proteintransfer sowie die Immundetektion mit anti-*Early endosome antigene 1* (EEA1)-, anti-Transferrinrezeptor (TfR)-, anti-trans-Golgi-Netzwerk-Protein 38 (TGN38)- bzw. anti-Golgi-Matrix-Protein 130 kDa (GM130)-Antikörper zum Nachweis von Markerproteinen distinkter Membrankompartimente sowie mit anti-GLUT4- bzw. anti-Rab11-Antikörper. (Sacch., Saccharose-Konzentration [m/v]). Anm.: Die Fraktion mit der größten Menge eines detektierten Markerproteins ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

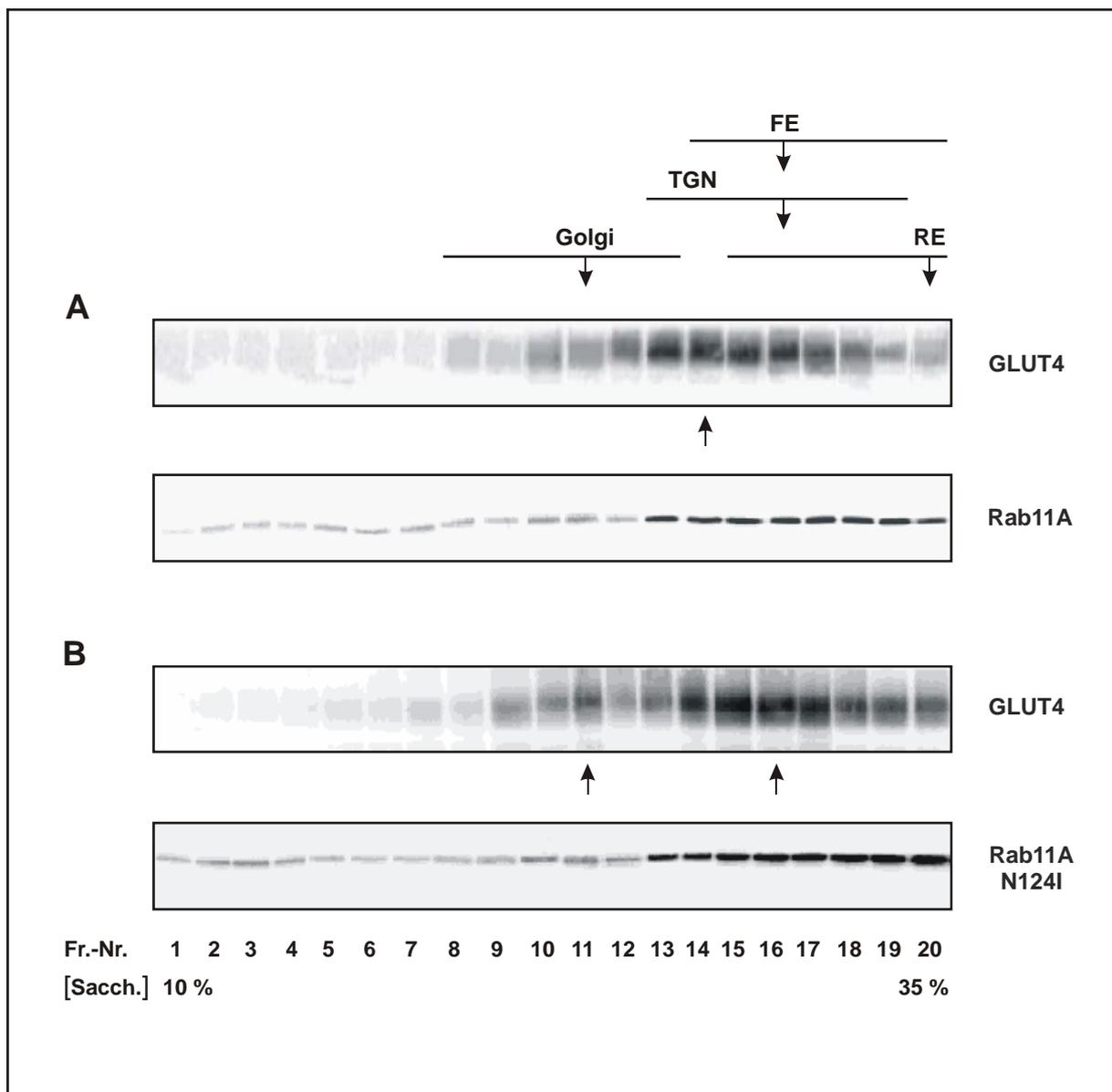


Abb. 26 Fraktionierung der Gesamtmembran von H9c2-E2-Zellen nach der Überexpression von Rab11A und GLUT4myc.

H9c2-E2-Zellen wurden mit pCMV-GLUT4myc und pCMV-Rab11A bzw. -Rab11A N124I transient transfiziert und für die Dauer von 48 h kultiviert. Danach wurde die isolierte Gesamtmembran der Zellen homogenisiert und in einem kontinuierlichen Saccharose-Dichtegradienten (10 - 35 %) mittels Ultrazentrifugation fraktioniert. Anschließend erfolgte die SDS-PAGE (8 - 18 %) und der Proteintransfer der Gradienten-Fractionen (Fr.-Nr. 1 - 20) sowie die Immundetektion mit anti-GLUT4- (1) bzw. anti-Rab11-Antikörper (2). **A**: Subzelluläre Lokalisation nach Überexpression von GLUT4myc und Rab11A. **B**: Subzelluläre Lokalisation nach Überexpression von GLUT4myc und Rab11A N124I. (FE, Frühe Endosomen; RE, Recycling-Endosomen; Sacch., Saccharose-Konzentration [m/v]; TGN, trans-Golgi-Netzwerk). Anm.: Die Fraktion mit der größten Menge von GLUT4myc innerhalb eines Pools ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

4 DISKUSSION

4.1 Rab11A und die Insulin-stimulierte Translokation von GLUT4

Der Glucosetransporter GLUT4 ist ein transmembranäres Transportprotein aus der Familie der Glucosetransporter und wird fast ausschließlich in den Insulin-sensitiven Zellen des Herz- und Skelettmuskelgewebes bzw. Fettgewebes exprimiert. Eine Vielzahl experimenteller Untersuchungen zeigte, dass die zelluläre Glucoseaufnahme durch GLUT4 nach dessen Insulin-stimulierter Translokation zur Plasmamembran der geschwindigkeits-limitierende Schritt des Glucosemetabolismus in Muskel- und Fettzellen ist und die antihyperglykämische Wirkung von Insulin vermittelt [Bryant *et al.*, 2002; Watson *et al.*, 2004 a; Ishiki & Klip, 2005]. Zahlreiche klinische Befunde belegen die Bedeutung der Insulin-stimulierten Translokation von GLUT4, deren Dysregulation für die Entstehung der Insulinresistenz von wesentlicher Bedeutung ist und in Insulin-sensitiven Zellen von Patienten mit Typ 2-Diabetes auftritt [Garvey *et al.*, 1998; Cline *et al.*, 1999; Zierath *et al.*, 2000].

Obwohl der akute metabolische Haupteffekt von Insulin, die Steigerung der Glucoseaufnahme in Insulin-sensitiven Zellen des Muskel- und Fettgewebes während der postprandialen Phase, bereits länger bekannt ist, kann bisher nur die initiale Signalauslösung durch die Rezeptorbindung des Hormons sowie die Signaltransduktion durch nachfolgende Effektorproteine innerhalb der Insulinsignalkaskade(n) zusammenhängend beschrieben werden. Im Gegensatz dazu sind die molekularen Komponenten der unmittelbaren Insulinsignaltransduktion in GLUT4-enthaltende Membranvesikel und ihre Regulation durch Insulin noch weitgehend ungeklärt. Ebenso sind grundsätzliche Aspekte wie die lokale und temporale Koordination des Transports von GLUT4-enthaltenden Membranvesikeln durch Effektorproteine der Insulinsignalkaskade(n) oder durch spezifische Regulatorproteine, die Interaktion der beteiligten Vesikelkompartimente sowie kinetische Parameter der Translokation von GLUT4-enthaltenden Membranvesikeln bisher nur unzureichend charakterisiert.

An der intrazellulären Translokation der GLUT4-enthaltenden Membranvesikel in Insulin-sensitiven Zellen des Muskel- und Fettgewebes sind eine Vielzahl von unterschiedlichen Zellorganellen beteiligt [Hah *et al.*, 2002]. Bereits im Basalzustand zirkuliert GLUT4 in einem konstitutiven Kreislauf zwischen Plasmamembran und intrazellulären Vesikelkompartimenten. Nach der Internalisierung des Plasmamembran-assoziierten Glucosetransporters und dem Transfer in Frühen Endosomen kann das Transportprotein direkt zur Plasmamembran transloziert werden oder in einer weiterführenden Endozytose durch das

Endosomale Recycling-Kompartiment und anschließender Exozytose zur Plasmamembran transportiert werden [Sato *et al.*, 1993; Yeh *et al.*, 1995; Robinson *et al.*, 1996; Mukherjee *et al.*, 1997]. Dabei unterliegen die beteiligten Frühen Endosomen und Recycling-Endosomen einem kontinuierlichen Membranaustausch sowohl untereinander als auch mit der Plasmamembran, dem trans-Golgi-Netzwerk und den Späten Endosomen, in denen der Proteinabbau erfolgt [Ghosh *et al.*, 1998]. Deshalb ist es für die vollständige Charakterisierung des intrazellulären Transports von GLUT4-enthaltenden Membranvesikeln essentiell, neben dem endosomalen Recycling von GLUT4 und der Translokation der GLUT4-Speichervesikel zur Plasmamembran auch das ständige Fließgleichgewicht des Transportproteins zwischen Insulin-sensitiven und nicht-sensitiven Kompartimenten zu analysieren.

Regulation des intrazellulären Transports von GLUT4 durch Rab-Proteine

Für die Regulation und Koordination des intrazellulären Transports der GLUT4-enthaltenden Membranvesikel in Insulin-sensitiven Zellen des Muskel- und Fettgewebes sind Rab-Proteine von entscheidender Bedeutung. Diese Proteine agieren aufgrund ihrer interkonvertiblen Proteinkonformationen (GDP-GTP-Zyklus) als molekulare Schalter innerhalb der zellulären Signaltransduktion und sind in ihrer aktiven Form in Membranvesikeln unterschiedlicher Kompartimente lokalisiert, um endo- und exozytotische Transportprozesse sowie Membranfusionen zu regulieren [Takai *et al.*, 2001; Zerial & McBride, 2001].

Bisher wurden die Rab-Proteine Rab4, Rab5 und Rab11A als Regulatorproteine des intrazellulären Transports von GLUT4-enthaltenden Membranvesikeln in Insulin-sensitiven Zellen identifiziert und initial charakterisiert [Cormont *et al.*, 1996 a; Cormont *et al.*, 1996 b; Kessler *et al.*, 2000]. Während Rab5 die Internalisierung von GLUT4 aus der Plasmamembran in Clathrin-beschichtete Membranvesikel und den Transport in Frühen Endosomen koordiniert, reguliert Rab4 den Eintritt der GLUT4-enthaltenden Membranvesikel in das Endosomale Recycling-Kompartiment [Cormont & Le Marchand-Brustel, 2001; Huang *et al.*, 2001; Pagano *et al.*, 2004]. Ergebnisse neuester Untersuchungen belegen außerdem, dass mit Rab2A, Rab8A, Rab10 und Rab14 weitere Rab-Proteine in GLUT4-enthaltenden Membranvesikeln lokalisiert sind [Larance *et al.*, 2005; Miinea *et al.*, 2005].

In unserer Arbeitsgruppe konnte die Lokalisation von Rab11A in GLUT4-enthaltenden Membranvesikeln und die Insulin-stimulierte Umverteilung von Rab11A aus dem Zytosol in die Plasmamembran von isolierten Ratten-Herzmuskelzellen erstmals gezeigt werden

[Kessler *et al.*, 2000]. Außerdem ergaben die Lokalisationsuntersuchungen eine hormon-induzierte Abnahme der Menge von Rab11A im endosomalen Kompartiment und eine Zunahme in einem nicht-endosomalen Vesikelkompartiment. Diese Befunde stellten die Ausgangssituation für die Durchführung der vorliegenden Arbeit dar. Deshalb war es das Ziel dieser Arbeit, die Funktion von Rab11A durch die Analyse der Insulin-stimulierten Glucoseaufnahme und Translokation des Glucosetransporters GLUT4 zur Plasmamembran sowie der subzellulären Lokalisation von GLUT4-enthaltenden Membranvesikeln in zwei Muskelzellsystemen genauer zu charakterisieren.

Funktionelle Charakterisierung von Rab11A in humanen und Ratten-Muskelzellen

Für die Untersuchungen zum Einfluss von Rab11A auf den Transport von GLUT4-enthaltenden Membranvesikeln wurde die Ratten-Kardiomyoblasten-Zelllinie H9c2 verwendet, die ein etabliertes Zellmodell zur funktionellen Charakterisierung von Herzmuskelzellen darstellt [Kimes & Brandt, 1976; Wiley & Beeson, 2002; Agnetti *et al.*, 2005]. Durch die stabile Überexpression des humanen Insulinrezeptors war die Insulin-stimulierte Glucoseaufnahme in den modifizierten Kardiomyoblasten (H9c2-E2-Zellen) im Vergleich zu H9c2-Zellen deutlich erhöht und entsprach der Situation in isolierten Muskelzellen [Hansen *et al.*, 1994; Yu *et al.*, 1999; Ha & Pak, 2005]. Die Expressionsanalyse von H9c2-E2-Zellen ergab eine marginale Expression von GLUT4, die die ermittelte Glucoseaufnahme sowohl im Basalzustand als auch unter Insulin-stimulierten Bedingungen nur unzureichend erklären kann. Deshalb wird vermutet, dass sowohl die basale als auch die Insulin-stimulierte Glucoseaufnahme überwiegend durch die Aktivität der Glucosetransporter GLUT1 und GLUT3 realisiert wurde, die in Herzmuskelzellen bzw. H9c2-(E2)-Zellen exprimiert werden und in diesen Zellen an der basalen und Insulin-stimulierten Glucoseaufnahme beteiligt sind [Wilson *et al.*, 1995; Fischer *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 1999]. In Herzmuskelzellen ist GLUT1 ebenso wie GLUT4 in Recycling-Endosomen lokalisiert, deren Translokation zur Plasmamembran durch Insulin stimuliert wird [Becker *et al.*, 2001].

Als zweites Zellsystem zur Analyse der Funktion von Rab11A wurden humane Skelettmuskelzellen verwendet, deren Wachstum als proliferierende Myoblasten und nachfolgende Differenzierung zu Myozyten durch Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe umfangreich dokumentiert sind [Dietze *et al.*, 2002; Dietze *et al.*, 2004].

GLUT4myc als Reporterkonstrukt bei Translokationsuntersuchungen

Für die Quantifizierung der Insulin-stimulierten Translokation von GLUT4 zur Plasmamembran wurde ein Reporterkonstrukt eingesetzt, das zur Überexpression eines modifizierten GLUT4-Proteins mit einem extrazellulär positionierten Myc-Epitop führte und dadurch spezifisch immundetektiert werden konnte. Zahlreiche Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen zeigten, dass GLUT4myc bezüglich der subzellulären Lokalisation, des intrazellulären Transports sowie der Insulin-stimulierten Translokation zur Plasmamembran und deren Hemmbarkeit sowohl in undifferenzierten als auch in differenzierten Zellen ebenso wie GLUT4 agiert und somit als ein adäquater Funktionsmarker des endogenen GLUT4-Proteins verwendet werden kann [Kanai *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1998 b; Ueyama *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 1999; Randhawa *et al.*, 2000]. Aufgrund der direkten Quantifizierung des Plasmamembran-assoziierten Glucosetransporters GLUT4myc repräsentieren die Ergebnisse der Translokationsuntersuchungen die Aktivität von GLUT4 exklusiv und ohne zusätzliche Effekte anderer Glucosetransporter.

Einfluss von Rab11A auf die basale Translokation von GLUT4myc

Die Überexpression von Rab11A und GLUT4myc reduzierte sowohl die Glucoseaufnahme als auch die Translokation von GLUT4myc zur Plasmamembran im Basalzustand der Kardiomyoblasten und primären Skelettmuskelzellen. Dieser Effekt ist spezifisch für die Wildtyp-Form von Rab11A, da die dominant-negative Mutante von Rab11A unter Basalbedingungen keinen Einfluss auf die beiden untersuchten Transportprozesse in den verwendeten Zellsystemen hatte. Diese Resultate weisen auf eine Beteiligung von Rab11A bei der intrazellulären Sequestrierung und Sortierung von GLUT4-enhaltenden Recycling-Endosomen in Insulin-sensitiven Zellen hin.

Rab11A ist in Recycling-Endosomen lokalisiert und wurde als Sortierprotein am Ausgang des Endosomalen Recycling-Kompartiments charakterisiert [Ullrich *et al.*, 1996; Green *et al.*, 1997; Wilcke *et al.*, 2000]. Für die Überprüfung dieses Befundes in Insulin-sensitiven Zellen wurde die intrazelluläre Membranpopulation von transfizierten H9c2-E2-Zellen fraktioniert, um die Lokalisation von GLUT4myc-enhaltenden Membranvesikeln in unterschiedlichen Kompartimenten nach der Überexpression von Rab11A und GLUT4myc zu charakterisieren.

Translokation und Vesikelkompartimente des Glucosetransporters GLUT4

Der Glucosetransporter GLUT4 ist im Basalzustand der Insulin-sensitiven Zellen als Resultat einer relativ schnell verlaufenden Endozytose und einer langsamen Exozytose zu 90 % in intrazellulären Vesikelkompartimenten lokalisiert [Sato *et al.*, 1993; Li *et al.*, 2001]. Etwa 30 - 40 % der Gesamtmenge von GLUT4 befinden sich in den Membranvesikeln des Endosomalen Recycling-Kompartiments, während der Rest in GLUT4-Speichervesikeln und im trans-Golgi-Netzwerk lokalisiert ist [Slot *et al.*, 1991; Livingstone *et al.*, 1996; Martin *et al.*, 1997]. Als eine GLUT4-enhaltende Vesikelpopulation wurden Recycling-Endosomen identifiziert, da der selektiv induzierte Verlust dieses Kompartiments in Zellen mit Transferrin-gekoppelter Peroxidase durch die Applikation von Wasserstoffperoxid zu einer Verringerung der Insulin-stimulierten Translokation von GLUT4 zur Plasmamembran führte [Livingstone *et al.*, 1996; Millar *et al.*, 1999; Zeigerer *et al.*, 2002]. Dadurch konnte die Hypothese verifiziert werden, dass das Endosomale Recycling-Kompartiment neben dem konstitutiven Transport von GLUT4 auch an der Insulin-stimulierten Translokation von GLUT4 zur Plasmamembran beteiligt ist.

Als Hauptkompartiment der Insulin-stimulierten Translokation von GLUT4 zur Plasmamembran wurden GLUT4-Speichervesikel identifiziert [Kandror & Pilch, 1996; Sheff *et al.*, 1999; Hashiramoto & James, 2000]. In dieser hochsensitiven Vesikelpopulation sind die für die Fusion mit der Plasmamembran relevanten SNARE-Proteine wie VAMP2 und Regulatorproteine wie Rab11A colokalisiert, jedoch nicht der Transferrinrezeptor als endosomales Markerprotein [Cain *et al.*, 1992; Malide *et al.*, 1997; Kessler *et al.*, 2000]. Die GLUT4-Speichervesikel enthalten außerdem die Insulin-regulierte Aminopeptidase, die als einziges Protein intrazellulär wie GLUT4 transportiert und nach einem Insulinstimulus ebenso wie GLUT4 zur Plasmamembran transloziert wird [Kandror & Pilch, 1994; Subtil *et al.*, 2000; Zeigerer *et al.*, 2002]. Die physiologische Funktion der Insulin-regulierten Aminopeptidase ist bisher noch unbekannt.

Die Existenz zweier distinkter GLUT4-enhaltender Vesikelpopulationen konnte auch in isolierten Herzmuskelzellen nachgewiesen werden [Fischer *et al.*, 1997; Zorzano *et al.*, 1997 b]. Nach einer Insulinstimulation werden die GLUT4-Speichervesikel der Herzmuskelzellen schnell und vollständig zur Plasmamembran transportiert, sodass sich der prozentuale Anteil von GLUT4 in der Plasmamembran von 10 auf 30 % erhöht [Becker *et al.*, 2001; Rudich & Klip, 2003]. Deshalb gilt diese Vesikelpopulation auch in Herzmuskelzellen als Hauptkompartiment der Insulin-stimulierten Translokation von GLUT4 zur Plasmamembran.

Undifferenzierte Zellen wie die verwendeten Kardiomyoblasten besitzen im Gegensatz zu differenzierten Zellen keine GLUT4-Speichervesikel, sondern nur Recycling-Endosomen als Kompartiment zur Translokation von GLUT4 zur Plasmamembran [Livingstone *et al.*, 1996; Martin *et al.*, 1996; Lampson *et al.*, 2000]. Lokalisationsuntersuchungen von differenzierten H9c2-Zellen ergaben, dass GLUT4 in zwei unterschiedlichen Vesikelkompartimenten akkumuliert, wobei das Verhältnis der jeweiligen Mengen von GLUT4, die Insulinsensitivität der GLUT4-enthaltenden Membranvesikel sowie die Assoziation weiterer Proteine wie VAMP2 der Situation in isolierten Primärzellen entsprachen [Herman *et al.*, 1994; Yu *et al.*, 1999].

Subzelluläre Lokalisation von GLUT4myc

Bei der durchgeführten Membranfraktionierung von GLUT4myc-transfizierten H9c2-E2-Zellen wurde ein Pool GLUT4myc-enthaltender Membranvesikel ermittelt. Dabei repräsentierten jene Fraktionen der Vesikelpopulation, die mit dem Transferrinrezeptor als endosomalem Markerprotein cosedimentierten, die Recycling-Endosomen. Allerdings konnte nur eine partielle Cosedimentation von GLUT4myc-enthaltenden Membranvesikeln und Recycling-Endosomen nachgewiesen werden. Diese Daten bestätigen Ergebnisse aus kinetischen Untersuchungen von undifferenzierten Zellen, die einen langsameren Verlauf des endozytotischen Recyclingprozesses von GLUT4 im Vergleich zu internalisierten Transferrinrezeptoren zeigten [Johnson *et al.*, 1998; Lampson *et al.*, 2000]. Ursächlich dafür ist die Sortierung von GLUT4 in spezifische Recycling-Endosomen während der letzten Phase innerhalb des Endosomalen Recycling-Kompartiments, sodass die Insulin-stimulierte Translokation von GLUT4 in undifferenzierten Zellen weitestgehend identisch mit der Situation in differenzierten Zellen ist [Bogan *et al.*, 2001; Lampson *et al.*, 2001].

Die Analyse der subzellulären Lokalisation von GLUT4myc-enthaltenden Membranvesikeln ergab, dass die Fraktionen, die mit TGN38 als Marker des trans-Golgi-Netzwerkes (und nicht mit dem Transferrinrezeptor) cosedimentierten, wahrscheinlich diese spezifischen Recycling-Endosomen darstellen und ähnlich wie die GLUT4-Speichervesikel der differenzierten Zellen durch das trans-Golgi-Netzwerk zur Plasmamembran transloziert werden. Somit stellen undifferenzierte Zellen wie H9c2-E2-Zellen ein sinnvolles Modell zur Untersuchung der Insulin-stimulierten Translokation des Glucosetransporters GLUT4 dar.

Unterschiedliche Regulation der Translokation von GLUT4 durch Rab4 und Rab11A

Die Akkumulation des Glucosetransporters GLUT4 in GLUT4-Speichervesikel-ähnlichen Recycling-Endosomen bzw. im trans-Golgi-Netzwerk durch die Überexpression von Rab11A führte nicht zu einer Zunahme der Insulinwirkung bei der Translokation von GLUT4 zur Plasmamembran im Vergleich zu Kontrollzellen. Überraschenderweise verringerte die Überexpression von Rab11A N124I die Insulin-stimulierte Translokation von GLUT4myc zur Plasmamembran um 60 %. Dieser Befund ist vergleichbar mit Ergebnissen aus Untersuchungen mit der dominant-negativen Mutante von Rab4, die ebenfalls eine Inhibition der Translokation von GLUT4-Speichervesikeln zur Plasmamembran in Insulin-stimulierten Zellen ergaben [Vollenweider *et al.*, 1997].

Rab4 ist neben Rab11A an der Regulation des intrazellulären Transports von GLUT4-enthaltenden Membranvesikeln in Muskel- und Fettzellen beteiligt [Cormont *et al.*, 1996 a; Dransfeld *et al.*, 2000]. Im Gegensatz zu Rab11A ist Rab4 in Frühen Endosomen lokalisiert und reguliert die Entstehung von Recycling-Endosomen, sodass beide Rab-Proteine komplementäre Funktionen innerhalb des Endosomalen Recycling-Kompartiments ausüben [Daro *et al.*, 1996; Sheff *et al.*, 2002; Pagano *et al.*, 2004]. Diese Hypothese wird durch Befunde unterstützt, wonach die Insulinstimulation zu einer Erhöhung der Menge von Rab11A in GLUT4-enthaltenden Membranvesikeln führt [Kessler *et al.*, 2000]. Für Rab4 wurde ein gegenteiliger Effekt nachgewiesen [Aledo *et al.*, 1995; Sherman *et al.*, 1996]. Die Ergebnisse neuester Untersuchungen der subzellulären Lokalisation von GLUT4-enthaltenden Membranvesikeln in 3T3-L1-Fettzellen, bei denen nach einer Membranfraktionierung eine überraschend geringe Menge von Rab4 nachgewiesen wurde, führten zu generellen Spekulationen bezüglich der postulierten Lokalisation von Rab4 in GLUT4-enthaltenden Membranvesikeln von Fettzellen [Cormont *et al.*, 1996 a; Larance *et al.*, 2005].

Verteilerfunktion von Rab11A beim intrazellulären Transport von GLUT4

Untersuchungen von HeLa-Zellen und 3T3-L1-Fettzellen zeigten, dass Rab11A als Sortierprotein den Austritt von Membranvesikeln aus dem Endosomalen Recycling-Kompartiment bzw. den Transport von GLUT4 aus Recycling-Endosomen in GLUT4-Speichervesikel reguliert [Wilcke *et al.*, 2000; Zeigerer *et al.*, 2002]. Die durchgeführte Analyse der subzellulären Lokalisation von GLUT4myc-enthaltenden Membranvesikeln in Insulinsensitiven Muskelzellen bestätigte die postulierte Verteilerfunktion von Rab11A, da die Überexpression der dominant-negativen Mutante Rab11A N124I zu einer Verschiebung des

Sedimentationsverhaltens der GLUT4myc-enthaltenden Membranvesikel führte. Dabei erhöhte sich der Anteil von GLUT4myc, der mit dem Transferrinrezeptor als Markerprotein der Recycling-Endosomen cosedimentierte. Außerdem nahm die Menge von GLUT4myc zu, die mit TGN38, dem Markerprotein des trans-Golgi-Netzwerkes, colokalisiert war. Dieser Befund bestätigt somit auch die Hypothese, dass Rab11A an der Regulation des Vesikeltransports aus dem Endosomalen Recycling-Kompartiment in das trans-Golgi-Netzwerk beteiligt ist [Chen *et al.*, 1998; Wilcke *et al.*, 2000].

Interessanterweise sind die Subdomänen des trans-Golgi-Netzwerkes, in denen TGN38 lokalisiert ist, nicht an der intrazellulären Translokation von GLUT4 beteiligt [Shewan *et al.*, 2003; Karylowski *et al.*, 2004]. Eine veränderte Umverteilung von GLUT4-enthaltenden Membranvesikeln in dieses Insulin-insensitive Subkompartiment durch Rab11A N124I führt deshalb zu einer verringerten Menge von GLUT4-Speichervesikeln, die nach einer Insulinstimulation zur Plasmamembran transloziert werden. Untersuchungen des trans-Golgi-Netzwerkes ergaben eine Beteiligung anderer Subdomänen am intrazellulären Transport von GLUT4-enthaltenden Membranvesikeln [Martin *et al.*, 2000; Ramm *et al.*, 2000; Govers *et al.*, 2004].

Ein attraktives Modell der Insulin-stimulierten Translokation von GLUT4 zur Plasmamembran in Herzmuskelzellen beschreibt einen retrograden Transport des Glucosetransporters aus den GLUT4-Speichervesikeln [Becker *et al.*, 2001]. Ergebnisse aus *in vitro* - Translokationsuntersuchungen belegen, dass sämtliche GLUT4-Speichervesikel nach einer primären Insulinstimulation vollständig und direkt zur Plasmamembran transportiert werden. Im Gegensatz dazu werden die GLUT4-enthaltenden Membranvesikel des Endosomalen Recycling-Kompartiments nur nach einer erneuten, unmittelbar folgenden Insulinstimulation zur Plasmamembran transportiert [Fischer *et al.*, 1997; Becker *et al.*, 2001]. Als mögliche Ursache dieser Befunde wurden zwei Wirkungen von Insulin unter Berücksichtigung der beiden distinkten GLUT4-enthaltenden Vesikelkompartimente postuliert. Während der Primärstimulation werden die GLUT4-Speichervesikel (mindestens partiell) in das Endosomale Recycling-Kompartiment transloziert, um von hier aus nach dem sekundären Hormonstimulus direkt zur Plasmamembran zu gelangen [Becker *et al.*, 2001]. Dieses Modell konnte durch Ergebnisse aus Untersuchungen von Fettzellen erweitert werden, die eine bidirektionale Translokation von GLUT4 zwischen Endosomalem Recycling-Kompartiment und GLUT4-Speichervesikeln belegen [Govers *et al.*, 2004; Karylowski *et al.*, 2004]. Möglicherweise wird dieses dynamische Gleichgewicht durch die Überexpression von

Rab11A verschoben, da die Rab-GTPase die GLUT4-enhaltenden Membranvesikel am Ausgang des Endosomalen Recycling-Kompartiment sortiert.

Außerdem kann der Verlust der Verteilerfunktion von Rab11A, der zu einer Translokation von GLUT4-enhaltenden Membranvesikeln in Insulin-insensitive Kompartimente führt, als Ursache für die verringerte Menge von GLUT4 in der Plasmamembran nach einer Insulinstimulation angenommen werden (siehe Abb. 27, S. 150).

Eine kompensatorische Wirkung der Rab11-Isoform Rab11B erscheint aufgrund der Sequenzunterschiede zu Rab11A und der daraus resultierenden unterschiedlichen subzellulären Lokalisation unwahrscheinlich. Sämtliche Sequenzunterschiede zwischen beiden Rab11-Isoformen liegen in der carboxyterminalen Region, die als Signalsequenz für die Assoziation mit spezifischen Membranvesikeln agiert [Chavrier *et al.*, 1991; Zhu *et al.*, 1994]. So ergaben Untersuchungen von polarisierten Zellen, dass Rab11A und Rab11B durch ihre Lokalisation in distinkten Vesikelkompartimenten an der Regulation unterschiedlicher Transportprozesse beteiligt sind [Lapierre *et al.*, 2003].

Einfluss der dominant-negativen Mutante Rab11A N124I auf den Transport von GLUT4

Beinahe alle Proteine aus der Superfamilie der Kleinen GTP-bindenden Proteine besitzen eine hochkonservierte Domäne für die Guaninnukleotid-Bindung [Dever *et al.*, 1987]. Die Substitution des Asparagin-Restes (in Rab11A: Position 124) innerhalb dieser Domäne (in Rab11A: Gly123 - Asp127) führt zu einem Verlust der Guaninnukleotid-Bindung, sodass das mutierte Protein als dominant-negative Variante des Rab-Proteins agiert.

Die Überexpression der dominant-negativen Mutante von Rab5 (Rab5 N133I) induzierte eine vollständige Hemmung der Endozytose sowie homotypischer Fusionen von Endosomen [Li & Stahl, 1993; Woodman, 2000]. Die dominant-negative Mutante von Rab4 (Rab4 N121I) führte zu einer Inhibition der Insulin-stimulierten Translokation von GLUT4 zur Plasmamembran in Insulin-sensitiven Zellen. Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Befunde belegen einen ähnlichen Effekt der dominant-negativen Mutante von Rab11A sowohl in Kardiomyoblasten als auch in primären Skelettmuskelzellen.

Die Überexpression der dominant-negativen Mutante von Rab11A (Rab11A N124I) führte zu einer verringerten Insulinwirkung, die im Vergleich zur Kontrolle um mehr als 60 % reduziert war. Dieser Effekt kann durch mehrere Ursachen hervorgerufen werden. Rab11A agiert als Sortierprotein der GLUT4-enhaltenden Membranvesikel beim Austritt aus dem

Endosomalen Recycling-Kompartiment [Wilcke *et al.*, 2000; Zeigerer *et al.*, 2002]. Ein detailliertes Modell zur Beschreibung des intrazellulären Vesikeltransports charakterisiert Endosomen als ein Mosaik unterschiedlicher funktionaler Membrandomänen [Sönnichsen *et al.*, 2000]. Dabei werden die morphologisch distinkten Membrandomänen durch die dynamische Assoziation der Rab-Proteine Rab4, Rab5 bzw. Rab11A und deren Bindung von Rab-spezifischen Effektorproteinen generiert. Die Überexpression der dominant-negativen Mutante von Rab11A könnte diese Domänenstruktur verändern, sodass der Transport endozytierter Rezeptoren oder Transportproteine wie GLUT4 fehlgeleitet wird. Die Ergebnisse der durchgeführten subzellulären Lokalisation von GLUT4myc-enthaltenden Membranvesikeln nach der Überexpression von Rab11A N124I unterstützen diese Hypothese. Durch den Einfluss der dominant-negativen Mutante von Rab11A kommt es zu einer Aufspaltung des singulären Pools von GLUT4myc-enthaltenden Membranvesikeln und zur Entstehung eines Insulin-insensitiven Pools, der mit dem Markerprotein des Golgi-Apparates cosedimentiert. Die basale Translokation von GLUT4myc in Kardiomyoblasten und Skelettmuskelzellen blieb nach der Überexpression von Rab11A N124I im Vergleich zu Kontrollzellen unverändert. Deshalb kann vermutet werden, dass der postulierte Fehltransport nach dem Austritt der GLUT4-enthaltenden Membranvesikel aus dem Endosomalen Recycling-Kompartiment stattfindet (siehe Abb. 27, S. 150).

Zusätzlich zum Fehltransport der GLUT4-enthaltenden Membranvesikel kann durch die dominant-negative Mutante von Rab11A auch das Andocken an die Plasmamembran gestört werden, das die Rab-GTPase ebenfalls reguliert [Savina *et al.*, 2005]. Die Überexpression von Rab11A N124I führte im Vergleich zu Kontrollzellen nur in Insulin-stimulierten Kardiomyoblasten und Skelettmuskelzellen zu einer Verringerung der Plasmamembran-assoziierten Menge von GLUT4. Deshalb kann eine mögliche Störung der Membranfusion von GLUT4-enthaltenden Membranvesikeln mit der Plasmamembran durch die dominant-negative Mutante von Rab11A auf das Kompartiment der GLUT4-Speichervesikel begrenzt werden. GLUT4-enthaltende Membranvesikel, die durch das Endosomale Recycling-Kompartiment konstitutiv zur Plasmamembran transloziert werden, sind von dieser Wirkung der dominant-negativen Mutante von Rab11A nicht betroffen.

Interaktion von Rab11A mit Rab11-spezifischen Effektorproteinen

Die reduzierte Menge von GLUT4 in der Plasmamembran von Insulin-stimulierten Zellen nach der Überexpression der dominant-negativen Mutante von Rab11A kann auch durch

eine gestörte Interaktion von Rab11A N124I mit Rab11-spezifischen Effektorproteinen hervorgerufen werden. Für die Bindung der Rab11-spezifischen Effektorproteine ist die Konformation der GTP-gebundenen Form von Rab11A essentiell, die durch den Verlust der Guaninnukleotid-Bindungsstelle in der dominant-negativen Mutante von Rab11A nicht mehr vorhanden ist [Lapierre *et al.*, 2001; Hales *et al.*, 2002]. Rab11-spezifische Effektorproteine regulieren den Transport von Rab11A-enthaltenden Membranvesikeln und deren Fusion mit der Plasmamembran durch die Bindung von akzessorischen Proteinen [Mammoto *et al.*, 1999; Prekeris *et al.*, 2000; Lindsay & McCaffrey, 2002].

So reguliert der Komplex aus Rab11A und dem Rab11-spezifischen Effektorprotein RCP die Sortierung von Membranvesikeln, in denen der Transferrinrezeptor zur Plasmamembran transloziert wird [Peden *et al.*, 2004]. Untersuchungen von Insulin-sensitiven Zellen zeigten, dass die Proteinkinase B, ein Effektorprotein der Phosphatidylinositol-3-Kinase-vermittelten Insulinsignalkaskade, entlang des Aktin-Zytoskeletts in GLUT4-Speichervesikel transloziert wird [Kupriyanova & Kandror, 1999; Peyrollier *et al.*, 2000]. Das Rab11-spezifische Effektorprotein Rab11-FIP2 agiert als Brückenprotein und bindet sowohl Rab11A als auch Myosin Vb, das Motorprotein des Aktin-Zytoskeletts, dessen Aktivität die Translokation der Membranvesikeln zur Plasmamembran ermöglicht [Prekeris *et al.*, 2000; Lindsay & McCaffrey, 2002; Volpicelli *et al.*, 2002]. Außerdem sind die Rab11-spezifischen Effektorproteine Rab11-FIP2, RCP und Rip11 mit der Proteinkinase B colokalisiert und werden zur Plasmamembran transloziert [Lindsay & McCaffrey, 2004; Marie *et al.*, 2005]. Die Insulin-stimulierte Translokation der Proteinkinase B ist bei Patienten mit Typ 2-Diabetes und in Zellen der verwendeten Kardiomyoblasten-Zelllinie H9c2 mit induzierter Insulinresistenz verringert [Carvalho *et al.*, 2000; Ha & Pak, 2005]. Die Resultate dieser Untersuchungen bestätigen damit den im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhobenen Befund, dass die Reduktion der Insulin-stimulierten Translokation von GLUT4 zur Plasmamembran nach der Überexpression von Rab11A N124I unabhängig vom Phosphorylierungsstatus der Proteinkinase B ist [Ha & Pak, 2005].

Ergebnisse neuester Untersuchungen belegen, dass mit Rab2A, Rab8A, Rab10 und Rab14 weitere Rab-Proteine neben den bisher bekannten Rab4, Rab5 und Rab11A in GLUT4-enthaltenden Membranvesikeln lokalisiert sind [Larance *et al.*, 2005; Miinea *et al.*, 2005]. Bisher sind die Funktionen von Rab2A, Rab8A, Rab10 und Rab14 innerhalb des Transports von GLUT4-enthaltenden Membranvesikeln unklar. Überraschenderweise sind die neu lokalisierten Rab-Proteine auch Substrate von AS160, das eine Rab-GTPase-

aktivierende Domäne besitzt und als Effektorprotein der Phosphatidylinositol-3-Kinase-vermittelten Insulinsignalkaskade agiert [Kane *et al.*, 2002; Miinea *et al.*, 2005]. Nach einer Insulinstimulation wird AS160 durch die proximal agierende Proteinkinase B phosphoryliert. Diese Aktivierung ist in Skelettmuskelzellen von Patienten mit Typ 2-Diabetes stark reduziert [Karlsson *et al.*, 2005]. Möglicherweise ergibt die weitere Untersuchung der Substrate von AS160 eine Verknüpfung zwischen Insulinsignaltransduktion und Translokation von GLUT4 zur Plasmamembran.

Rab11A stellt kein Substrat von AS160 dar, sodass eine direkte Interaktion dieser Rab-GTPase mit diesem Effektorprotein der Insulinsignalkaskade ausgeschlossen werden kann. Unabhängig davon erscheint die Fragestellung attraktiv, ob Rab11-spezifische Effektorproteine als Brückenproteine andere (aktivierte) Rab-Proteine und Rab11A simultan bzw. sukzessiv binden und somit Rab11A in die Insulinsignaltransduktion integrieren können. Bisher sind mehrere Beispiele für die Bindung verschiedener Rab-Proteine durch ein Rab-spezifisches Effektorprotein beschrieben worden. So bindet Rabaptin-5 sukzessiv Rab5 und Rab4 in distinkten Domänen und reguliert dadurch sowohl den Transport der Frühen Endosomen als auch die Entstehung der Recycling-Endosomen [Vitale *et al.*, 1998; Pagano *et al.*, 2004]. Für Rab11-spezifische Effektorproteine wie Rab11-FIP2, Rab11-FIP3 und Rab11-FIP4 konnte eine generelle Funktion als Brückenprotein bereits nachgewiesen werden [Chavier & Goud, 1999; Prekeris *et al.*, 2000; Hickson *et al.*, 2003]. Eine weitere grundsätzliche Möglichkeit der Signaltransduktion und ihrer Verknüpfung mit Transportprozessen ergibt sich aus initialen Untersuchungen der Bindungsdomänen von Rab11A für akzessorische Proteine. Bisher wurden zwei distinkte Domänen identifiziert, sodass Rab11A simultan mit zwei Rab11-spezifischen Effektorproteinen oder in einer Kombination mit einem Rab11-spezifischen Effektorprotein und einem Rab-spezifischen Regulatorprotein interagieren kann [Pasqualato *et al.*, 2004].

Mit PIKfyve wurde ein weiteres Effektorprotein der Phosphatidylinositol-3-Kinase-vermittelten Insulinsignalkaskade als Substrat der Proteinkinase B identifiziert [Welsh *et al.*, 2005]. Interessanterweise ist dieses Effektorprotein in GLUT4-enthaltenden Membranvesikeln lokalisiert, die aus dem Endosomalen Recycling-Kompartiment in das trans-Golgi-Netzwerk transloziert werden, und beschleunigt die Sortierung in GLUT4-Speichervesikel. Mögliche Interaktionspunkte von PIKfyve mit Rab11A, das diese Sortierung ebenfalls reguliert, sind zur Zeit nur spekulativ.

Modelle der Insulinwirkung

Untersuchungen von Herz- bzw. Skelettmuskelzellen bestätigten das aus der Analyse von Fettzellen erhaltene Zwei-Schritt-Modell der Insulinwirkung, bei dem Insulin sowohl den interendosomalen Transport von Recycling-Endosomen als auch die Translokation von GLUT4 aus den GLUT4-Speichervesikeln stimuliert [Becker *et al.*, 2001; Foster *et al.*, 2001]. Dieses Modell der Insulin-stimulierten Translokation von GLUT4 konnte durch eine weiterführende Charakterisierung von Muskelzellen, u.a. durch Einbeziehung des Aktin-Zytoskeletts als zellulärer Matrix des Transports von GLUT4-enthaltenden Membranvesikeln, erweitert werden [Rudich & Klip, 2003]. Dabei wurde die beschleunigte Insulin-stimulierte Translokation von GLUT4 durch das Endosomale Recycling-Kompartiment („Push“) mit der Translokation der GLUT4-Speichervesikel entlang des umformierten Aktin-Zytoskeletts („Pull“) verknüpft. Dieser „Push ´n Pull“-Mechanismus kann somit einen Ausschnitt der lokal und temporal koordinierten Interaktionen von Effektorproteinen der Insulinsignalkaskade und morphologischen Veränderungen des Zytoplasmas erklären, die die Translokation von GLUT4 zur Plasmamembran ermöglichen.

Ein weiteres zusammenfassendes Modell der Regulation der Insulin-stimulierten Translokation von GLUT4 wurde kürzlich publiziert und postuliert vier Regulationspunkte von Insulin: die Translokation der GLUT4-Speichervesikel als Hauptfunktion, die Reduktion des endozytotischen Transports bei der Aufnahme von GLUT4 in Frühe Endosomen, die Steigerung des (konstitutiven) Transports von Recycling-Endosomen zur Plasmamembran sowie die Stimulation des interendosomalen Transports und der Sortierung von GLUT4 aus Transferrin-enthaltenden Recycling-Endosomen [Welsh *et al.*, 2005]. Zusätzlich existieren Befunde, die die Regulation der Fusion von GLUT4-enthaltenden Membranvesikeln mit der Plasmamembran belegen [Inoue *et al.*, 2003].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zum Einfluss von Rab11A auf die Insulin-stimulierte Glucoseaufnahme und Translokation von GLUT4 zur Plasmamembran können gut in die beschriebenen Modelle integriert werden und sind in Abb. 27 (S. 150) schematisch dargestellt. Sowohl in Kardiomyoblasten als auch in primären Skelettmuskelzellen agiert Rab11A als Sortierprotein am Ausgang des Endosomalen Recycling-Kompartiments, der einen der insgesamt fünf postulierten Regulationspunkte von Insulin beim intrazellulären Transport von GLUT4-enthaltenden Membranvesikeln darstellt. Die erhaltenen Befunde zeigen, dass der Verlust der Verteilerfunktion von Rab11A durch die Überexpression der dominant-negativen Mutante Rab11A N124I zu einer Umverteilung der GLUT4-enthaltenden Membranvesikel in Insulin-insensitive Kompartimente führt.

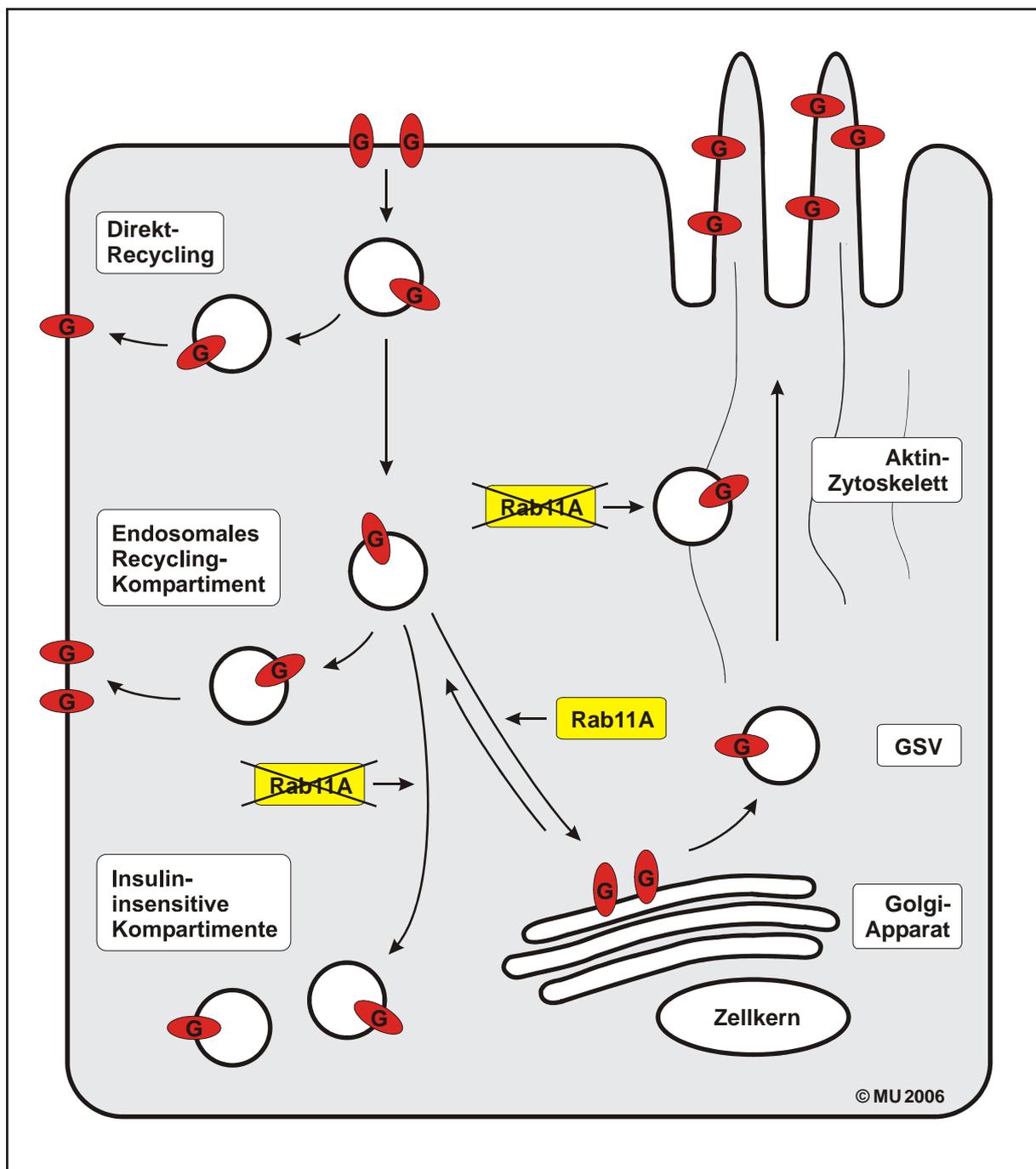


Abb. 27 Interaktion von Rab11A bei der intrazellulären Translokation des Glucosetransporters GLUT4 in Muskelzellen (Modell).

Der Glucosetransporter GLUT4 zirkuliert in einem konstitutiven Kreislauf zwischen Plasmamembran und intrazellulären Vesikelkompartimenten. Nach der Internalisierung und dem Transfer in Frühen Endosomen kann das Transportprotein direkt zur Plasmamembran transloziert werden (Direkt-Recycling) oder in einer weiterführenden Endozytose durch das Endosomale Recycling-Kompartiment und anschließender Exozytose zur Plasmamembran transportiert werden. Die Überexpression von Rab11A, das als Sortierprotein am Ausgang des

Endosomalen Recycling-Kompartiments agiert, führt zu einer verstärkten Sequestrierung von GLUT4-enthaltenden Membranvesikeln aus der Plasmamembran. Der Verlust der Verteilerfunktion von Rab11A nach Überexpression der dominant-negativen Mutante Rab11A N124I induziert die Translokation der GLUT4-enthaltenden Membranvesikel in Insulin-insensitive Kompartimente sowie in Subdomänen des trans-Golgi-Netzwerkes, die ebenfalls Insulin-insensitiv sind. Durch die Inhibition der Bindung von Rab11-spezifischen Effektorproteinen an Rab11A N124I und der nachfolgenden Assoziation von Motorproteinen des Aktin-Zytoskeletts sowie Membranproteinen, die das Andocken und die Fusion von Membranvesikeln koordinieren, wird die Insulin-stimulierte Translokation von GLUT4-Speichervesikeln zur Plasmamembran inhibiert (G, GLUT4; GSV, GLUT4-Speichervesikel).

Gemäß des retrograden Transportmodells und der dynamischen bidirektionalen Umverteilung zwischen Endosomalem Recycling-Kompartiment und trans-Golgi-Netzwerk werden die GLUT4-enthaltenden Membranvesikel in das Endosomale Recycling-Kompartiment transloziert. Aufgrund der postulierten Verteilerfunktion von Rab11A wird diese Vesikelpopulation durch die Rab-GTPase ebenfalls am Ausgang des Endosomalen Recycling-Kompartiments sortiert und die Menge der GLUT4-enthaltenden Membranvesikel bereits unter Basalbedingungen reduziert. Membranvesikel, die den konstitutiven Glucosetransporter GLUT1 enthalten und durch das Endosomale Recycling-Kompartiment zur Plasmamembran transloziert werden, sind davon nicht betroffen.

Die Überexpression der dominant-negativen Mutante von Rab11A führte zu einer Inhibition der Insulinwirkung, die durch eine Blockade der GLUT4-enthaltenden Membranvesikel nach dem Austritt aus dem Endosomalen Recycling-Kompartiment vor oder innerhalb des trans-Golgi-Netzwerkes entsteht. Durch die Assoziation von Motorproteinen des Aktin-Zytoskeletts und von Membranproteinen, die das Andocken und die Fusion von Rab11A-enthaltenden Membranvesikeln koordinieren, an Rab11-spezifische Effektorproteine ergeben sich weitere Interaktionspunkte von Rab11A bei der Regulation der Insulin-stimulierten Translokation von GLUT4 zur Plasmamembran. Damit kann Rab11A neben der Koordination endozytotischer Vesikeltransporte auch exozytotische Transportprozesse in Insulin-sensitiven Zellen regulieren.

4.2 Enzymatische Aktivität von Rab11A

Die Untersuchungen der Insulin-stimulierten Glucoseaufnahme und Translokation von GLUT4 sowie die Analyse der subzellulären Lokalisation des Glucosetransporters wurden in Kardiomyoblasten und humanen Skelettmuskelzellen nach der Überexpression von GLUT4myc und Rab11A durchgeführt. Das Rab-Protein gehört zur Superfamilie der Kleinen

GTP-bindenden Proteine und katalysiert die enzymatische Hydrolyse von gebundenem Guanosin-5'-triphosphat (GTP) in Guanosin-5'-diphosphat (GDP) und anorganisches Phosphat. Charakteristisch für die Proteine dieser Superfamilie sind hochkonservierte Regionen, die die Formation des katalytischen Zentrums, die Nukleotidbindung, die Orientierung des reagierenden Wassermoleküls, die Positionierung des Magnesiumions als Kofaktor sowie die Assoziation von spezifischen Regulator- und Effektorproteinen realisieren [Bourne *et al.*, 1991; Paduch *et al.*, 2001].

PM3-Motiv als katalytisch-aktive Domäne der Rab-Proteine

Das vollständig konservierte PM3-Motiv Asp-Thr-Ala-Gly-Gln-Glu (in Rab11: Position 66 - 71) ist für den Konformationswechsel zwischen der aktiven und inaktiven Form der Rab-GTPasen essentiell [Vetter & Wittinghofer, 2001]. Der Glutamin-Rest des PM3-Motivs (in Rab11: Position 70) agiert bei der Hydrolyse von GTP als katalytische Base, da die Carboxamidgruppe das nukleophile Wassermolekül polarisiert [Schweins *et al.*, 1995; Berghuis *et al.*, 1996]. Außerdem positioniert der Glutamin-Rest das Wassermolekül für die Hydrolyse und stabilisiert den bipyramidalen pentavalenten Übergangszustand, bevor der Transfer der negativen Ladung von der γ - auf die β -Phosphatgruppe von GTP stattfindet und die Bindung zwischen beiden Phosphatgruppen hydrolysiert wird [Frech *et al.*, 1994; Maegley *et al.*, 1996]. Die Substitution des Glutamin-Restes gegen einen Leucin-Rest führt zu einem Verlust der enzymatischen Aktivität und stellt ein etabliertes Modell zur Herstellung konstitutiv-aktiver Varianten von Proteinen aus der Superfamilie der Kleinen GTP-bindenden Proteine dar [Der *et al.*, 1986; Haubruck & McCormick, 1991; Takai *et al.*, 2001].

Substitution des Glutamin-Restes des PM3-Motivs in Proteinen der Rab11-Subfamilie

Bei der Sequenzierung der endogenen Rab11A-cDNA von Zellen der verwendeten Kardiomyoblasten-Zelllinie H9c2 wurde eine Mutation detektiert, die zu einer Aminosäure-Substitution (Q \rightarrow R) an Position 70 von Rab11A führte. Interessanterweise ergab die Bestimmung der enzymatischen Aktivität dieser Variante von Rab11A, Rab11A Q70R, keine Änderung der GTPase-Aktivität im Vergleich zur Wildtyp-Variante Rab11A Q70. Der Verlust der Carboxamidgruppe des Glutamin-Restes und die Einführung des Arginin-Restes haben somit keinen Einfluss auf die enzymatische Aktivität von Rab11A.

Dieses Ergebnis ist erstaunlich, da die Position 70 von zentraler Bedeutung bei der enzymatischen Hydrolyse von GTP ist und die Einführung des Arginin-Restes mit einer

basischen Guanidino-Gruppe zu einer Änderung der Raumstruktur und Ladungsverhältnisse des katalytischen Zentrums führt. Zusätzlich wurde durch die Bestimmung der enzymatischen Aktivität von Rab11A Q70L der generelle Mutationstyp (Q → L) der konstitutiv-aktiven Varianten der Rab-Proteine und aller weiteren Proteine aus der Superfamilie der Kleinen GTP-bindenden Proteine bestätigt.

Interessanterweise existieren Befunde, die eine Revision der Relevanz des Glutamin-Restes innerhalb des PM3-Motivs bei der enzymatischen Hydrolyse der Rab-Proteine induzieren [Casanova *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2000; Pasqualato *et al.*, 2004]. Untersuchungen mit zytosolischen Fraktionen als Aktivator der enzymatischen Hydrolyse von GTP ergaben im Gegensatz zu den im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnissen keinen Unterschied zwischen der GTPase-Aktivität von Rab11A Q70 (Wildtyp) und der konstitutiv-aktiven Variante Rab11A Q70L [Casanova *et al.*, 1999]. In Rab25, einem weiteren Protein der Rab11-Subfamilie, ist an der korrespondierenden Position 71 bereits im Wildtyp-Protein ein Leucin-Rest positioniert [Goldenring *et al.*, 1993]. Diese Situation ist einzigartig unter allen bisher bekannten Proteinen der Superfamilie der Kleinen GTP-bindenden Proteine und hat ebenfalls keinen Einfluss auf die enzymatische Aktivität des Rab-Proteins [Casanova *et al.*, 1999].

Die Aufklärung dieser divergierenden Befunde ist derzeit Gegenstand intensiver röntgenkristallographischer und biochemischer Untersuchungen und führte zu dem Modell der Substrat-assistierten Katalyse als Alternative zu der bisher postulierten nukleophilen Substitution [Maegley *et al.*, 1996; Pasqualato *et al.*, 2004; Pasqualato & Cherfils, 2005]. Innerhalb des derzeit präferierten Modells agiert GTP selbst als Base und induziert ein Protonentransfer von dem beteiligten Wassermolekül auf das Brückensauerstoffatom zwischen der GTP-β- und γ-Phosphatgruppe, sodass der bipyramidale pentavalente Übergangszustand durch Niedrig-Barrieren-Wasserstoffbindungen stabilisiert wird [Schiott *et al.*, 1998; Pasqualato & Cherfils, 2005]. Möglicherweise verliert dadurch der spezifische Charakter des Glutamin-Restes (in Rab11: Position 70 / in Rab25: Position 71) an Bedeutung, sodass die Substitution des Glutamin-Restes durch einen Arginin-Rest wie in Rab11A aus der verwendeten Kardiomyoblasten-Zelllinie H9c2 oder eines Leucin-Restes wie in Rab25 keinen Einfluss auf die enzymatische Aktivität der Proteine der Rab11-Subfamilie oder weiterer Rab-Proteine hat.

Für die vollständige Charakterisierung und zusammenhängende Beschreibung des Reaktionsmechanismus der enzymatischen Hydrolyse von GTP durch die Proteine

der Rab11-Subfamilie und anderer Rab-Proteine sowie der Interaktion mit Regulatorproteinen wie den Rab-spezifischen GTPase-aktivierenden Proteinen sind weitere Mutationsanalysen, zellbiologische Experimente und Röntgenkristallstruktur-Untersuchungen erforderlich.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Eine der größten Herausforderungen der Medizin ist die Therapie der Volkskrankheit Diabetes mellitus. Dieses Problem wird in den kommenden Jahrzehnten weiter zunehmen, da sich die Zahl der diagnostizierten Diabetes-Patienten in den nächsten drei Dekaden auf weltweit ca. 400 Millionen Menschen verdoppeln wird. Die überwiegende Mehrheit der betroffenen Patienten erkrankt an Typ 2-Diabetes, der durch eine vererbte oder erworbene Insulinresistenz und eine Störung der Insulinsekretion im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung charakterisiert ist. In Insulin-resistenten Zellen ist die Translokation des Glucosetransporters GLUT4 zur Plasmamembran nach einer Insulinstimulation während der postprandialen Phase stark vermindert. Für das Verständnis der Pathogenese des Typ 2-Diabetes und die Entwicklung möglicher Therapieansätze ist deshalb vor allem die detaillierte Charakterisierung der molekularen Interaktionen während der Insulinsignaltransduktion und der Verknüpfung der Signalkaskade mit dem intrazellulären Transport des Glucosetransporters GLUT4 in den Insulin-sensitiven Zellen des Muskel- und Fettgewebes erforderlich.

Für die Regulation des intrazellulären Transports von GLUT4-enthaltenden Membranvesikeln sind Rab-Proteine von zentraler Bedeutung. Diese Kleinen GTP-bindenden Proteine können aufgrund ihrer interkonvertiblen Konformationen zwischen Membranvesikeln und Zytosol zirkulieren und dadurch den endo- und exozytotischen Vesikeltransport sowie die Fusion mit der Plasmamembran koordinieren. Mehrere dieser Rab-Proteine sind in GLUT4-enthaltenden Membranvesikeln colokalisiert, u.a. auch Rab11A, das nach einer Insulinstimulation in die Vesikel transloziert wird. Deshalb war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, den Einfluss von Rab11A auf die Insulin-stimulierte Translokation von GLUT4-enthaltenden Membranvesikeln in Ratten-Kardiomyoblasten und humanen Skelettmuskelzellen zu untersuchen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit aus Untersuchungen der Insulin-stimulierten Glucoseaufnahme und Translokation von GLUT4 zur Plasmamembran sowie der subzellulären Lokalisation von GLUT4-enthaltenden Membranvesikeln zeigen, dass Rab11A an der Sequestrierung des Glucosetransporters beteiligt ist und eine Verteilerfunktion am Ausgang des Endosomalen Recycling-Kompartiments in Insulin-sensitiven Muskelzellen besitzt. Die Überexpression von Rab11A führte innerhalb des konstitutiven Recyclingprozesses der GLUT4-enthaltenden Membranvesikel zu einer Umverteilung dieser Vesikelpopulation nach dem Austritt aus dem Endosomalen Recycling-Kompartiment und vor der Translokation zur Plasmamembran.

Die Verteilerfunktion von Rab11A hatte keinen Einfluss auf die Insulin-stimulierte Translokation von GLUT4 zur Plasmamembran. GLUT4-Speichervesikel stellen die Hauptkomponente der GLUT4-enthaltenden Membranvesikel bei der Insulin-stimulierten Translokation von GLUT4 zur Plasmamembran dar und befinden sich in einem dynamischen Gleichgewicht zwischen Endosomalem Recycling-Kompartiment und trans-Golgi-Netzwerk. Die Überexpression der dominant-negativen Mutante von Rab11A führte zu einer Reduktion der Insulinwirkung, da der Verlust der GTP-Bindungsstelle bei Rab11A N124I eine Translokation von GLUT4-enthaltenden Membranvesikeln in Insulin-insensitive Kompartimente induziert und die Bindung akzessorischer Proteine wie der Rab-spezifischen Regulatorproteine bzw. der Rab11-spezifischen Effektorproteine inhibiert. Diese Proteine regulieren die Aktivität von Rab11A und vermitteln die Wirkung des Rab-Proteins innerhalb des Aktin-Zytoskeletts sowie während der Fusion von Membranvesikeln.

Die Untersuchungen zum Einfluss von Rab11A auf die Insulin-stimulierte Translokation von GLUT4 ergaben, dass die Rab-GTPase in Insulin-sensitiven Muskelzellen als Sortierprotein am Ausgang des Endosomalen Recycling-Kompartiments agiert und somit endozytotische Transportprozesse reguliert. Außerdem kann aufgrund der Wirkung der dominant-negativen Mutante von Rab11A eine Beteiligung der Rab-GTPase an der Regulation des exozytotischen Vesikeltransports postuliert werden.

Die Klärung der sich aus den oben genannten Befunden und Hypothesen ergebenden Fragestellungen wie die unmittelbare Integration von Rab11A in die Insulinsignalkaskade sowie die molekulare Verknüpfung mit dem intrazellulären Transport von GLUT4 durch die Insulin-regulierte Interaktion von Rab11A mit Rab11-spezifischen Effektorproteinen bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

6 LITERATUR

Abel, E.D., Peroni, O., Kim, J.K., Kim, Y.B., Boss, O., Hadro, E., Minnemann, T., Shulman, G.I., Kahn, B.B.

Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature* 409, 729-733 (2001)

Adams, M.J., Blundell, T.L., Dodson, E.J., Dodson, G.G., Vijayan, M., Baker, E.N., Harding, M.M., Hodgkin, D.C., Rimmer, B., Sheat, S.

Structure of rhodohedral 2 zinc insulin crystals. *Nature* 224, 491-495 (1969)

Agnetti, G., Maraldi, T., Fiorentini, D., Giordano, E., Prata, C., Hakim, G., Muscari, C., Guarnieri, C., Calderera, C.M.

Activation of glucose transport during simulated ischemia in H9c2 cardiac myoblasts is mediated by protein kinase C isoforms. *Life Sci.* 78, 264-270 (2005)

Ahmadian, M.R., Hoffmann, U., Goody, R.S., Wittinghofer, A.

Individual rate constants for the interaction of Ras proteins with GTPase-activating proteins determined by fluorescence spectroscopy. *Biochemistry* 36, 4535-4541 (1997 a)

Ahmadian, M.R., Stege, P., Scheffzek, K., Wittinghofer, A.

Confirmation of the arginine-finger hypothesis for the GAP-stimulated GTP-hydrolysis reaction of Ras. *Nat. Struct. Biol.* 4, 686-689 (1997 b)

Ahmed, Z. & Pillay, T.S.

Adapter protein with a pleckstrin homology (PH) and an Src homology 2 (SH2) domain (APS) and SH2-B enhance insulin-receptor autophosphorylation, extracellular-signal-regulated kinase and phosphoinositide 3-kinase-dependent signalling. *Biochem. J.* 371, 405-412 (2003)

Alberti, K.G. & Zimmet, P.Z.

Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet. Med.* 15, 539-553 (1998)

Aledo, J.C., Darakhshan, F., Hundal, H.S.

Rab4, but not the transferrin receptor, is colocalized with GLUT4 in an insulin-sensitive intracellular compartment in rat skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215, 321-328 (1995)

Aledo, J.C. & Hundal, H.S.

Isolation and characterization of two intracellular GLUT4 glucose transporter pools in rat skeletal muscle. *Biochem. Soc. Trans.* 24, 190S (1996)

Alessi, D.R., James, S.R., Downes, C.P., Holmes, A.B., Gaffney, P.R., Reese, C.B., Cohen, P.

Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B alpha. *Curr. Biol.* 7, 261-269 (1997)

Alessi, D.R. & Downes, C.P.

The role of PI 3-kinase in insulin action. *Biochim. Biophys. Acta* 1436, 151-164 (1998)

Al-Hasani, H., Kunamneni, R.K., Dawson, K., Hinck, C.S., Muller-Wieland, D., Cushman, S.W.

Roles of the N- and C-termini of GLUT4 in endocytosis. *J. Cell Sci.* 115, 131-140 (2002)

Almind, K., Bjorbaek, C., Vestergaard, H., Hansen, T., Echwald, S., Pedersen, O.

Aminoacid polymorphisms of insulin receptor substrate-1 in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 342, 828-838 (1993)

Almind, K., Inoue, G., Pedersen, O., Kahn, C.R.

A common amino acid polymorphism in insulin receptor substrate-1 causes impaired insulin signaling. Evidence from transfection studies. *J. Clin. Invest.* 97, 2569-2575 (1996)

Andreasson, K., Galuska, D., Thorne, A., Sonnenfeld, T., Wallberg-Henriksson, H.

Decreased insulin-stimulated 3-O-methylglucose transport in in vitro incubated muscle strips from type II diabetic subjects. *Acta Physiol. Scand.* 142, 255-260 (1991)

Andres, D.A., Seabra, M.C., Brown, M.S., Armstrong, S.A., Smeland, T.E., Cremers, F.P., Goldstein, J.L.

cDNA cloning of component A of Rab geranylgeranyl transferase and demonstration of its role as a Rab escort protein. *Cell* 73, 1091-1099 (1993)

Araki, K., Nakanishi, H., Hirano, H., Kato, M., Sasaki, T., Takai, Y.

Purification and characterization of Rab GDI beta from rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 211, 296-305 (1995)

Asano, T., Katagiri, H., Takata, K., Lin, J.L., Ishihara, H., Inukai, K., Tsukuda, K., Kikuchi, M., Hirano, H., Yazaki, Y., Oka, Y.

The role of N-glycosylation of GLUT1 for glucose transport activity. *J. Biol. Chem.* 266, 24632-24636 (1991)

Augustin, R., Carayannopoulos, M.O., Dowd, L.O., Phay, J.E., Moley, J.F., Moley, K.H.

Identification and characterization of human glucose transporter-like protein-9 (GLUT9): alternative splicing alters trafficking. *J. Biol. Chem.* 279, 16229-16236 (2004)

Baldwin, S.A.

Mammalian passive glucose transporters: members of an ubiquitous family of active and passive transport proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1154, 17-49 (1993)

Bandyopadhyay, G., Standaert, M.L., Zhao, L., Yu, B., Avignon, A., Galloway, L., Karnam, P., Moscat, I., Farese, R.V.

Activation of protein kinase C (alpha, beta, and zeta) by insulin in 3T3/L1 cells. Transfection studies suggest a role for PKC-zeta in glucose transport. *J. Biol. Chem.* 272, 2551-2558 (1997)

Bandyopadhyay, G., Kanoh, Y., Sajan, M.P., Standaert, M.L., Farese, R.V.

Effects of adenoviral gene transfer of wild-type, constitutively active, and kinase-defective protein kinase C-lambda on insulin-stimulated glucose transport in L6 myotubes. *Endocrinology* 141, 4120-4127 (2000)

Banting, F.G. & Best, C.H.

The internal secretion of the pancreas. *J. Lab. Clin. Med.* 7, 251-266 (1922)

Banting, F.G., Best, C.H., Collip, J.B., Campbell, W.R., Fletcher, A.A.

Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus. *Can. Med. Assoc. J.* 12, 141-146 (1922)

Baron, A.D., Brechtel, G., Wallace, P., Edelman, S.V.

Rates and tissue sites of non-insulin- and insulin-mediated glucose uptake in humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 255, E769-E774 (1988)

Baumann, C.A., Chokshi, N., Saltiel, A.R., Ribon, V.

Cloning and characterization of a functional peroxisome proliferator activator receptor-gamma-responsive element in the promoter of the CAP gene. *J. Biol. Chem.* 275, 9131-9135 (2000 a)

Baumann, C.A., Ribon, V., Kanzaki, M., Thurmond, D.C., Mora, S., Shigematsu, S., Bickel, P.E., Pessin, J.E., Saltiel, A.R.

CAP defines a second signalling pathway required for insulin-stimulated glucose transport. *Nature* 407, 202-207 (2000 b)

Becker, C., Sevilla, L., Tomas, E., Palacin, M., Zorzano, A., Fischer, Y.

The endosomal compartment is an insulin-sensitive recruitment site for GLUT4 and GLUT1 glucose transporters in cardiac myocytes. *Endocrinology* 142, 5267-5276 (2001)

Bell, G.I., Kayano, T., Buse, J.B., Burant, C.F., Takeda, J., Lin, D., Fukumoto, H., Seino, S.

Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes Care* 13, 198-208 (1990)

Benli, M., Doring, F., Robinson, D.G., Yang, X., Gallwitz, D.

Two GTPase isoforms, Ypt31p and Ypt32p, are essential for Golgi function in yeast. *EMBO J.* 15, 6460-6475 (1996)

Berghuis, A.M., Lee, E., Raw, A.S., Gilman, A.G., Sprang, S.R.

Structure of GDP-Pi complex of Gly203Ala gi alpha 1: a mimic of the ternary complex of g alpha-catalyzed GTP hydrolysis. *Structure* 4, 1277-1290 (1996)

Berwick, D.C., Dell, G.C., Welsh, G.I., Heesom, K.J., Hers, I., Fletcher, L.M., Cooke, F.T., Tavare, J.M.

Protein kinase B phosphorylation of PIKfyve regulates the trafficking of GLUT4 vesicles. *J. Cell Sci.* 117, 5985-5993 (2004)

Birnbaum, M.J., Haspel, H.C., Rosen, O.M.

Cloning and characterization of a cDNA encoding the rat brain glucose-transporter protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 5784-5788 (1986)

Birnbaum, M.J.

Identification of a novel gene encoding an insulin-responsive glucose transporter protein. *Cell* 57, 305-315 (1989)

Block, N.E., Menick, D.R., Robison, K.A., Buse, M.G.

Effect of denervation on the expression of two glucose transporter isoforms in rat hindlimb muscle. *J. Clin. Invest.* 88, 1546-1552 (1991)

Bock, J.B., Matern, H.T., Peden A.A., Scheller R.H.

A genomic perspective on membrane compartment organization. *Nature* 409, 839-841 (2001)

Bogan, J.S., McKee, A.E., Lodish, H.F.

Insulin-responsive compartments containing GLUT4 in 3T3-L1 and CHO cells: regulation by amino acid concentrations. *Mol. Cell. Biol.* 21, 4785-4806 (2001)

Boitard, C.

Insulin secretion in type 2 diabetes: clinical aspects. *Diabetes Metab.* 28, 4S33-4S38 (2002)

Bonadonna, R.C., Del Prato, S., Saccomani, M.P., Bonora, E., Gulli, G., Ferrannini, E., Bier, D., Cobelli, C., DeFronzo, R.A.

Transmembrane glucose transport in skeletal muscle of patients with non-insulin-dependent diabetes. *J. Clin. Invest.* 92, 486-494 (1993)

Bonen, A., Clark, M.G., Henriksen, E.J.

Experimental approaches in muscle metabolism: hindlimb perfusion and isolated muscle incubations. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 266, E1-E16 (1994)

Bourne, H.R., Sanders, D.A., McCormick, F.

The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* 348, 125-132 (1990)

Bourne, H.R., Sanders, D.A., McCormick, F.

The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 349, 117-127 (1991)

Bradford, M.M.

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254 (1976)

Brazil, D.P. & Hemmings, B.A.

Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends Biochem. Sci.* 26, 657-664 (2001)

Brown, G.K.

Glucose transporters: structure, function and consequences of deficiency. *J. Inherit. Metab. Dis.* 23, 237-246 (2000)

Brozinick Jr., J.T., McCoid, S.C., Reynolds, T.H., Nardone, N.A., Hargrove, D.M., Stevenson, R.W., Cushman, S.W., Gibbs, E.M.

GLUT4 overexpression in db/db mice dose-dependently ameliorates diabetes but is not a lifelong cure. *Diabetes* 50, 593-600 (2001)

Brozinick Jr., J.T., Roberts, B.R., Dohm, G.L.

Defective signaling through Akt-2 and Akt-3 but not Akt-1 in insulin-resistant human skeletal muscle: potential role in insulin resistance. *Diabetes* 52, 935-941 (2003)

- Bruning, J.C., Winnay, J., Bonner-Weir, S., Taylor, S.I., Accili, D., Kahn, C.R.**
Development of a novel polygenic model of NIDDM in mice heterozygous for IR and IRS-1 null alleles. *Cell* 88, 561-572 (1997)
- Bruning, J.C., Gautam, D., Burks, D.J., Gillette, J., Schubert, M., Orban, P.C., Klein, R., Krone, W., Muller-Wieland, D., Kahn, C.R.**
Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* 289, 2122-2125 (2000)
- Bryant, N.J., Govers, R., James, D.E.**
Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 267-277 (2002)
- Bucci, C., Parton, R.G., Mather, I.H., Stunnenberg, H., Simons, K., Hoflack, B., Zerial, M.**
The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell* 70, 715-728 (1992)
- Burant, C.F. & Bell, G.I.**
Mammalian facilitative glucose transporters: Evidence for similar substrate recognition sites in functionally monomeric proteins. *Biochemistry* 31, 10414-10420 (1992)
- Burant, C.F., Takeda, J., Brot-Laroche, E., Bell, G.I., Davidson, N.O.**
Fructose transporter in human spermatozoa and small intestine is GLUT5. *J. Biol. Chem.* 267, 14523-14526 (1992)
- Cai, D., Dhe-Paganon, S., Mellendez, P.A., Lee, J., Shoelson, S.E.**
Two new substrates in insulin signaling, IRS5/DOK4 and IRS6/DOJ5. *J. Biol. Chem.* 278, 25323-25330 (2003)
- Cain, C.C., Trimble, W.S., Lienhard, G.E.**
Members of the Vamp family of synaptic vesicle proteins are components of glucose transporter-containing vesicles from rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* 267, 11681-11684 (1992)
- Calakos, N., Bennett, M.K., Peterson, K.E., Scheller, R.H.**
Protein-protein interactions contributing to the specificity of intracellular vesicular trafficking. *Science* 263, 1146-1149 (1994)
- Calderhead, D.M., Kitagawa, K., Tanner, L.I., Holman, G.D., Lienhard, G.E.**
Insulin regulation of the two glucose transporters in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 265, 13801-13808 (1990)
- Calhoun, B.C., Lapierre, L.A., Chew, C.S., Goldenring, J.R.**
Rab11a redistributes to apical secretory canaliculus during stimulation of gastric parietal cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 275, C163-C170 (1998)
- Cantley, L.C.**
The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296, 1655-1657 (2002)

Carayannopoulos, M.O., Chi, M.M., Cui, Y., Pingsterhaus, J.M., McKnight, R.A., Mueckler, M., Devaskar, S.U., Moley, K.H.

GLUT8 is a glucose transporter responsible for insulin-stimulated glucose uptake in the blastocyst. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 7313-7318 (2000)

Carvalho, E., Eliasson, B., Wesslau, C., Smith, U.

Impaired phosphorylation and insulin-stimulated translocation to the plasma membrane of protein kinase B/Akt in adipocytes from Type II diabetic subjects. *Diabetologia* 43, 1107-1115 (2000)

Casanova, J.E., Wang, X., Kumar, R., Bhartur, S.G., Navarre, J., Woodrum, J.E., Altschuler, Y., Ray, G.S., Goldenring, J.R.

Association of Rab25 and Rab11a with the apical recycling system of polarized Madin-Darby canine kidney cells. *Mol. Biol. Cell* 10, 47-61 (1999)

Chamberlain, M.D., Berry, T.R., Pastor, M.C., Anderson, D.H.

The p85alpha subunit of phosphatidylinositol 3'-kinase binds to and stimulates the GTPase activity of Rab proteins. *J. Biol. Chem.* 279, 48607-48614 (2004)

Charron, M.J., Brosius III., F.C., Alper, S.L., Lodish, H.F.

A glucose transport protein expressed predominately in insulin-responsive tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 2535-2539 (1989)

Chattopadhyay, D., Langsley, G., Carson, M., Recacha, R., DeLucas, L., Smith, C.

Structure of the nucleotide-binding domain of Plasmodium falciparum rab6 in the GDP-bound form. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallo.* 56, 937-944 (2000)

Chavrier, P., Vingron, M., Sander, C., Simons, K., Zerial, M.

Molecular cloning of YPT1/SEC4-related cDNAs from an epithelial cell line. *Mol. Cell. Biol.* 10, 6578-6585 (1990)

Chavrier, P., Gorvel, J.P., Stelzer, E., Simons, K., Gruenberg, J., Zerial, M.

Hypervariable C-terminal domain of rab proteins acts as a targeting signal. *Nature* 353, 769-772 (1991)

Chavrier, P. & Goud, B.

The role of ARF and Rab GTPases in membrane transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 466-475 (1999)

Cheatham, B., Vlahos, C.J., Cheatham, L., Wang, L., Blenis, J., Kahn, C.R.

Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation. *Mol. Cell. Biol.* 14, 4902-4911 (1994)

Cheatham, B., Volchuk, A., Kahn, C.R., Wang, L., Rhodes, C.J., Klip, A.

Insulin-stimulated translocation of GLUT4 glucose transporters requires SNARE-complex proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 15169-15173 (1996)

Chen, W., Feng, Y., Chen, D., Wandinger-Ness, A.

Rab11 is required for trans-golgi network-to-plasma membrane transport and a preferential target for GDP dissociation inhibitor. *Mol. Biol. Cell* 9, 3241-3257 (1998)

Chen, Y.A. & Scheller R.H.

SNARE-mediated membrane fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 98-106 (2001)

Chiang, S.H., Baumann, C.A., Kanzaki, M., Thurmond, D.C., Watson, R.T., Neudauer, C.L., Macara, I.G., Pessin, J.E., Saltiel, A.R.

Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10. *Nature* 410, 944-948 (2001)

Cho, H., Mu, J., Kim, J.K., Thorvaldsen, J.L., Chu, Q., Crenshaw III., E.B., Kaestner, K.H., Bartolomei, M.S., Shulman, G.I., Birnbaum, M.J.

Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science* 292, 1728-1731 (2001 a)

Cho, H., Thorvaldsen, J.L., Chu, Q., Feng, F., Birnbaum, M.J.

Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *J. Biol. Chem.* 276, 38349-38352 (2001 b)

Cho, W.

Membrane targeting by C1 and C2 domains. *J. Biol. Chem.* 276, 32407-32410 (2001)

Chomczynski, P. & Sacchi, N.

Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159 (1987)

Christoforidis, S., McBride, H.M., Burgoyne, R.D., Zerial, M.

The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking. *Nature* 397, 621-625 (1999 a)

Christoforidis, S., Miaczynska, M., Ashman, K., Wilm, M., Zhao, L., Yip, S.C., Waterfield, M.D., Backer, J.M., Zerial, M.

Phosphatidylinositol-3-OH kinases are Rab5 effectors. *Nat. Cell Biol.* 1, 249-252 (1999 b)

Chunqui Hou, J. & Pessin, J.E.

Lipid Raft targeting of the TC10 amino terminal domain is responsible for disruption of adipocyte cortical actin. *Mol. Biol. Cell* 14, 3578-3591 (2003)

Clement, S., Krause, U., Desmedt, F., Tanti, J.F., Behrends, J., Pesesse, X., Sasaki, T., Penninger, J., Doherty, M., Malaisse, W., Dumont, J.E., Le Marchand-Brustel, Y., Erneux, C., Hue, L., Schurmans, S.

The lipid phosphatase SHIP2 controls insulin sensitivity. *Nature* 409, 92-97 (2001)

Cline, G.W., Petersen, K.F., Krssak, M., Shen, J., Hundal, R.S., Trajanoski, Z., Inzucchi, S., Dresner, A., Rothman, D.L., Shulman, G.I.

Impaired glucose transport as a cause of decreased insulin-stimulated muscle glycogen synthesis in type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* 341, 240-246 (1999)

Coderre, L., Monfar, M.M., Chen, K.S., Heydrick, S.J., Kurowski, T.G., Ruderman, N.B., Pilch, P.F.

Alteration in the expression of GLUT-1 and GLUT-4 protein and messenger RNA levels in denervated rat muscles. *Endocrinology* 131, 1821-1825 (1992)

Coderre, L., Kandror, K.V., Vallega, G., Pilch, P.F.

Identification and characterization of an exercise-sensitive pool of glucose transporters in skeletal muscle *J. Biol. Chem.* 270, 27584-27588 (1995)

Colditz, G.A., Willett, W.C., Rotnitzky, A., Manson, J.E.

Weight gain as a risk factor for clinical diabetes mellitus in women. *Ann. Intern. Med.* 122, 481-486 (1995)

Cong, L.N., Chen, H., Li, Y., Zhou, L., McGibbon, M.A., Taylor, S.I., Quon, M.J.

Physiological role of Akt in insulin-stimulated translocation of GLUT4 in transfected rat adipose cells. *Mol. Endocrinol.* 11, 1881-1890 (1997)

Cormont, M., Tanti, J.F., Zahraoui, A., van Obberghen, E., Tavitian, H., Le Marchand-Brustel, Y.

Insulin and okadaic acid induce Rab4 redistribution in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 268, 19491-19497 (1993)

Cormont, M., Bortoluzzi, M.N., Gautier, N., Mari, M., van Obberghen, E., Le Marchand-Brustel, Y.

Potential role of Rab4 in the regulation of subcellular localization of Glut4 in adipocytes. *Mol. Cell. Biol.* 16, 6879-6886 (1996 a)

Cormont, M., van Obberghen, E., Zerial, M., Le Marchand-Brustel, Y.

Insulin induces a change in Rab5 subcellular localization in adipocytes independently of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Endocrinology* 137, 3408-3415 (1996 b)

Cormont, M. & Le Marchand-Brustel, Y.

The role of small G-proteins in the regulation of glucose transport (review). *Mol. Membr. Biol.* 18, 213-220 (2001)

Corvera, S. & Czech, M.P.

Direct targets of phosphoinositide 3-kinase products in membrane traffic and signal transduction. *Trends Cell Biol.* 8, 442-446 (1998)

Cox, D., Lee, D.J., Dale, B.M., Calafat, J., Greenberg, S.

A Rab11-containing rapidly recycling compartment in macrophages that promotes phagocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 680-685 (2000)

Cuif, M.H., Possmayer, F., Zander, H., Bordes, N., Jollivet, F., Couedel-Courteille, A., Janoueix-Lerosey, I., Langsley, G., Bornens, M., Goud, B.

Characterization of GAPCenA, a GTPase activating protein for Rab6, part of which associates with the centrosome. *EMBO J.* 18, 1772-1782 (1999)

Cushman, S.W. & Wardzala, L.J.

Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell. Apparent translocation of intracellular transport systems to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 255, 4758-4762 (1980)

Czech, M.P. & Buxton, J.M.

Insulin action on the internalization of the GLUT4 transporter in isolated rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* 268, 9187-9190 (1993)

Czech, M.P. & Corvera, S.

Signaling mechanisms that regulate glucose transport. *J. Biol. Chem.* 274, 1865-1868 (1999)

D'Adamo, P., Menegon, A., Lo Nigro, C., Grasso, M., Gulisano, M., Tamanini, F., Bienvenu, T., Gedeon, A.K., Oostra, B., Wu, S.K., Tandon, A., Valtorta, F., Balch, W.E., Chelly, J., Toniolo, D.

Mutations in GDI1 are responsible for X-linked non-specific mental retardation. *Nat. Genet.* 19, 134-139 (1998)

Dale, L.B., Seachrist, J.L., Babwah, A.V., Ferguson, S.S.

Regulation of angiotensin II type 1A receptor intracellular retention, degradation, and recycling by Rab4, Rab7, and Rab11 GTPases. *J. Biol. Chem.* 279, 13110-13118 (2004)

Damiani, M.T., Pavarotti, M., Leiva, N., Lindsay, A.J., McCaffrey, M.W., Colombo, M.I.

Rab coupling protein associates with phagosomes and regulates recycling from the phagosomal compartment. *Traffic* 5, 785-797 (2004)

Daro, E., van der Sluijs, P., Galli, T., Mellman, I.

Rab4 and cellubrevin define different early endosome populations on the pathway of transferrin receptor recycling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 9559-9564 (1996)

Davidson, N.O., Hausman, A.M., Ifkovits, C.A., Buse, J.B., Gould, G.W., Burant, C.F., Bell, G.I.

Human intestinal glucose transporter expression and localization of GLUT5. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 262, C795-C800 (1992)

Davis, T.M., Millns, H., Stratton, I.M., Holman, R.R., Turner, R.C.

Risk factors for stroke in type 2 diabetes mellitus: United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) 29. *Arch. Intern. Med.* 159, 1097-1103 (1999)

Dawson, P.A., Mychaleckyj, J.C., Fossey, S.C., Mihic, S.J., Craddock, A.L., Bowden, D.W.

Sequence and functional analysis of GLUT10: a glucose transporter in the Type 2 diabetes-linked region of chromosome 20q12-13.1. *Mol. Genet. Metab.* 74, 186-199 (2001)

DeFronzo, R.A., Jocot, E., Jequier, E., Maeder, E., Wahren, J., Felber, J.P.

The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. *Diabetes* 30, 1000-1007 (1981)

DeFronzo, R.A., Gunnarsson, R., Bjorkman, O., Olsson, M., Wahren, J.

Effects of insulin on peripheral and splanchnic glucose metabolism in noninsulin-dependent (type II) diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* 76, 149-155 (1985)

DeFronzo, R.A.

Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidaemia and atherosclerosis. *Neth. J. Med.* 50, 191-197 (1997 a)

DeFronzo, R.A.

Pathogenesis of type 2 diabetes: metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes. *Diabetes Rev.* 5, 177-269 (1997 b)

de Graaf, P., Zwart, W.T., van Dijken, R.A., Deneka, M., Schulz, T.K., Geijssen, N., Coffey, P.J., Gadella, B.M., Verkleij, A.J., van der Sluijs, P., van Bergen en Henegouwen, P.M.
Phosphatidylinositol 4-kinasebeta is critical for functional association of rab11 with the Golgi complex. *Mol. Biol. Cell* 15, 2038-2047 (2004)

Der, C.J., Finkel, T., Cooper, G.M.

Biological and biochemical properties of human rasH genes mutated at codon 61. *Cell* 44, 167-176 (1986)

Deutsche Diabetes-Stiftung

Report 3, 1-8, Martinsried (2004)

Dever, T.E., Glynias, M.J., Merrick, W.C.

GTP-binding domain: three consensus sequence elements with distinct spacing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 1814-1818 (1987)

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*, 51, 2369-2376 (2002)

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.* 28, 985-992 (2004)

Dietze-Schroeder, D., Sell, H., Uhlig, M., Koenen, M., Eckel, J.

Autocrine action of adiponectin on human fat cells prevents the release of insulin resistance-inducing factors. *Diabetes* 54, 2003-2011 (2005)

Dirac-Svejstrup, A.B., Sumizawa, T., Pfeffer, S.R.

Identification of a GDI displacement factor that releases endosomal Rab GTPases from Rab-GDI. *EMBO J.* 16, 465-472 (1997)

Dobson, M.

Nature of the urine in diabetes. *Med. Obs. Inqu.* 5, 298-310 (1776)

Doerge, H., Bocianski, A., Joost, H.G., Schurmann, A.

Activity and genomic organization of human glucose transporter 9 (GLUT9), a novel member of the family of sugar-transport facilitators predominantly expressed in brain and leucocytes. *Biochem. J.* 350, 771-776 (2000 a)

Doerge, H., Schurmann, A., Bahrenberg, G., Brauers, H., Joost, H.G.

GLUT8, a novel member of the sugar transport facilitator family with glucose transport activity. *J. Biol. Chem.* 275, 16275-16280 (2000 b)

Doege, H., Bocianski, A., Scheepers, A., Axer, H., Eckel, J., Joost, H.G., Schurmann, A.
Characterization of human glucose transporter (GLUT) 11 (encoded by SLC2A11), a novel sugar-transport facilitator specifically expressed in heart and skeletal muscle. *Biochem. J.* 359, 443-449 (2001)

Dohm, G.L., Tapscott, E.B., Pories, W.J., Dabbs, D.J., Flickinger, E.G., Meelheim, D., Fushiki, T., Atkinson, S.M., Elton, C.W., Caro, J.F.
An in vitro human muscle preparation suitable for metabolic studies. Decreased insulin stimulation of glucose transport in muscle from morbidly obese and diabetic subjects. *J. Clin. Invest.* 82, 486-494 (1988)

Douen, A.G., Ramlal, T., Rastogi, S., Bilan, P.J., Cartee, G.D., Vranic, M., Holloszy, J.O., Klip, A.
Exercise induces recruitment of the „insulin-responsive glucose transporter“. Evidence for distinct intracellular insulin- and exercise-recruitable transporter pools in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 265, 13427-13430 (1990)

Dransfeld, O., Uphues, I., Sasson, S., Schurmann, A., Joost, H.G., Eckel, J.
Regulation of subcellular distribution of GLUT4 in cardiomyocytes: Rab4A reduces basal glucose transport and augments insulin responsiveness. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 108, 26-36 (2000)

Dumas, J.J., Zhu, Z., Connolly, J.L., Lambright, D.G.
Structural basis of activation and GTP hydrolysis in Rab proteins. *Structure Fold. Des.* 7, 413-423 (1999)

Echard, A., Jollivet, F., Martinez, O., Lacapere, J.J., Rousselet, A., Janoueix-Lerosey, I., Goud, B.
Interaction of a Golgi-associated kinesin-like protein with Rab6. *Science* 279, 580-585 (1998)

Egawa, K., Maegawa, H., Shi, K., Nakamura, T., Obata, T., Yoshizaki, T., Morino, K., Shimizu, S., Nishio, Y., Suzuki, E., Kashiwagi, A.
Membrane localization of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 stimulates activities of Akt and atypical protein kinase C but does not stimulate glucose transport and glycogen synthesis in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 277, 38863-38869 (2002)

Eguez, L., Lee, A., Chavez, J.A., Miinea, C.P., Kane, S., Lienhard, G.E., McGraw, T.E.
Full interaction retention of GLUT4 requires AS160 Rab GTPase activating protein. *Cell Metab.* 2, 263-272 (2005).

Eisenbarth, G.S.
Type 1 diabetes: molecular, cellular and clinical immunology. *Adv. Exp. Med. Biol.* 552, 306-310 (2004)

Elmendorf, J.S.
Signals that regulate GLUT4 translocation. *J. Membr. Biol.* 190, 167-174 (2002)

Eriksson, J., Koranyi, L., Bourey, R., Schalin-Jantti, C., Widen, E., Mueckler, M., Permutt, A.M., Groop, L.C.

Insulin resistance in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients and their relatives is not associated with a defect in the expression of the insulin-responsive glucose transporter (GLUT-4) gene in human skeletal muscle. *Diabetologia* 35, 143-147 (1992)

Farhang-Fallah, J., Randhawa, V.K., Nimnual, A., Klip, A., Bar-Sagi, D., Rozakis-Adcock, M.

The pleckstrin homology (PH) domain-interacting protein couples the insulin receptor substrate 1 PH domain to insulin signaling pathways leading to mitogenesis and GLUT4 translocation. *Mol. Cell. Biol.* 22, 7325-7336 (2002)

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

Insulin-induced recruitment of glucose transporter 4 (GLUT4) and GLUT1 in isolated rat cardiac myocytes. Evidence of the existence of different intracellular GLUT4 vesicle populations. *J. Biol. Chem.* 272, 7085-7092 (1997)

Fischer von Mollard, G., Mignery, G.A., Baumert, M., Perin, M.S., Hanson, T.J., Burger, P.M., Jahn, R., Sudhof, T.C.

Rab3 is a small GTP-binding protein exclusively localized to synaptic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1988-1992 (1990)

Foster, L.J. & Klip, A.

Mechanism and regulation of GLUT-4 vesicle fusion in muscle and fat cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 279, C877-C890 (2000)

Foster, L.J., Li, D., Randhawa, V.K., Klip, A.

Insulin accelerates inter-endosomal GLUT4 traffic via phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B. *J. Biol. Chem.* 276, 44212-44221 (2001)

Frech, M., Darden, T.A., Pedersen, L.G., Foley, C.K., Charifson, P.S., Anderson, M.W., Wittinghofer, A.

Role of glutamine-61 in the hydrolysis of GTP by p21H-ras: an experimental and theoretical study. *Biochemistry* 33, 3237-3244 (1994)

Friedman, J.E., Sherman, W.M., Reed, M.J., Elton, C.W., Dohm, G.L.

Exercise training increases glucose transporter protein Glut-4 in skeletal muscle of obese Zucker (fa/fa) rats. *FEBS Lett.* 268, 13-16 (1990)

Friedman, J.E., Dohm, G.L., Legett-Frazier, N., Elton, C.W., Tapscott, E.B., Pories, W.P., Caro, J.F.

Restoration of insulin responsiveness in skeletal muscle of morbidly obese patients after weight loss. Effect on muscle glucose transport and glucose transporter GLUT4. *J. Clin. Invest.* 89, 701-705 (1992)

Fruman, D.A., Mauvais-Jarvis, F., Pollard, D.A., Yballe, C.M., Brazil, D., Bronson, R.T., Kahn, C.R., Cantley, L.C.

Hypoglycaemia, liver necrosis and perinatal death in mice lacking all isoforms of phosphoinositide 3-kinase p85 alpha. *Nat. Genet.* 26, 379-382 (2000)

- Fukui, K., Sasaki, T., Imazumi, K., Matsuura, Y., Nakanishi, H., Takai, Y.**
Isolation and characterization of a GTPase activating protein specific for the Rab3 subfamily of small G proteins. *J. Biol. Chem.* 272, 4655-4658 (1997)
- Fukumoto, H., Seino, S., Imura, H., Seino, Y., Eddy, R.L., Fukushima, Y., Byers, M.G., Shows, T.B., Bell, G.I.**
Sequence, tissue distribution, and chromosomal localization of mRNA encoding a human glucose transporter-like protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5434-5438 (1988)
- Fukumoto, H., Kayano, T., Buse, J.B., Edwards, Y., Pilch, P.F., Bell, G.I., Seini, S.**
Cloning and characterization of the major insulin-responsive glucose transporter expressed in human skeletal muscle and other insulin-responsive tissues. *J. Biol. Chem.* 264, 7776-7779 (1989)
- Galbiati, F., Razani, B., Lisanti, M.P.**
Emerging themes in lipid rafts and caveolae. *Cell* 106, 403-411 (2001)
- Gallwitz, D., Donath, C., Sander, C.**
A yeast gene encoding a protein homologous to the c-has/bas proto-oncogene product. *Nature* 306, 704-707 (1983)
- Garvey, W.T., Maianu, L., Zhu, J.H., Brechtel-Hook, G., Wallace, P., Baron, P.D.**
Evidence for defects in the trafficking and translocation of GLUT4 glucose transporters in skeletal muscle as a cause of human insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 101, 2377-2386 (1998)
- Gebhardt, C., Breitenbach, U., Richter, K.H., Furstenberger, G., Mauch, C., Angel, P., Hess, J.**
c-Fos-dependent induction of the small ras-related GTPase Rab11a in skin carcinogenesis. *Am. J. Pathol.* 167, 243-253 (2005)
- Geppert, M., Goda, Y., Stevens, C.F., Sudhof, T.C.**
The small GTP-binding protein Rab3A regulates a late step in synaptic vesicle fusion. *Nature* 387, 810-814 (1997)
- Ghosh, R.N., Mallet, W.G., Soe, T.T., McGraw, T.E., Maxfield, F.R.**
An endocytosed TGN38 chimeric protein is delivered to the TGN after trafficking through the endocytic recycling compartment in CHO cells. *J. Cell Biol.* 142, 923-936 (1998)
- Giani, G., Janka, H.U., Hauner, H., Standl, E., Schiel, R., Neu, A., Rathmann, W., Rosenbauer, J.**
Epidemiologie und Verlauf des Diabetes mellitus in Deutschland. In: Evidenzbasierte Diabetes-Leitlinie DDG. Scherbaum, W.A. & Kiess, W. (Hrsg.), 2. Auflage, Deutsche Diabetes-Gesellschaft, Düsseldorf (2004)
- Goldenring, J.R., Shen, K.R., Vaughan, H.D., Modlin, I.M.**
Identification of a small GTP-binding protein, Rab25, expressed in the gastrointestinal mucosa, kidney, and lung. *J. Biol. Chem.* 268, 18419-18422 (1993)

Goldenring, J.R., Soroka, C.J., Shen, K.R., Tang, L.H., Rodriguez, W., Vaughan, H.D., Stoch, S.A., Modlin, I.M.

Enrichment of rab11, a small GTP-binding protein, in gastric parietal cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 267, G187-G194 (1994)

Goldenring, J.R., Smith, J., Vaughan, H.D., Cameron, P., Hawkins, W., Navarre, J.

Rab11 is an apically located small GTP-binding protein in epithelial tissues. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 270, G515-G525 (1996)

Goldstein, B.J.

Insulin resistance: from benign to type 2 diabetes mellitus. *Rev. Cardiovasc. Med.* 4, S3-S10 (2003)

Gonzalez Jr., L. & Scheller, R.H.

Regulation of membrane trafficking: structural insights from a Rab/effector complex. *Cell* 96, 755-758 (1999)

Goodyear, L.J., Hirshman, M.F., Smith, R.J., Horton, E.S.

Glucose transporter number, activity, and isoform content in plasma membranes of red and white skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 261, E556-E561 (1991)

Gould, G.W., Thomas, H.M., Jess, T.J., Bell, G.I.

Expression of human glucose transporters in *Xenopus* oocytes: kinetic characterization and substrate specificities of the erythrocyte, liver, and brain isoforms. *Biochemistry* 30, 5139-5145 (1991)

Govers, R., Coster, A.C., James, D.E.

Insulin increases cell surface GLUT4 levels by dose dependently discharging GLUT4 into a cell surface recycling pathway. *Mol. Cell. Biol.* 24, 6456-6466 (2004)

Green, E.G., Ramm, E., Riley, N.M., Spiro, D.J., Goldenring, J.R., Wessling-Resnick, M.

Rab11 is associated with transferrin-containing recycling compartments in K562 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239, 612-616 (1997)

Grusovin, J. & Macaulay, S.L.

Snares for GLUT4--mechanisms directing vesicular trafficking of GLUT4. *Front. Biosci.* 8, d620-d641 (2003)

Guilherme, A. & Czech, M.P.

Stimulation of IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase and Akt/protein kinase B but not glucose transport by beta1-integrin signaling in rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* 273, 33119-33122 (1998)

Ha, H. & Pak, Y.

Modulation of the caveolin-3 and Akt status in caveolae by insulin resistance in H9c2 cardiomyoblasts. *Exp. Mol. Med.* 37, 169-178 (2005)

- Hah, J.S., Ryu, J.W., Lee, W., Kim, B.S., Lachaal, M., Spangler, R.A., Jung, C.Y.**
Transient changes in four GLUT4 compartments in rat adipocytes during the transition, insulin-stimulated to basal: implications for the GLUT4 trafficking pathway. *Biochemistry* 41, 14364-14371 (2002)
- Hales, C.M., Griner, R., Hobdy-Henderson, K.C., Dorn, M.C., Hardy, D., Kumar, R., Navarre, J., Chan, E.K., Lapierre, L.A., Goldenring, J.R.**
Identification and characterization of a family of Rab11-interacting proteins. *J. Biol. Chem.* 276, 39067-39075 (2001)
- Hales, C.M., Vaerman, J.P., Goldenring, J.R.**
Rab11 family interacting protein 2 associates with Myosin Vb and regulates plasma membrane recycling. *J. Biol. Chem.* 277, 50415-50421 (2002)
- Hall, A.**
The cellular functions of small GTP-binding proteins. *Science* 249, 635-640 (1990)
- Hanada, M., Feng, J., Hemmings, B.A.**
Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target. *Biochim. Biophys. Acta* 1697, 3-16 (2004)
- Handberg, A., Vaag, A., Damsbo, P., Beck-Nielsen, H., Vinten, J.**
Expression of insulin-regulatable glucose transporters in skeletal muscle from type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 33, 625-627 (1990)
- Hansen, P.A., Gulve, E.A., Holloszy, J.O.**
Suitability of 2-deoxyglucose for in vitro measurement of glucose transport activity in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 76, 979-985 (1994)
- Häring, H.U. & Matthaei, S.**
Diabetes mellitus Typ 2: Praxis-Leitlinien der Deutschen Diabetes-Gesellschaft. *Diab. u. Stoffw.* 11, 9-13 (2002)
- Hashiramoto, M. & James, D.E.**
Characterization of insulin-responsive GLUT4 storage vesicles isolated from 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Cell. Biol.* 20, 416-427 (2000)
- Haubruck, H. & McCormick, F.**
Ras p21: effects and regulation. *Biochim. Biophys. Acta* 1072, 215-229 (1991)
- Hayashi, T., Hirshman, M.F., Kurth, E.J., Winder, W.W., Goodyear, L.J.**
Evidence for 5' AMP-activated protein kinase mediation of the effect of muscle contraction on glucose transport. *Diabetes* 47, 1369-1373 (1998)
- Henriksen, J.E., Alford, F., Handberg, A., Vaag, A., Ward, G.M., Kalfas, A., Beck-Nielsen, H.**
Increased glucose effectiveness in normoglycemic but insulin-resistant relatives of patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. A novel compensatory mechanism. *J. Clin. Invest.* 94, 1196-1204 (1994)

Herman, G.A., Bonzelius, F., Cieutat, A.M., Kelly, R.B.

A distinct class of intracellular storage vesicles, identified by expression of the glucose transporter GLUT4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 12750-12754 (1994)

Hickson, G.R., Matheson, J., Riggs, B., Maier, V.H., Fielding, A.B., Prekeris, R., Sullivan, W., Barr, F.A., Gould, G.W.

Arfophilins are dual Arf/Rab11 binding proteins that regulate recycling endosome distribution and are related to Drosophila nuclear fallout. *Mol. Biol. Cell* 14, 2908-2920 (2003)

Hirshman, M.F., Goodyear, L.J., Wardzala, L.J., Horton, E.D., Horten, E.S.

Identification of an intracellular pool of glucose transporters from basal and insulin-stimulated rat skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 265, 987-991 (1990)

Hodgkinson, C.P., Mander, A., Sale, G.J.

Protein kinase-zeta interacts with munc18c: role in GLUT4 trafficking. *Diabetologia* 48, 1627-1636 (2005)

Holman, G.D., Lo Leggio, L., Cushman, S.W.

Insulin-stimulated GLUT4 glucose transporter recycling. A problem in membrane protein subcellular trafficking through multiple pools. *J. Biol. Chem.* 269, 17516-17524 (1994)

Holman, G.D. & Kasuga, M.

From receptor to transporter: insulin signalling to glucose transport. *Diabetologia* 40, 991-1003 (1997)

Horiuchi, H., Lippe, R., McBride, H.M., Rubino, M., Woodman, P., Stenmark, H., Rybin, V., Wilm, M., Ashman, K., Mann, M., Zerial, M.

A novel Rab5 GDP/GTP exchange factor complexed to Rabaptin-5 links nucleotide exchange to effector recruitment and function. *Cell* 90, 1149-1159 (1997)

Houmard, J.A., Egan, P.C., Neuffer, P.D., Friedman, J.E., Wheeler, W.S., Israel, R.G., Dohm, G.L.

Elevated skeletal muscle glucose transporter levels in exercise-trained middle aged man. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 261, E437-E443 (1991)

Huang, J., Imamura, T., Olefsky, J.M.

Insulin can regulate GLUT4 internalization by signaling to Rab5 and the motor protein dynein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 13084-13089 (2001)

Hudson, A.W., Fingar, D.C., Seidner, G.A., Griffiths, G., Burke, B., Birnbaum, M.J.

Targeting of the „insulin-responsive“ glucose transporter (GLUT4) to the regulated secretory pathway in PC12 cells. *J. Cell Biol.* 122, 579-588 (1993)

Hume, A.N., Collinson, L.M., Rapak, A., Gomes, A.Q., Hopkins, C.R., Seabra, M.C.

Rab27a regulates the peripheral distribution of melanosomes in melanocytes. *J. Cell Biol.* 152, 795-808 (2001)

Ibberson, M., Uldry, M., Thorens, B.

GLUTX1, a novel mammalian glucose transporter expressed in the central nervous system and insulin-sensitive tissues. *J. Biol. Chem.* 275, 4607-4612 (2000)

Inoue, M., Chang, L., Hwang, J., Chiang, S.H., Saltiel, A.R.

The exocyst complex is required for targeting of Glut4 to the plasma membrane by insulin. *Nature* 422, 629-633 (2003)

Internationale Diabetes-Föderation

Diabetes Atlas, 2. Auflage, Internationale Diabetes-Föderation, Brüssel, Belgien (2003)

Isakoff, S.J., Taha, C., Rose, E., Marcusohn, J., Klip, A., Skolnik, E.Y.

The inability of phosphatidylinositol 3-kinase activation to stimulate GLUT4 translocation indicates additional signaling pathways are required for insulin-stimulated glucose uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 10247-10251 (1995)

Ishiki, M. & Klip, A.

Minireview: recent developments in the regulation of glucose transporter-4 traffic: new signals, locations, and partners. *Endocrinology* 146, 5071-5078 (2005)

Jahn, R., Lang, T., Sudhof, T.C.

Membrane fusion. *Cell* 112, 519-533 (2003)

James, D.E., Strube, M., Mueckler, M.

Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transporter. *Nature* 338, 83-87 (1989)

Janoueix-Lerosey, I., Jollivet, F., Camonis, J., Marche, P.N., Goud, B.

Two-hybrid system screen with the small GTP-binding protein Rab6. Identification of a novel mouse GDP dissociation inhibitor isoform and two other potential partners of Rab6. *J. Biol. Chem.* 270, 14801-14808 (1995)

JeBailey, L., Rudich, A., Huang, X., Di Ciano-Oliveira, C., Kapus, A., Klip, A.

Skeletal muscle cells and adipocytes differ in their reliance on TC10 and Rac for insulin-induced actin remodeling. *Mol. Endocrinol.* 18, 359-372 (2004)

Jiang, G. & Zhang, B.B.

Pi 3-kinase and its up- and down-stream modulators as potential targets for the treatment of type II diabetes. *Front. Biosci.* 7, d903-d907 (2002)

Jiang, Z.Y., Zhou, Q.L., Coleman, K.A., Chouinard, M., Boese, Q., Czech, M.P.

Insulin signaling through Akt/protein kinase B analyzed by small interfering RNA-mediated gene silencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 7569-7574 (2003)

Johnson, A.O., Subtil, A., Petrush, R., Kobylarz, K., Keller, S.R., McGraw, T.E.

Identification of an insulin-responsive, slow endocytic recycling mechanism in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 273, 17968-17977 (1998)

Johnston, P.A., Archer III, B.T., Robinson, K., Mignery, G.A., Jahn, R., Sudhof, T.C.

Rab3A attachment to the synaptic vesicle membrane mediated by a conserved polyisoprenylated carboxy-terminal sequence. *Neuron* 7, 101-109 (1991)

Joost, H.G. & Thorens, B.

The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review). *Mol. Membr. Biol.* 18, 247-256 (2001)

Joost, H.G., Bell, G.I., Best, J.D., Birnbaum, M.J., Charron, M.J., Chen, Y.T., Doege, H., James, D.E., Lodish, H.F., Moley, K.H., Moley, J.F., Mueckler, M., Rogers, S., Schurmann, A., Seino, S., Thorens, B.

Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 282, E974-E976 (2002)

Junutula, J.R., Schonteich, E., Wilson, G.M., Peden, A.A., Scheller, R.H., Prekeris, R.

Molecular characterization of Rab11 interactions with members of the family of Rab11-interacting proteins. *J. Biol. Chem.* 279, 33430-33437 (2004)

Jurnak, F.

Structure of the GDP domain of EF-Tu and location of the amino acids homologous to ras oncogene proteins. *Science* 230, 32-36 (1985)

Kaestner, K.H., Christy, R.J., McLenithan, J.C., Braiterman, L.T., Cornelius, P., Pekala, P.H., Lane, M.D.

Sequences, tissue distribution, and differential expression of mRNA for a putative insulin-responsive glucose transporter in mouse 3T3-L1 adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 3150-3154 (1989)

Kahn, B.B., Rossetti, L., Lodish, H.F., Charron, M.J.

Decreased in vivo glucose uptake but normal expression of GLUT1 and GLUT4 in skeletal muscle of diabetic rats. *J. Clin. Invest.* 87, 2197-2206 (1991)

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.* 268, 14523-14526 (1993)

Kanda, H., Tamori, Y., Shinoda, H., Yoshikawa, M., Sakaue, M., Udagawa, J., Otani, H., Tashiro, F., Miyazaki, J., Kasuga, M.

Adipocytes from Munc18c-null mice show increased sensitivity to insulin-stimulated GLUT4 externalization. *J. Clin. Invest.* 115, 291-301 (2005)

Kandror, K. & Pilch, P.F.

Identification and isolation of glycoproteins that translocate to the cell surface from GLUT4-enriched vesicles in an insulin-dependent fashion. *J. Biol. Chem.* 269, 138-142 (1994)

Kandror, K.V. & Pilch, P.F.

Compartmentalization of protein traffic in insulin-sensitive cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 271, E1-E14 (1996)

Kane, S., Sano, H., Liu, S.C., Asara, J.M., Lane, W.S., Garner, C.C., Lienhard, G.E.

A method to identify serine kinase substrates. Akt phosphorylates a novel adipocyte protein with a Rab-GTPase-activating protein (GAP) domain. *J. Biol. Chem.* 277, 22115-22118 (2002)

Kanzaki, M. & Pessin, J.E.

Insulin-stimulated GLUT4 translocation in adipocytes is dependent upon cortical actin remodeling. *J. Biol. Chem.* 276, 42436-42444 (2001)

Kanzaki, M., Watson, R.T., Hou, J.C., Stamnes, M., Saltiel, A.R., Pessin, J.E.

Small GTP-binding protein TC10 differentially regulates two distinct populations of filamentous actin in 3T3L1 adipocytes. *Mol. Cell. Biol.* 13, 2334-2346 (2002)

Kanzaki, M., Mora, S., Hwang, J.B., Saltiel, A.R., Pessin, J.E.

Atypical protein kinase C (PKC ζ / λ) is a convergent downstream target of the insulin-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase and TC10 signaling pathways. *J. Cell Biol.* 164, 279-290 (2004)

Karlsson, H.K., Zierath, J.R., Kane, S., Krook, A., Lienhard, G.E., Wallberg-Henriksson, H.

Insulin-stimulated phosphorylation of the Akt substrate AS160 is impaired in skeletal muscle of type 2 diabetic subjects. *Diabetes* 54, 1692-1697 (2005)

Karylowski, O., Zeigerer, A., Cohen, A., McGraw, T.E.

GLUT4 is retained by an intracellular cycle of vesicle formation and fusion with endosomes. *Mol. Biol. Cell* 15, 870-882 (2004)

Kasuga, M., Hedo, J.A., Yamada, K.M, Kahn, C.R.

The structure of insulin receptor and its subunits. Evidence for multiple nonreduced forms and a 210,000 possible proreceptor. *J. Biol. Chem.* 257, 10392-10399 (1982 a)

Kasuga, M., Karlsson, F.A., Kahn, C.R.

Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000-dalton subunit of its own receptor. *Science* 215, 185-187 (1982 b)

Kato, M., Sasaki, T., Ohya, T., Nakanishi, H., Nishioka, H., Imamura, M., Takai, Y.

Physical and functional interaction of rabphilin-3A with alpha-actinin. *J. Biol. Chem.* 271, 31775-31778 (1996)

Katome, T., Obata, T., Matsushima, R., Masuyama, N., Cantley, L.C., Gotoh, Y., Kishi, K., Shiota, H., Ebina, Y.

Use of RNA interference-mediated gene silencing and adenoviral overexpression to elucidate the roles of AKT/protein kinase B isoforms in insulin actions. *J. Biol. Chem.* 278, 28312-28323 (2003)

Katz, E.B., Stenbit, A.E., Hatton, K., DePinho, R., Charron, M.J.

Cardiac and adipose tissue abnormalities but not diabetes in mice deficient in GLUT4. *Nature* 377, 151-155 (1995)

Kayano, T., Fukumoto, H., Eddy, R.L., Fan, Y.S., Byers, M.G., Shows, T.B., Bell, G.I.

Evidence for a family of human glucose transporter-like proteins. Sequence and gene localization of a protein expressed in fetal skeletal muscle and other tissues. *J. Biol. Chem.* 263, 15245-15248 (1988)

Kayano, T., Burant, C.F., Fukumoto, H., Gould, G.W., Fan, Y.S., Eddy, R.L., Byers, M.G., Shows, T.B., Seino, S., Bell, G.I.

Human facilitative glucose transporters. Isolation, functional characterization, and gene localization of cDNAs encoding an isoform (GLUT5) expressed in small intestine, kidney, muscle, and adipose tissue and an unusual glucose transporter pseudogene-like sequence (GLUT6). *J. Biol. Chem.* 265, 13276-13282 (1990)

Keller, K., Strube, M., Mueckler, M.

Functional expression of the human HepG2 and rat adipocyte glucose transporters in *Xenopus* oocytes. Comparison of kinetic parameters. *J. Biol. Chem.* 264, 18884-18889 (1989)

Kennedy, J.W., Hirshman, M.F., Gervino, E.V., Ocel, J.V., Forse, R.A., Hoenig, S.J., Aronson, D., Goodyear, L.J., Horton, E.S.

Acute exercise induces GLUT4 translocation in skeletal muscle of normal human subjects and subjects with type 2 diabetes. *Diabetes* 48, 1192-1197 (1999)

Kerner, W., Brückel, B., Böhm, B.O.

Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus (2004). Aktualisierung der 1. Auflage vom Juli 2001: Kerner, W., Fuchs, C., Redéalli, M., Boehm, B.O., Köbberling, J., Scherbaum, W.A., Tillil, H.

Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus. In: Evidenzbasierte Diabetes-Leitlinien DDG. Scherbaum, W.A., Lauterbach, K.W., Joost, H.G. (Hrsg.), 1. Auflage., Deutsche Diabetes-Gesellschaft, Düsseldorf (2001)

Kessler, A., Tomas, E., Immler, D., Meyer, H.E., Zorzano, A., Eckel, J.

Rab11 is associated with GLUT4-containing vesicles and redistributes in response to insulin. *Diabetologia* 43, 1518-1527 (2000)

Khan, A.H. & Pessin, J.E.

Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways. *Diabetologia* 45, 1475-1483 (2002)

Khan, A.H., Capilla, E., Hou, J.C., Watson, R.T., Smith, J.R., Pessin, J.E.

Entry of newly synthesized GLUT4 into the insulin-responsive storage compartment is dependent upon both the amino terminus and the large cytoplasmic loop. *J. Biol. Chem.* 279, 37505-37511 (2004)

Khayat, Z.A., Tong, P., Yaworsky, K., Bloch, R.J., Klip, A.

Insulin-induced actin filament remodeling colocalizes actin with phosphatidylinositol 3-kinase and GLUT4 in L6 myotubes. *J. Cell Sci.* 113, 279-290 (2000)

Kikuchi, A., Yamashita, T., Kawata, M., Yamamoto, K., Ikeda, K., Tanimoto, T., Takai, Y.

Purification and characterization of a novel GTP-binding protein with a molecular weight of 24,000 from bovine brain membranes. *J. Biol. Chem.* 263, 2897-2904 (1988)

Kimes, B.W. & Brandt, B.L.

Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. *Exp. Cell Res.* 98, 367-381 (1976)

Klip, A., Ramlal, T., Young, D.A., Holloszy, J.O.

Insulin-induced translocation of glucose transporters in rat hindlimb muscles. *FEBS Lett.* 224, 224-230 (1987)

Klip, A., Ramlal, T., Bilan, P.J., Cartee, G.D., Gulve, E.A., Holloszy, J.O.

Recruitment of GLUT-4 glucose transporters by insulin in diabetic rat skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172, 728-736 (1990)

Knight, J.B., Cao, K.T., Gibson, G.V., Olson, A.L.

Expression of a prenylation-deficient Rab4 interferes with propagation of insulin signaling through insulin receptor substrate-1. *Endocrinology* 141, 208-218 (2000)

Knowler, W.C., Barrett-Connor, E., Fowler, S.E., Hamman, R.F., Lachin, J.M., Walker, E.A., Nathan, D.M.; Diabetes Prevention Program Research Group

Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N. Engl. J. Med.* 346, 393-403 (2002)

Koepsell, H. & Spangenberg, J.

Function and presumed molecular structure of Na(+)-D-glucose cotransport systems. *J. Membr. Biol.* 138, 1-11 (1994)

Kohn, A.D., Summers, S.A., Birnbaum, M.J., Roth, R.A.

Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J. Biol. Chem.* 271, 31372-31378 (1996)

Kohn, A.D., Barthel, A., Kovacina, K.S., Boge, A., Wallach, B., Summers, S.A., Birnbaum, M.J., Scott, P.H., Lawrence, J.C., Roth, R.A.

Construction and characterization of a conditionally active version of serine/threonine kinase Akt. *J. Biol. Chem.* 273, 11937-11943 (1998)

Koistinen, H.A. & Zierath J.R.

Regulation of glucose transport in human skeletal muscle. *Ann. Med.* 34, 410-418 (2002)

Koistinen, H.A., Galuska, D., Chibalin, A.V., Yang, J., Zierath, J.R., Holman, G.D., Wallberg-Henriksson, H.

5-Amino-imidazole carboxamide riboside increases glucose transport and cell-surface GLUT4 content in skeletal muscle from subjects with type 2 diabetes. *Diabetes* 52, 1066-1072 (2003)

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

Contraction-induced translocation of the glucose transporter Glut4 in isolated ventricular cardiomyocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189, 1207-1214 (1992)

Kosloff, M. & Selinger, Z.

Substrate assisted catalysis--application to G proteins. *Trends Biochem. Sci.* 26, 161-166 (2001)

Köster, I., von Ferber, L., Hauner, H.

Die Kosten des Diabetes mellitus - Ergebnisse der KoDiM-Studie. PMV Forschungsgruppe der Universität zu Köln und Else-Kröner-Fresenius-Zentrum für Ernährungsmedizin der Technischen Universität München, Köln (2005)

Kotani, K., Ogawa, W., Matsumoto, M., Kitamura, T., Sakaue, H., Hino, Y., Miyake, K., Sano, W., Akimoto, K., Ohno, S., Kasuga, M.

Requirement of atypical protein kinase Clambda for insulin stimulation of glucose uptake but not for Akt activation in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Cell. Biol.* 18, 6971-6982 (1998)

Krook, A., Whitehead, J.P., Dobson, S.P., Griffiths, M.R., Ouwens, M., Baker, C., Hayward, A.C., Sen, S.K., Maassen, J.A., Siddle, K., Tavare, J.M., O'Rahilly, S.

Two naturally occurring insulin receptor tyrosine kinase domain mutants provide evidence that phosphoinositide 3-kinase activation alone is not sufficient for the mediation of insulin's metabolic and mitogenic effects. *J. Biol. Chem.* 272, 30208-30214 (1997)

Krook, A., Bjornholm, M., Galuska, D., Jiang, X.J., Fahlman, R., Myers Jr., M.G., Wallberg-Henriksson, H., Zierath, J.R.

Characterization of signal transduction and glucose transport in skeletal muscle from type 2 diabetic patients. *Diabetes* 49, 284-292 (2000)

Kubota, N., Tobe, K., Terauchi, Y., Eto, K., Yamauchi, T., Suzuki, R., Tsubamoto, Y., Komeda, K., Nakano, R., Miki, H., Satoh, S., Sekihara, H., Sciacchitano, S., Lesniak, M., Aizawa, S., Nagai, R., Kimura, S., Akanuma, Y., Taylor, S.I., Kadowaki, T.

Disruption of insulin receptor substrate 2 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory beta-cell hyperplasia. *Diabetes* 49, 1880-1889 (2000)

Kulkarni, R.N., Bruning, J.C., Winnay, J.N., Postic, C., Magnuson, M.A., Kahn, C.R.

Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic beta cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes. *Cell* 96, 329-339 (1999)

Kupriyanova, T.A. & Kandrор, K.V.

Akt-2 binds to Glut4-containing vesicles and phosphorylates their component proteins in response to insulin. *J. Biol. Chem.* 274, 1458-1464 (1999)

Kupriyanova, T.A., Kandrор, V., Kandrор, K.V.

Isolation and characterization of the two major intracellular Glut4 storage compartments. *J. Biol. Chem.* 277, 9133-9138 (2002)

la Cour, T.F., Nyborg, J., Thirup, S., Clark, B.F.

Structural details of the binding of guanosine diphosphate to elongation factor Tu from *E. coli* as studied by X-ray crystallography. *EMBO J.* 4, 2385-2388 (1985)

Laemmli, U.K.

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685 (1970)

Lai, F., Stubbs, L., Artzt, K.

Molecular analysis of mouse Rab11b: a new type of mammalian YPT/Rab protein. *Genomics* 22, 610-616 (1994)

Lampson, M.A., Racz, A., Cushman, S.W., McGraw, T.E.

Demonstration of insulin-responsive trafficking of GLUT4 and vpTR in fibroblasts. *J. Cell Sci.* 113, 4065-4076 (2000)

Lampson, M.A., Schmoranzer, J., Zeigerer, A., Simon, S.M., McGraw, T.E.

Insulin-regulated release from the endosomal recycling compartment is regulated by budding of specialized vesicles. *Mol. Biol. Cell* 12, 3489-3501 (2001)

Lapierre, L.A., Kumar, R., Hales, C.M., Navarre, J., Bhartur, S.G., Burnette, J.O., Provance Jr., D.W., Mercer, J.A., Bahler, M., Goldenring, J.R.

Myosin vb is associated with plasma membrane recycling systems. *Mol. Biol. Cell* 12, 1843-1857 (2001)

Lapierre, L.A., Dorn, M.C., Zimmerman, C.F., Navarre, J., Burnette, J.O., Goldenring, J.R.

Rab11b resides in a vesicular compartment distinct from Rab11a in parietal cells and other epithelial cells. *Exp. Cell Res.* 290, 322-331 (2003)

Larance, M., Ramm, G., Stockli, J., van Dam, E.M., Winata, S., Wasinger, V., Simpson, F., Graham, M., Junutula, J.R., Guilhaus, M., James, D.E.

Characterization of the role of the Rab GTPase-activating protein AS160 in insulin-regulated GLUT4 trafficking. *J. Biol. Chem.* 280, 37803-37813 (2005)

Lazar, T., Gotte, M., Gallwitz, D.

Vesicular transport: how many Ypt/Rab-GTPases make a eukaryotic cell? *Trends Biochem. Sci.* 22, 468-472 (1997)

Lee, J. & Pilch, P.F.

The insulin receptor: structure, function, and signaling. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 266, C319-C334 (1994)

Letourneur, F. & Klausner, R.D.

A novel di-leucine motif and a tyrosine-based motif independently mediate lysosomal targeting and endocytosis of CD3 chains. *Cell* 69, 1143-1157 (1992)

Levine, R. & Goldstein, M.S.

On the mechanism of action of insulin. *Recent Prog. Horm. Res.* 11, 343-380 (1955)

Li, G. & Stahl, P.D.

Structure-function relationship of the small GTPase rab5. *J. Biol. Chem.* 268, 24475-24480 (1993)

Li, L., Omata, W., Kojima, I., Shibata, H.

Direct interaction of Rab4 with syntaxin 4. *J. Biol. Chem.* 276, 5265-5273 (2001)

Li, Q., Manolescu, A., Ritzel, M., Yao, S., Slugoski, M., Young, J.D., Chen, X.Z., Cheeseman, C.I.

Cloning and functional characterization of the human GLUT7 isoform SLC2A7 from the small intestine. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 287, G236-G242 (2004)

Lindsay, A.J. & McCaffrey, M.W.

Rab11-FIP2 functions in transferrin recycling and associates with endosomal membranes via its COOH-terminal domain. *J. Biol. Chem.* 277, 27193-27199 (2002)

Lindsay, A.J., Hendrick, A.G., Cantalupo, G., Senic-Matuglia, F., Goud, B., Bucci, C., McCaffrey, M.W.

Rab coupling protein (RCP), a novel Rab4 and Rab11 effector protein. *J. Biol. Chem.* 277, 12190-12199 (2002)

Lindsay, A.J. & McCaffrey, M.W.

The C2 domains of the class I Rab11 family of interacting proteins target recycling vesicles to the plasma membrane. *J. Cell Sci.* 117, 4365-4375 (2004)

Lipschutz, J.H. & Mostov, K.E.

Exocytosis: the many masters of the exocyst. *Curr. Biol.* 12, R212-R214 (2002)

Lisinki, I., Schurmann, A., Joost, H.G., Cushman, S.W., Al-Hasani, H.

Targeting of GLUT6 (formerly GLUT9) and GLUT8 in rat adipose cells. *Biochem. J.* 358, 517-522 (2001)

Liu, J., Kimura, A., Baumann, C.A., Saltiel, A.R.

APS facilitates c-Cbl tyrosine phosphorylation and GLUT4 translocation in response to insulin in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Cell. Biol.* 22, 3599-3609 (2002)

Livingstone, C., James, D.E., Rice, J.E., Hanpeter, D., Gould, G.W.

Compartment ablation analysis of the insulin-responsive glucose transporter (GLUT4) in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. J.* 315, 487-495 (1996)

Lock, J.G., & Stow, J.L.

Rab11 in recycling endosomes regulates the sorting and basolateral transport of E-cadherin. *Mol. Biol. Cell* 16, 1744-1755 (2005)

Lutcke, A., Parton, R.G., Murphy, C., Olkannen, V.M., Dupree, P., Valencia, A., Simons, K., Zerial, M.

Cloning and subcellular localization of novel rab proteins reveals polarized and cell type-specific expression. *J. Cell Sci.* 107, 3437-3448 (1994)

Maegley, K.A., Admiraal, S.J., Herschlag, D.

Ras-catalyzed hydrolysis of GTP: a new perspective from model studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 8160-8166 (1996)

Malide, D., Dwyer, N.K., Blanchette-Mackie, E.J., Cushman, S.W.

Immunocytochemical evidence that GLUT4 resides in a specialized translocation post-endosomal VAMP2-positive compartment in rat adipose cells in the absence of insulin. *J. Histochem. Cytochem.* 45, 1083-1096 (1997)

Mammoto, A., Ohtsuka, T., Hotta, I., Sasaki, T., Takai, Y.

Rab11BP/Rabphilin-11, a downstream target of Rab11 small G protein implicated in vesicle recycling. *J. Biol. Chem.* 274, 25517-25524 (1999)

Marette, A. & Bukowiecki, L.J.

Stimulation of glucose transport by insulin and norepinephrine in isolated rat brown adipocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 257, C714-C721 (1989)

Marette, A., Burdett, E., Douen, A., Vranic, M., Klip, A.

Insulin induces the translocation of GLUT4 from a unique intracellular organelle to transverse tubules in rat skeletal muscle. *Diabetes* 41, 1562-1569 (1992 a)

Marette, A., Richardson, J.M., Ramlal, T., Balon, T.W., Vranic, M., Pessin, J.E., Klip, A.

Abundance, localization, and insulin-induced translocation of glucose transporters in red and white muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 263, C443-C452 (1992 b)

Marie, N., Lindsay, A.J., McCaffrey, M.W.

Rab coupling protein is selectively degraded by calpain in a Ca²⁺ dependent manner. *Biochem. J.* 389, 223-231 (2005)

Martin, L.B., Shewan, A., Millar, C.A., Gould, G.W., James, D.E.

Vesicle-associated membrane protein 2 plays a specific role in the insulin-dependent trafficking of the facilitative glucose transporter GLUT4 in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 273, 1444-1452 (1998)

Martin, S., Tellam, J., Livingstone, C., Slot, J.W., Gould, G.W., James, D.E.

The glucose transporter (GLUT-4) and vesicle-associated membrane protein-2 (VAMP-2) are segregated from recycling endosomes in insulin-sensitive cells. *J. Cell Biol.* 134, 625-635 (1996)

Martin, S., Rice, J.E., Gould, G.W., Keller, S.R., Slot, J.W., James, D.E.

The glucose transporter GLUT4 and the aminopeptidase vp165 colocalise in tubulo-vesicular elements in adipocytes and cardiomyocytes. *J. Cell Sci.* 110, 2281-2291 (1997)

Martin, S., Ramm, G., Lyttle, C.T., Meerloo, T., Stoorvogel, W., James, D.E.

Biogenesis of insulin-responsive GLUT4 vesicles is independent of brefeldin A-sensitive trafficking. *Traffic* 1, 652-660 (2000)

Martinez-Arca, S., Lalioti, V.S., Sandoval, I.V.

Intracellular targeting and retention of the glucose transporter GLUT4 by the perinuclear storage compartment involves distinct carboxyl-tail motifs. *J. Cell Sci.* 113, 1705-1715 (2000)

Mastick, C.C. & Saltiel, A.R.

Insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of caveolin is specific for the differentiated adipocyte phenotype in 3T3-L1 cells. *J. Biol. Chem.* 272, 20706-20714 (1997)

Matesic, L.E., Yip, R., Reuss, A.E., Swing, D.A., O'Sullivan, T.N., Fletcher, C.F., Copeland, N.G., Jenkins, N.A.

Mutations in *Mlph*, encoding a member of the Rab effector family, cause the melanosome transport defects observed in leaden mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 10238-10243 (2001)

Mauvais-Jarvis, F., Ueki, K., Fruman, D.A., Hirshman, M.F., Sakamoto, K., Goodyear, L.J., Iannaccone, M., Accili, D., Cantley, L.C., Kahn, C.R.

Reduced expression of murine p85alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase improves insulin signaling and ameliorates diabetes. *J. Clin. Invest.* 109, 141-149 (2002)

McLauchlan, H., Newell, J., Morrice, N., Osborne, A., West, M., Smythe, E.

A novel role for Rab5-GDI in ligand sequestration in clathrin-coated pits. *Curr. Biol.* 8, 34-45 (1998)

Meienhofer, J., Schnabel, E., Bremer, H., Brinkhoff, O., Zabel, R., Sroka, W., Klostermeyer, H., Brandenburg, D., Okuda, T., Zahn, H.

Synthese der Insulinketten und ihre Kombination zu insulinaktiven Präparaten. *Zeitschr. f. Naturforsch.* 18, 1120-1121 (1963)

Melvin, D.R., Marsh, B.J., Walmsley, A.R., James, D.E., Gould, G.W.

Analysis of amino and carboxy terminal GLUT-4 targeting motifs in 3T3-L1 adipocytes using an endosomal ablation technique. *Biochemistry* 38, 1456-1462 (1999)

Menasche, G., Pastural, E., Feldmann, J., Certain, S., Ersoy, F., Dupuis, S., Wulffraat, N., Bianchi, D., Fischer, A., Le Deist, F., de Saint Basile, G.

Mutations in RAB27A cause Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome. *Nat. Genet.* 25, 173-176 (2000)

Meyers, J.M. & Prekeris, R.

Formation of mutually exclusive Rab11 complexes with members of the family of Rab11-interacting proteins regulates Rab11 endocytic targeting and function. *J. Biol. Chem.* 277, 49003-49010 (2002)

Michael, M.D., Kulkarni, R.N., Postic, C., Previs, S.F., Shulman, G.I., Magnuson, M.A., Kahn, C.R.

Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. *Mol. Cell* 6, 87-97 (2000)

Miinea, C.P., Sano, H., Kane, S., Sano, E., Fukuda, M., Peranen, J., Lane, W.S., Lienhard, G.E.

AS160, the Akt substrate regulating GLUT4 translocation, has a functional Rab GTPase-activating protein domain. *Biochem. J.* 391, 87-93 (2005)

Millar, C.A., Shewan, A., Hickson, G.R., James, D.E., Gould, G.W.

Differential regulation of secretory compartments containing the insulin-responsive glucose transporter 4 in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Biol. Cell* 10, 3675-3688 (1999)

Min, J., Okada, S., Kanzaki, M., Elmendorf, J.S., Coker, K., Ceresa, B.P., Syu, L.J., Noda, Y., Saltiel, A.R., Pessin, J.E.

Synip: a novel insulin-regulated syntaxin 4 binding-protein mediating GLUT4 translocation in adipocytes. *Mol. Cell* 3, 751-760 (1999)

Minokoshi, Y., Kahn, C.R., Kahn, B.B.

Tissue-specific ablation of the GLUT4 glucose transporter or the insulin receptor challenges assumptions about insulin action and glucose homeostasis. *J. Biol. Chem.* 278, 33609-33612 (2003)

Miranda, P.J., DeFronzo, R.A., Califf, R.M., Guyton, J.R.

Metabolic syndrome: definition, pathophysiology, and mechanisms. *Am. Heart J.* 149, 33-45 (2005)

Misura, K.M., Scheller, R.H., Weis, W.I.

Three-dimensional structure of the neuronal-Sec1-syntaxin 1a complex. *Nature* 404, 355-362 (2000)

Mitchell, H., Choudhury, A., Pagano, R.E., Leof, E.B.

Ligand-dependent and -independent transforming growth factor-beta receptor recycling regulated by clathrin-mediated endocytosis and Rab11. *Mol. Biol. Cell* 15, 4166-4178 (2004)

Miura, T., Suzuki, W., Ishihara, E., Arai, I., Ishida, H., Seino, Y., Tanigawa, K.

Impairment of insulin-stimulated GLUT4 translocation in skeletal muscle and adipose tissue in the Tsumura Suzuki obese diabetic mouse: a new genetic animal model of type 2 diabetes. *Eur. J. Endocrinol.* 145, 785-790 (2001)

Mizoguchi, A., Yano, Y., Hamaguchi, H., Yanagida, H., Ide, C., Zahraoui, A., Shirataki, H., Sasaki, T., Takai, Y.

Localization of Rabphilin-3A on the synaptic vesicle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202, 1235-1243 (1994)

Mohamed-Ali, V., Pinkney, J.H., Coppack, S.W.

Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 22, 1145-1158 (1998)

Moller, D.E., Yokota, A., Caro, J.F., Flier, J.S.

Tissue-specific expression of two alternatively spliced insulin receptor mRNAs in man. *Mol. Endocrinol.* 3, 1263-1269 (1989)

Moore, I., Schell, J., Palme, K.

Subclass-specific sequence motifs identified in Rab GTPases. *Trends Biochem. Sci.* 20, 10-12 (1995)

Moore, R.H., Millman, E.E., Alpizar-Foster, E., Dai, W., Knoll, B.J.

Rab11 regulates the recycling and lysosome targeting of beta2-adrenergic receptors. *J. Cell Sci.* 117, 3107-3117 (2004)

Mu, J., Brozinick Jr., J.T., Valladares, O., Bucan, M., Birnbaum, M.J.

A role for AMP-activated protein kinase in contraction- and hypoxia-regulated glucose transport in skeletal muscle. *Mol. Cell* 7, 1085-1094 (2001)

Mueckler, M., Caruso, C., Baldwin, S.A., Panico, M., Blench, I., Morris, H.R., Allard, W.J., Lienhard, G.E., Lodish, H.F.

Sequence and structure of human glucose transporter. *Science* 229, 941-945 (1985)

Mueckler, M.

Facilitative glucose transporter. *Eur. J. Biochem.* 219, 713-725 (1994)

Mueckler, M., Hresko, R.C., Sato, M.

Structure, function and biosynthesis of GLUT1. *Biochem. Soc. Trans.* 25, 951-954 (1997)

Mukherjee, S., Ghosh, R.N., Maxfield, F.R.

Endocytosis. *Physiol. Rev.* 77, 759-803 (1997)

Munoz, P., Roseblatt, M., Testar, X., Palacin, M., Thoidis, G., Pilch, P.F., Zorzano, A.

The T-tubule is a cell-surface target for insulin-regulated recycling of membrane proteins in skeletal muscle. *Biochem. J.* 312, 393-400 (1995 a)

Munoz, P., Roseblatt, M., Testar, X., Palacin, M., Zorzano, A.

Isolation and characterization of distinct domains of sarcolemma and T-tubules from rat skeletal muscle. *Biochem. J.* 307, 273-280 (1995 b)

Nakashima, N., Sharma, P.M., Imamura, T., Bookstein, R., Olefsky, J.M.

The tumor suppressor PTEN negatively regulates insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 275, 12889-12895 (2000)

Nathan, D.M.

Long-term complications of diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 328, 1676-1685 (1993)

Nielsen, E., Christoforidis, S., Uttenweiler-Joseph, S., Miaczynska, M., Dewitte, F., Wilm, M., Hoflack, B., Zerial, M.

Rabenosyn-5, a novel Rab5 effector, is complexed with hVPS45 and recruited to endosomes through a FYVE finger domain. *J. Cell Biol.* 151, 601-612 (2000)

Nishimura, N., Nakamura, H., Takai, Y., Sano, K.

Molecular cloning and characterization of two rab GDI species from rat brain: brain-specific and ubiquitous types. *J. Biol. Chem.* 269, 14191-14198 (1994)

Ohmori, T., Takeyama, Y., Ueda, T., Hiroyoshi, M., Nakanishi, H., Ohyanagi, H., Saitoh, Y., Takai, Y.

Purification and characterization of a novel GTP-binding protein with a Mr value of 24,000 from rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 169, 816-823 (1990)

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

Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin-induced glucose transport and antilipolysis in rat adipocytes. Studies with a selective inhibitor wortmannin. *J. Biol. Chem.* 269, 3568-3573 (1994)

Olson, A.L. & Pessin, J.E.

Structure, function, and regulation of the mammalian facilitative glucose transporter gene family. *Ann. Rev. Nutr.* 16, 235-256 (1996)

Omata, W., Shibata, H., Li, L., Takata, K., Kojima, I.

Actin filaments play a critical role in insulin-induced exocytotic recruitment but not in endocytosis of GLUT4 in isolated rat adipocytes. *Biochem. J.* 346, 321-328 (2000)

Ostermeier, C. & Brunger, A.T.

Structural basis of Rab effector specificity: crystal structure of the small G protein Rab3A complexed with the effector domain of rabphilin-3A. *Cell* 96, 363-374 (1999)

Paduch, M., Jelen, F., Otlewski, J.

Structure of small G proteins and their regulators. *Acta Biochim. Pol.* 48, 829-850 (2001)

Pagano, A., Crottet, P., Prescianotto-Baschong, C., Spiess, M.

In vitro formation of recycling vesicles from endosomes requires adaptor protein-1/clathrin and is regulated by rab4 and the connector rabaptin-5. *Mol. Biol. Cell* 15, 4990-5000 (2004)

Pai, E.F., Krengel, U., Petsko, G.A., Goody, R.S., Kabsch, W., Wittinghofer, A.

Refined crystal structure of the triphosphate conformation of H-Ras p21 at 1.35 Å resolution: implications for the mechanism of GTP hydrolysis. *EMBO J.* 9, 2351-2359 (1990)

Palacios, S., Lalioti, V., Martinez-Arca, S., Chattopadhyay, S., Sandoval, I.V.

Recycling of the insulin-sensitive glucose transporter GLUT4. Access of surface internalized GLUT4 molecules to the perinuclear storage compartment is mediated by the Phe5-Gln6-Gln7-Ile8 motif. *J. Biol. Chem.* 276, 3371-3383 (2001)

Pandini, G., Frasca, F., Mineo, R., Sciacca, L., Vigneri, R., Belfiore, A.

Insulin/insulin-like growth factor I hybrid receptors have different biological characteristics depending on the insulin receptor isoform involved. *J. Biol. Chem.* 277, 39684-39695 (2002)

Park, C.R. & Johnson, L.H.

Effect of insulin on transport of glucose and galactose into cells of rat muscle and brain. *Am. J. Physiol.* 182, 17-23 (1955)

Pasqualato, S., Senic-Matuglia, F., Renault, L., Goud, B., Salamero, J., Cherfils, J.

The structural GDP/GTP cycle of Rab11 reveals a novel interface involved in the dynamics of recycling endosomes. *J. Biol. Chem.* 279, 11480-11488 (2004)

Pasqualato, S. & Cherfils, J.

Crystallographic evidence for substrate-assisted GTP hydrolysis by a small GTP binding protein. *Structure (Camb.)* 13, 533-540 (2005)

Patel, N., Rudich, A., Khayat, Z.A., Garg, R., Klip, A.

Intracellular segregation of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate by insulin-dependent actin remodeling in L6 skeletal muscle cells. *Mol. Cell. Biol.* 23, 4611-4626 (2003)

Pause, J.

Dissertationsschrift, Medizinische Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (2005)

Peden, A.A., Schonteich, E., Chun, J., Junutula, J.R., Scheller, R.H., Prekeris, R.

The RCP-Rab11 complex regulates endocytic protein sorting. *Mol. Biol. Cell* 15, 3530-3541 (2004)

Pedersen, O., Bak, J.F., Andersen, P.H., Lund, S., Moller, D.E., Flier, J.S., Kahn, B.B.

Evidence against altered expression of GLUT1 or GLUT4 in skeletal muscle of patients with obesity or NIDDM. *Diabetes* 39, 865-870 (1990)

Pelicci, G., Lanfrancone, L., Grignani, F., McGlade, J., Cavallo, F., Forni, G., Nicoletti, I., Grignani, F., Pawson, T., Pelicci, P.G.

A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction. *Cell* 70, 93-104 (1992)

Pereira-Leal, J.B. & Seabra, M.C.

The mammalian Rab family of small GTPases: definition of family and subfamily sequence motifs suggests a mechanism for functional specificity in the Rab superfamily. *J. Mol. Biol.* 301, 1077-1087 (2000)

Pessin, J.E. & Saltiel, A.R.

Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 106, 165-169 (2000)

Peyrollier, K., Hajduch, E., Gray, A., Litherland, G.J., Prescott, A.R., Leslie, N.R., Hundal, H.S.

A role for the actin cytoskeleton in the hormonal and growth-factor-mediated activation of protein kinase B. *Biochem. J.* 352, 617-622 (2000)

Pfeffer, S.

Membrane domains in the secretory and endocytic pathways. *Cell* 112, 507-517 (2003)

Phay, J.E., Hussain, H.B., Moley, J.F.

Cloning and expression analysis of a novel member of the facilitative glucose transporter family, SLC2A9 (GLUT9). *Genomics* 66, 217-220 (2000)

Piper, R.C., Tai, C., Kulesza, P., Pang, S., Warnock, D., Baenziger, J., Slot, J.W., Geuze, H.J., Puri, C., James, D.E.

GLUT-4 NH2 terminus contains a phenylalanine-based targeting motif that regulates intracellular sequestration. *J. Cell Biol.* 121, 1221-1232 (1993)

Ploug, T., van Deurs, B., Ai, H., Cushman, S.W., Ralston, E.

Analysis of GLUT4 distribution in whole skeletal muscle fibers: identification of distinct compartments that are recruited by insulin and muscle contractions. *J. Cell Biol.* 142, 1429-1446 (1998)

Prekeris, R., Klumperman, J., Scheller, R.H.

A Rab11/Rip11 protein complex regulates apical membrane trafficking via recycling endosomes. *Mol. Cell* 6, 1437-1448 (2000)

Prekeris, R., Davies, J.M., Scheller, R.H.

Identification of a novel Rab11/25 binding domain present in Eferin and Rip proteins. *J. Biol. Chem.* 276, 38966-38970 (2001)

Prekeris, R.

Rabs, Rips, FIPs, and endocytic membrane traffic. *Sci. World J.* 3, 870-880 (2003)

Ramiya, V.K., Maraist, M., Arfors, K.E., Schatz, D.A., Peck, A.B., Cornelius, J.G.

Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells. *Nat. Med.* 6, 278-282 (2000)

Ramm, G., Slot, J.W., James, D.E., Stoorvogel, W.

Insulin recruits GLUT4 from specialized VAMP2-carrying vesicles as well as from the dynamic endosomal/trans-Golgi network in rat adipocytes. *Mol. Biol. Cell* 11, 4079-4091 (2000)

Randhawa, V.K., Bilan, P.J., Khayat, Z.A., Daneman, N., Liu, Z., Ramlal, T., Volchuk, A., Peng, X.R., Coppola, T., Regazzi, R., Trimble, W.S., Klip, A.

VAMP2, but not VAMP3/cellubrevin, mediates insulin-dependent incorporation of GLUT4 into the plasma membrane of L6 myoblasts. *Mol. Biol. Cell* 11, 2403-2417 (2000)

Rea, S. & James, D.E.

Moving GLUT4: the biogenesis and trafficking of GLUT4 storage vesicles. *Diabetes* 46, 1667-1677 (1997)

Rea, S., Martin, L.B., McIntosh, S., Macaulay, S.L., Ramsdale, T., Baldini, G., James, D.E.

Syndet, an adipocyte target SNARE involved in the insulin-induced translocation of GLUT4 to the cell surface. *J. Biol. Chem.* 273, 18784-18792 (1998)

Ren, J.M., Semenkovich, C.F., Gulve, E.A., Gao, J., Holloszy, J.O.

Exercise induces rapid increase in GLUT4 expression, glucose transporter capacity and insulin-stimulated glycogen storage in muscle. *J. Biol. Chem.* 269, 14396-14401 (1994)

Ren, M., Xu, G., Zeng, J., de Lemos-Chiarandini, C., Adesnik, M., Sabatini, D.D.

Hydrolysis of GTP on rab11 is required for the direct delivery of transferrin from the pericentriolar recycling compartment to the cell surface but not from sorting endosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 6187-6192 (1998)

Resat, H., Straatsma, T.P., Dixon, D.A., Miller, J.H.

The arginine finger of RasGAP helps Gln-61 align the nucleophilic water in GAP-stimulated hydrolysis of GTP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 6033-6038 (2001)

Ribon, V., Johnson, J.H., Camp, H.S., Saltiel, A.R.

Thiazolidinediones and insulin resistance: peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation stimulates expression of the CAP gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 14751-14756 (1998 a)

Ribon, V., Printen, J.A., Hoffman, N.G., Kay, B.K., Saltiel, A.R.

A novel, multifunctional c-Cbl binding protein in insulin receptor signaling in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Cell. Biol.* 18, 872-879 (1998 b)

Rittinger, K., Walker, P.A., Eccleston, J.F., Nurmahomed, K., Owen, D., Laue, E., Gamblin, S.J., Smerdon, S.J.

Crystal structure of a small G protein in complex with the GTPase-activating protein rhoGAP. *Nature* 388, 693-697 (1997)

Robinson, M.S., Watts, C., Zerial, M.

Membrane dynamics in endocytosis. *Cell* 84, 13-21 (1996)

Rogers, S., James, D.E., Best, J.D.

Identification of a novel facilitative glucose transporter like protein-GLUT8. *Diabetes* 47, 45A (1998)

Rogers, S., Macheda, M.L., Docherty, S.E., Carty, M.D., Henderson, M.A., Soeller, W.C., Gibbs, E.M., James, D.E., Best, J.D.

Identification of a novel glucose transporter-like protein-GLUT-12. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 282, E733-E738 (2002)

Rogers, S., Chandler, J.D., Clarke, A.L., Petrou, S., Best, J.D.

Glucose transporter GLUT12-functional characterization in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308, 422-426 (2003)

Roosterman, D., Schmidlin, F., Bunnnett, N.W.

Rab5a and Rab11a mediate agonist-induced trafficking of protease-activated receptor 2. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 284, C1319-C1329 (2003)

Roosterman, D., Cottrell, G.S., Schmidlin, F., Steinhoff, M., Bunnnett, N.W.

Recycling and resensitization of the neurokinin 1 receptor. Influence of agonist concentration and Rab GTPases. *J. Biol. Chem.* 279, 30670-30679 (2004)

Rubin, G.M., Yandell, M.D., Wortman, J.R., Gabor Miklos, G.L., Nelson, C.R., Hariharan, I.K., Fortini, M.E., Li, P.W., Apweiler, R., Fleischmann, W., Cherry, J.M., Henikoff, S., Skupski, M.P., Misra, S., Ashburner, M., Birney, E., Boguski, M.S., Brody, T., Brokstein, P., Celniker, S.E., Chervitz, S.A., Coates, D., Cravchik, A., Gabrielian, A., Galle, R.F., Gelbart, W.M., George, R.A., Goldstein, L.S., Gong, F., Guan, P., Harris, N.L., Hay, B.A., Hoskins, R.A., Li, J., Li, Z., Hynes, R.O., Jones, S.J., Kuehl, P.M., Lemaitre, B., Littleton, J.T., Morrison, D.K., Mungall, C., O'Farrell, P.H., Pickeral, O.K., Shue, C., VossHall, L.B., Zhang, J., Zhao, Q., Zheng, X.H., Lewis, S.

Comparative genomics of the eukaryotes. *Science* 287, 2204-2215 (2000)

Rudich, A. & Klip, A.

Push/pull mechanisms of GLUT4 traffic in muscle cells. *Acta Physiol. Scand.* 178, 297-308 (2003)

Rudich, A., Konrad, D., Torok, D., Ben-Romano, R., Huang, C., Niu, W., Garg, R.R., Wijesekara, N., Germinario, R.J., Bilan, P.J., Klip, A.

Indinavir uncovers different contributions of GLUT4 and GLUT1 towards glucose uptake in muscle and fat cells and tissues. *Diabetologia* 46, 649-658 (2003)

Rybin, V., Ullrich, O., Rubino, M., Alexandrov, K., Simon, I., Seabra, M.C., Goody, R., Zerial, M.

GTPase activity of Rab5 acts as a timer for endocytic membrane fusion. *Nature* 383, 266-269 (1996)

Ryder, J.W., Fahlman, R., Wallberg-Henriksson, H., Alessi, D.R., Krook, A., Zierath, J.R.

Effect of contraction on mitogen-activated protein kinase signal transduction in skeletal muscle. Involvement of the mitogen- and stress-activated protein kinase 1. *J. Biol. Chem.* 275, 1457-1462 (2000 a)

Ryder, J.W., Yang, J., Galuska, D., Rincon, J., Bjornholm, M., Krook, A., Lund, S., Pedersen, O., Wallberg-Henriksson, H., Zierath, J.R., Holman, G.D.

Use of a novel impermeable biotinylated photolabeling reagent to assess insulin- and hypoxia-stimulated cell surface GLUT4 content in skeletal muscle from type 2 diabetic patients. *Diabetes* 49, 647-654 (2000 b)

Salminen, A. & Novick, P.J.

A ras-like protein is required for a post-Golgi event in yeast secretion. *Cell* 49, 527-538 (1987)

Saltiel, A.R. & Kahn, C.R.

Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414, 799-806 (2001)

Saltiel, A.R. & Pessin, J.E.

Insulin signaling in microdomains of the plasma membrane. *Traffic* 4, 711-716 (2003)

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.

Molecular cloning: a laboratory manual. 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York City, NY, USA (1989)

Sanger, F. & Tuppy, H.

The amino-acid sequence in the phenylalanyl chain of insulin. I. The identification of lower peptides from partial hydrolysates. *Biochem. J.* 49, 463-481 (1951)

Sanger, F. & Thompson, E.O.

The amino-acid sequence in the glycyl chain of insulin. I. The identification of lower peptides from partial hydrolysates. *Biochem. J.* 53, 353-366 (1953)

Sano, H., Kane, S., Sano, E., Miinea, C.P., Asara, J.M., Lane, W.S., Garner, C.W., Lienhard, G.E.

Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation. *J. Biol. Chem.* 278, 14599-14602 (2003)

Santalucía, T., Camps, M., Castello, A., Munoz, P., Nuel, A., Testar, X., Palacin, M., Zorzano, A.

Developmental regulation of GLUT-1 (erythroid/Hep G2) and GLUT-4 (muscle/fat) glucose transporter expression in rat heart, skeletal muscle, and brown adipose tissue. *Endocrinology* 130, 837-846 (1992)

Sasaki, T., Kikuchi, A., Araki, S., Hata, Y., Isomura, M., Kuroda, S., Takai, Y.

Purification and characterization from bovine brain cytosol of a protein that inhibits the dissociation of GDP from and the subsequent binding of GTP to smg p25A, a ras p21-like GTP-binding protein. *J. Biol. Chem.* 265, 2333-2337 (1990)

Sasaki, T., Minoshima, S., Shiohama, A., Shintani, A., Shimizu, A., Asakawa, S., Kawasaki, K., Shimizu, N.

Molecular cloning of a member of the facilitative glucose transporter gene family GLUT11 (SLC2A11) and identification of transcription variants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289, 1218-1224 (2001)

Satoh, S., Nishimura, H., Clark, A.E., Kozka, I.J., Vannucci, S.J., Simpson, I.A., Quon, M.J., Cushman, S.W., Holman, G.D.

Use of bismannose photolabel to elucidate insulin-regulated GLUT4 subcellular trafficking kinetics in rat adipose cells. Evidence that exocytosis is a critical site of hormone action. *J. Biol. Chem.* 268, 17820-17829 (1993)

Savina, A., Fader, C.M., Damiani, M.T., Colombo, M.I.

Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner. *Traffic* 6, 131-143 (2005)

Sbrissa, D., Ikononov, O.C., Shisheva, A.

PIKfyve, a mammalian ortholog of yeast Fab1p lipid kinase, synthesizes 5-phosphoinositides. Effect of insulin. *J. Biol. Chem.* 274, 21589-21597 (1999)

Schalk, I., Zeng, K., Wu, S.K., Stura, E.A., Matteson, J., Huang, M., Tandon, A., Wilson, I.A., Balch, W.E.

Structure and mutational analysis of Rab GDP-dissociation inhibitor. *Nature* 381, 42-48 (1996)

Scheffzek, K., Klebe, C., Fritz-Wolf, K., Kabsch, W., Wittinghofer, A.

Crystal structure of the nuclear Ras-related protein Ran in its GDP-bound form. *Nature* 374, 378-381 (1995)

Scheffzek, K., Lautwein, A., Kabsch, W., Ahmadian, M.R., Wittinghofer, A.

Crystal structure of the GTPase-activating domain of human p120GAP and implications for the interaction with Ras. *Nature* 384, 591-596 (1996)

Scheffzek, K., Ahmadian, M.R., Kabsch, W., Wiesmuller, L., Lautwein, A., Schmitz, F., Wittinghofer, A.

The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science* 277, 333-338 (1997)

Scherthaner, G.

Cardiovascular mortality and morbidity in type-2 diabetes mellitus. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 31, S3-S13 (1996)

Schimmoller, F., Simon, I., Pfeffer, S.R.

RabGTPases, directors of vesicle docking. *J. Biol. Chem.* 273, 22161-22164 (1998)

Schiott, B., Iversen, B.B., Madsen, G.K., Larsen, F.K., Bruice, T.C.

On the electronic nature of low-barrier hydrogen bonds in enzymatic reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 12799-12802 (1998)

Schlessinger, J.

Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103, 211-225 (2000)

Schluter, O.M., Schnell, E., Verhage, M., Tzonopoulos, T., Nicoll, R.A., Janz, R., Malenka, R.C., Geppert, M., Sudhof, T.C.

Rabphilin knock-out mice reveal that rabphilin is not required for rab3 function in regulating neurotransmitter release. *J. Neurosci.* 19, 5834-5846 (1999)

Schnatwinkel, C., Christoforidis, S., Lindsay, M.R., Uttenweiler-Joseph, S., Wilm, M., Parton, R.G., Zerial, M.

The Rab5 effector Rabankyrin-5 regulates and coordinates different endocytic mechanisms. *PLoS Biol.* 2, E261 (2004)

Schweins, T., Geyer, M., Scheffzek, K., Warshel, A., Kalbitzer, H.R., Wittinghofer, A.

Substrate-assisted catalysis as a mechanism for GTP hydrolysis of p21ras and other GTP-binding proteins. *Nat. Struct. Biol.* 2, 36-44 (1995)

Seabra, M.C., Goldstein, J.L., Sudhof, T.C., Brown, M.S.

Rab geranylgeranyl transferase. A multisubunit enzyme that prenylates GTP-binding proteins terminating in Cys-X-Cys or Cys-Cys. *J. Biol. Chem.* 267, 14497-14503 (1992)

Segev, N., Mulholland, J., Botstein, D.

The yeast GTP-binding YPT1 protein and a mammalian counterpart are associated with the secretion machinery. *Cell* 52, 915-924 (1988)

Segev, N.

Ypt and Rab GTPases: insight into functions through novel interactions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 500-511 (2001)

Sevilla, L., Tomas, E., Munoz, P., Guma, A., Fischer, Y., Thomas, J., Ruiz-Montasell, B., Testar, X., Palacin, M., Blasi, J., Zorzano, A.

Characterization of two distinct intracellular GLUT4 membrane populations in muscle fiber. Differential protein composition and sensitivity to insulin. *Endocrinology* 138, 3006-3015 (1997)

Shao, J., Yamashita, H., Qiao, L., Friedman, J.E.

Decreased Akt kinase activity and insulin resistance in C57BL/KsJ-Leprdb/db mice. *J. Endocrinol.* 167, 107-115 (2000)

Sharma, P.M., Egawa, K., Huang, Y., Martin, J.L., Huvar, I., Boss, G.R., Olefsky, J.M.

Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity by adenovirus-mediated gene transfer and its effect on insulin action. *J. Biol. Chem.* 273, 18528-18537 (1998)

Sheff, D.R., Daro, E.A., Hull, M., Mellman, I.

The receptor recycling pathway contains two distinct populations of early endosomes with different sorting functions. *J. Cell Biol.* 145, 123-139 (1999)

Sheff, D., Pelletier, L., O'Connell, C.B., Warren, G., Mellman, I.

Transferrin receptor recycling in the absence of perinuclear recycling endosomes. *J. Cell Biol.* 156, 797-804 (2002)

Shepherd, P.R., Gibbs, E.M., Wesslau, C., Gould, G.W., Kahn, B.B.

Human small intestine facilitative fructose/glucose transporter (GLUT5) is also present in insulin-responsive tissues and brain. Investigation of biochemical characteristics and translocation. *Diabetes* 41, 1360-1365 (1992)

Sherman, L.A., Hirshman, M.F., Cormont, M., Le Marchand-Brustel, Y., Goodyaer, L.J.
Differential effects of insulin and exercise on Rab4 distribution in rat skeletal muscle. *Endocrinology* 137, 266-273 (1996)

Shewan, A.M., Marsh, B.J., Melvin, D.R., Martin, S., Gould, G.W., James, D.E.
The cytosolic C-terminus of the glucose transporter GLUT4 contains an acidic cluster endosomal targeting motif distal to the dileucine signal. *Biochem. J.* 350, 99-107 (2000)

Shewan, A.M., van Dam, E.M., Martin, S., Luen, T.B., Hong, W., Bryant, N.J., James, D.E.
GLUT4 recycles via a trans-Golgi network (TGN) subdomain enriched in Syntaxins 6 and 16 but not TGN38: involvement of an acidic targeting motif. *Mol. Biol. Cell* 14, 973-986 (2003)

Shibata, H., Omata, W., Kojima, I.
Insulin stimulates guanine nucleotide exchange on Rab4 via a wortmannin-sensitive signaling pathway in rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* 272, 14542-14546 (1997)

Shirataki, H., Kaibuchi, K., Sakoda, T., Kishida, S., Yamaguchi, T., Wada, K., Miyazaki, M., Takai, Y.
Rabphilin-3A, a putative target protein for smg p25A/rab3A p25 small GTP-binding protein related to synaptotagmin. *Mol. Cell. Biol.* 13, 2061-2068 (1993)

Shisheva, A., Sudhof, T.C., Czech, M.P.
Cloning, characterization, and expression of a novel GDP dissociation inhibitor isoform from skeletal muscle. *Mol. Cell. Biol.* 14, 3459-3468 (1994)

Simonsen, A., Lippe, R., Christoforidis, S., Gaullier, J.M., Brech, A., Callaghan, J., Toh, B.H., Murphy, C., Zerial, M., Stenmark, H.
EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature* 394, 494-498 (1998)

Simpson, J.C. & Jones, A.T.
Early endocytic Rabs: functional prediction to functional characterization. *Biochem. Soc. Symp.* 72, 99-108 (2005)

Slot, J.W., Geuze, H.J., Gigengack, S., James, D.E., Lienhard, G.E.,
Translocation of the glucose transporter GLUT4 in cardiac myocytes of the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 7815-7819 (1991)

Smith, R.M., Charron, M.J., Shah, N., Lodish, H.F., Jarett, L.
Immunoelectron microscopic demonstration of insulin-stimulated translocation of glucose transporters to the plasma membrane of isolated rat adipocytes and masking of the carboxyl-terminal epitope of intracellular GLUT4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 6893-6897 (1991)

Soldati, T., Shapiro, A.D., Svejstrup, A.B., Pfeffer, S.R.
Membrane targeting of the small GTPase Rab9 is accompanied by nucleotide exchange. *Nature* 369, 76-78 (1994)

Sollner, T., Whiteheart, S.W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P., Rothman, J.E.

SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362, 318-324 (1993)

Somwar, R., Kim, D.Y., Sweeney, G., Huang, C., Niu, W., Lador, C., Ramlal, T., Klip, A.
GLUT4 translocation precedes the stimulation of glucose uptake by insulin in muscle cells: potential activation of GLUT4 via p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochem. J.* 359, 639-649 (2001)

Sonnichsen, B., De Renzis, S., Nielsen, E., Rietdorf, J., Zerial, M.

Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J. Cell Biol.* 149, 901-914 (2000)

Sowers, J.R., Epstein, M., Frohlich, E.D.

Diabetes, hypertension, and cardiovascular disease: an update. *Hypertension* 37, 1053-1059 (2001)

Spoerner, M., Herrmann, C., Vetter, I.R., Kalbitzer, H.R., Wittinghofer, A.

Dynamic properties of the Ras switch I region and its importance for binding to effectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 4944-4949 (2001)

Staub, P.A., Nelson, J.G., Reichart, D.R., Olefsky, J.M.

Platelet-derived growth factor inhibits insulin stimulation of insulin receptor substrate-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase in 3T3-L1 adipocytes without affecting glucose transport. *J. Biol. Chem.* 273, 25139-25147 (1998)

Stenbit, A.E., Burcelin, R., Katz, E.B., Tsao, T.S., Gautier, N., Charron, M.J., Le Marchand-Brustel, Y.

Diverse effects of GLUT4 ablation on glucose uptake and glycogen synthesis in red and white muscle. *J. Clin. Invest.* 98, 629-634 (1996)

Stenbit, A.E., Tsao, T.S., Li, J., Burcelin, R., Geenen, D.L., Factor, S.M., Houseknecht, K., Katz, E.B., Charron, M.J.

GLUT4 heterozygous knockout mice develop muscle insulin resistance and diabetes. *Nat. Med.* 3, 1096-1101 (1997)

Stenmark, H., Parton, R.G., Steele-Mortimer, O., Lutcke, A., Gruenberg, J., Zerial, M.

Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis. *EMBO J.* 13, 1287-1296 (1994)

Stenmark, H., Vitale, G., Ullrich, O., Zerial, M.

Rabaptin-5 is a direct effector of the small GTPase Rab5 in endocytic membrane fusion. *Cell* 83, 423-432 (1995)

Stenmark, H. & Olkkonen, V.M.

The Rab GTPase family. *Genome Biol.* 2, 3007.1-3007.7 (2001)

Stinchcombe, J.C., Barral, D.C., Mules, E.H., Booth, S., Hume, A.N., Machesky, L.M., Seabra, M.C., Griffiths, G.M.

Rab27a is required for regulated secretion in cytotoxic T lymphocytes. *J. Cell Biol.* 152, 825-834 (2001)

Stokoe, D., Stephens, L.R., Copeland, T., Gaffney, P.R., Reese, C.B., Painter, G.F., Holmes, A.B., McCormick, F., Hawkins, P.T.

Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. *Science* 277, 567-570 (1997)

Storz, P. & Toker, A.

3'-Phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK-1) in PI 3-kinase signaling. *Front. Biosci.* 7, d866-d902 (2002)

Stroupe, C. & Brunger, A.T.

Crystal structures of a Rab protein in its inactive and active conformations. *J. Mol. Biol.* 304, 585-598 (2000)

Subtil, A., Lampson, M.A., Keller, S.R., McGraw, T.E.

Characterization of the insulin-regulated endocytic recycling mechanism in 3T3-L1 adipocytes using a novel reporter molecule. *J. Biol. Chem.* 275, 4787-4795 (2000)

Sun, D., Nguyen, N., DeGrado, T.R., Schwaiger, M., Brosius III., F.C.

Ischemia induces translocation of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 to the plasma membrane of cardiac myocytes. *Circulation* 89, 793-798 (1994)

Sung, Y.J., Carter, M., Zhong, J.M., Hwang, Y.W.

Mutagenesis of the H-ras p21 at glycine-60 residue disrupts GTP-induced conformational change. *Biochemistry* 34, 3470-3477 (1995)

Sutton, R.B., Fasshauer, D., Jahn, R., Brunger, A.T.

Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* 395, 347-353 (1998)

Suzuki, K. & Kono, T.

Evidence that insulin causes translocation of glucose transport activity to the plasma membrane from an intracellular storage site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 2542-2545 (1980)

Takai, Y., Sasaki, T., Matozaki, T.

Small GTP-binding proteins. *Physiol. Rev.* 81, 153-208 (2001)

Tamemoto, H., Kadowaki, T., Tobe, K., Yagi, T., Sakura, H., Hayakawa, T., Terauchi, Y., Ueki, K., Kaburagi, Y., Satoh, S., Sekihara, H., Yoshioka, S., Horikoshi, H., Furuta, Y., Ikawa, Y., Kasuga, M., Yazaki, Y., Aizawa, S.

Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature* 372, 182-186 (1994)

Tanaka, S., Morishita, T., Hashimoto, Y., Hattori, S., Nakamura, S., Shibuya, M., Matuoka, K., Takenawa, T., Kurata, T., Nagashima, K., Matsuda, M.

C3G, a guanine nucleotide-releasing protein expressed ubiquitously, binds to the Src homology 3 domains of CRK and GRB2/ASH proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 3443-3447 (1994)

Terauchi, Y., Tsuji, Y., Satoh, S., Minoura, H., Murakami, K., Okuno, A., Inukai, K., Asano, T., Kaburagi, Y., Ueki, K., Nakajima, H., Hanafusa, T., Matsuzawa, Y., Sekihara, H., Yin, Y., Barrett, J.C., Oda, H., Ishikawa, T., Akanuma, Y., Komuro, I., Suzuki, M., Yamamura, K., Kodama, T., Suzuki, H., Yamamura, K., Kodama, T., Suzuki, H., Koyasu, S., Aizawa, S., Tobe, K., Fukui, Y., Yazaki, Y., Kadowaki, T.

Increased insulin sensitivity and hypoglycaemia in mice lacking the p85 alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Nat. Genet.* 21, 230-235 (1999)

Teter, K., Chandy, B., Quinones, B., Pereyra, K., Machen, T., Moore, H.P.

Cellubrevin-targeted fluorescence uncovers heterogeneity in the recycling endosomes. *J. Biol. Chem.* 273, 19625-19633 (1998)

Thirone, A.C., Carvalheira, J.B., Hirata, A.E., Velloso, L.A., Saad, M.J.

Regulation of Cbl-associated protein/Cbl pathway in muscle and adipose tissue of two animal models of insulin resistance. *Endocrinology* 145, 281-293 (2004)

Thurmond, D.C., Ceresa, B.P., Okada, S., Elmendorf, J.S., Coker, K., Pessin, J.E.

Regulation of insulin-stimulated GLUT4 translocation by Munc18c in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 273, 33876-33883 (1998)

Toker, A. & Newton, A.C.

Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site. *J. Biol. Chem.* 275, 8271-8274 (2000)

Tong, P., Khayat, Z.A., Huang, C., Patel, N., Ueyama, A., Klip, A.

Insulin-induced cortical actin remodeling promotes GLUT4 insertion at muscle cell membranes ruffles. *J. Clin. Invest.* 108, 371-381 (2001)

Toonen, R.F. & Verhage, M.

Vesicle trafficking: pleasure and pain from SM genes. *Trends Cell Biol.* 13, 177-186 (2003)

Touchot, N., Chardin, P., Tavitan, A.

Four additional members of the ras gene superfamily isolated by an oligonucleotide strategy: molecular cloning of YPT-related cDNAs from a rat brain library. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 8210-8214 (1987)

Trischler, M., Stoorvogel, W., Ullrich, O.

Biochemical analysis of distinct Rab5- and Rab11-positive endosomes along the transferrin pathway. *J. Cell. Sci.* 112, 4773-4783 (1999)

Tsakiridis, T., Vranic, M., Klip, A.

Disassembly of the actin network inhibits insulin-dependent stimulation of glucose transport and prevents recruitment of glucose transporters to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 269, 29934-29942 (1994)

Turner, R.C.

The U.K. Prospective Diabetes Study. A review. *Diabetes Care* 21, C35-C38 (1998)

Ueyama, A., Yaworsky, K.L., Wang, Q., Ebina, Y., Klip, A.

GLUT-4myc ectopic expression in L6 myoblasts generates a GLUT-4-specific pool conferring insulin sensitivity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 277, E572-E578 (1999)

Uldry, M., Ibberson, M., Horisberger, J.D., Chatton, J.Y., Riederer, B.M., Thorens, B.

Identification of a mammalian H(+)-myo-inositol symporter expressed predominantly in the brain. *EMBO J.* 20, 4467-4477 (2001)

Ullrich, A. & Schlessinger, J.

Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61, 203-212 (1990)

Ullrich, O., Stenmark, H., Alexandrov, K., Huber, L.A., Kaibuchi, K., Sasaki, T., Takai, Y., Zerial, M.

Rab GDP dissociation inhibitor as a general regulator for the membrane association of rab proteins. *J. Biol. Chem.* 268, 18143-18150 (1993)

Ullrich, O., Horiuchi, H., Bucci, C., Zerial, M.

Membrane association of Rab5 mediated by GDP-dissociation inhibitor and accompanied by GDP/GTP exchange. *Nature* 368, 157-160 (1994)

Ullrich, O., Reinsch, S., Urbe, S., Zerial, M., Parton, R.G.

Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. *J. Cell Biol.* 135, 913-924 (1996)

Urbe, S., Huber, L.A., Zerial, M., Tooze, S.A., Parton, R.G.

Rab11, a small GTPase associated with both constitutive and regulated secretory pathways in PC12 cells. *FEBS Lett.* 334, 175-182 (1993)

Vannucci, S.J., Maher, F., Simpson, I.A.

Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia. *Glia* 21, 2-11 (1997)

Vetter, I.R. & Wittinghofer, A.

The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* 294, 1299-1304 (2001)

Virkamaki, A., Ueki, K., Kahn, C.R.

Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 103, 931-943 (1999)

Vitale, G., Rybin, V., Christoforidis, S., Thornqvist, P., McCaffrey M., Stenmark, H., Zerial, M.

Distinct Rab-binding domains mediate the interaction of Rabaptin-5 with GTP-bound Rab4 and Rab5. *EMBO J.* 17, 1941-1951 (1998)

Vollenweider, P., Martin, S.S., Haruta, T., Morris, A.J., Nelson, J.G., Cormont, M., Le Marchand-Brustel, Y., Rose, D.W., Olefsky, J.M.

The small guanosine triphosphate-binding protein Rab4 is involved in insulin-induced GLUT4 translocation and actin filament rearrangement in 3T3-L1 cells. *Endocrinology* 138, 4941-4949 (1997)

Volpicelli, L.A., Lah, J.J., Fang, G., Goldenring, J.R., Levey, A.I.

Rab11a and myosin Vb regulate recycling of the M4 muscarinic acetylcholine receptor. *J. Neurosci.* 22, 9776-9784 (2002)

von Herrath, M.G.

Pathogenesis of type 1 diabetes: a viewpoint. *Adv. Exp. Med. Biol.* 552, 317-321 (2004)

Wada, M., Nakanishi, H., Satoh, A., Hirano, H., Obaishi, H., Matsuura, Y., Takai, Y.

Isolation and characterization of a GDP/GTP exchange protein specific for the Rab3 subfamily small G proteins. *J. Biol. Chem.* 272, 3875-3878 (1997)

Walker, K.S., Deak, M., Paterson, A., Hudson, K., Cohen, P., Alessi, D.R.

Activation of protein kinase B beta and gamma isoforms by insulin in vivo and by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 in vitro: comparison with protein kinase B alpha. *Biochem. J.* 331, 299-308 (1998)

Wallace, D.M., Lindsay, A.J., Hendrick, A.G., McCaffrey, M.W.

The novel Rab11-FIP/Rip/RCP family of proteins displays extensive homo- and hetero-interacting abilities. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 292, 909-915 (2002)

Wallberg-Henriksson, H. & Zierath, J.R.

GLUT4: a key player regulating glucose homeostasis? Insights from transgenic and knockout mice (review). *Mol. Membr. Biol.* 18, 205-211 (2001)

Wang, Q., Bilan, P.J., Tsakiridis, T., Hinek, A., Klip, A.

Actin filaments participate in the relocalization of phosphatidylinositol3-kinase to glucose transporter-containing compartments and in the stimulation of glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. J.* 331, 917-928 (1998 a)

Wang, Q., Khayat, Z., Kishi, K., Ebina, Y., Klip, A.

GLUT4 translocation by insulin in intact muscle cells: detection by a fast and quantitative assay. *FEBS Lett.* 427, 193-197 (1998 b)

Wang, Q., Somwar, R., Bilan, P.J., Liu, Z., Jin, J., Woodgett, J.R., Klip, A.

Protein kinase B/Akt participates in GLUT4 translocation by insulin in L6 myoblasts. *Mol. Cell. Biol.* 19, 4008-4018 (1999)

Wang, X., Kumar, R., Navarre, J., Casanova, J.E., Goldenring, J.R.

Regulation of vesicle trafficking in madin-darby canine kidney cells by Rab11a and Rab25. *J. Biol. Chem.* 275, 29138-29146 (2000)

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

Mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell. Enhancement of the number of functional transport systems. *J. Biol. Chem.* 253, 8002-8005 (1978)

Watson, R.T., Shigematsu, S., Chiang, S.H., Mora, S., Kanzaki, M., Macara, I.G., Saltiel, A.R., Pessin, J.E.

Lipid raft microdomain compartmentalization of TC10 is required for insulin signaling and GLUT4 translocation. *J. Cell Biol.* 154, 829-840 (2001)

Watson, R.T., Kanzaki, M., Pessin, J.E.

Regulated membrane trafficking of the insulin-responsive glucose transporter 4 in adipocytes. *Endocr. Rev.* 25, 177-204 (2004 a)

Watson, R.T., Khan, A.H., Furukawa, M., Hou, J.C., Li, L., Kanzaki, M., Okada, S., Kandror, K.V., Pessin, J.E.

Entry of newly synthesized GLUT4 into the insulin-responsive storage compartment is GGA dependent. *EMBO J.* 23, 2059-2070 (2004 b)

Wei, Y., Zhang, Y., Derewenda, U., Liu, X., Minor, W., Nakamoto, R.K., Somlyo, A.V., Somlyo, A.P., Derewenda, Z.S.

Crystal structure of RhoA-GDP and its functional implications. *Nat. Struct. Biol.* 4, 699-703 (1997)

Welsh, G.I., Hers, I., Berwick, D.C., Dell, G., Wherlock, M., Birkin, R., Leney, S., Tavare, J.M.

Role of protein kinase B in insulin-regulated glucose uptake. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 346-349 (2005)

White, J., Johannes, L., Mallard, F., Girod, A., Grill, S., Reinsch, S., Keller, P., Tzschaschel, B., Echard, A., Goud, B., Stelzer, E.H.

Rab6 coordinates a novel Golgi to ER retrograde transport pathway in live cells. *J. Cell Biol.* 147, 743-760 (1999)

White, M.F.

The insulin signalling system and the IRS proteins. *Diabetologia* 40, S2-S17 (1997)

White, M.F.

The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol. Cell. Biochem.* 182, 3-11 (1998)

White, M.F.

IRS proteins and the common path to diabetes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 283, E413-E422 (2002)

Whiteheart, S.W., Schraw, T., Matveeva, E.A.

N-ethylmaleimide sensitive factor (NSF) structure and function. *Int. Rev. Cytol.* 207, 71-112 (2001)

Widberg, C.H., Bryant, N.J., Girotti, M., Rea, S., James, D.E.

Tomosyn interacts with the t-SNAREs syntaxin4 and SNAP23 and plays a role in insulin-stimulated GLUT4 translocation. *J. Biol. Chem.* 278, 35093-35101 (2003)

Wilcke, M., Johannes, L., Galli, T., Mayau, V., Goud, B., Salamero, J.

Rab11 regulates compartmentalization of early endosomes required for efficient transport from early endosomes to the trans-golgi network. *J. Cell Biol.* 151, 1207-1220 (2000)

Wiley, C. & Beeson, C.

Continuous measurement of glucose utilization in heart myoblasts. *Anal. Biochem.* 304, 139-146 (2002)

Wilson, C.M., Mitsumoto, Y., Maher, F., Klip, A.

Regulation of cell surface GLUT1, GLUT3, and GLUT4 by insulin and IGF-I in L6-myotubes. *FEBS Lett.* 368, 19-22 (1995)

Wilson, G.M., Fielding, A.B., Simon, G.C., Yu, X., Andrews, P.D., Hames, R.S., Frey, A.M., Peden, A.A., Gould, G.W., Prekeris, R.

The FIP3-Rab11 protein complex regulates recycling endosome targeting to the cleavage furrow during late cytokinesis. *Mol. Biol. Cell* 16, 849-860 (2005)

Withers, D.J., Gutierrez, J.S., Towery, H., Burks, D.J., Ren, J.M., Previs, S., Zhang, Y., Bernal, D., Pons, S., Shulman, G.I., Bonner-Weir, S., White, M.F.

Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 391, 900-904 (1998)

Wittinghofer, A. & Pai, E.F.

The structure of Ras protein: a model for a universal molecular switch. *Trends Biochem. Sci.* 16, 382-387 (1991)

Woodman, P.G.

Biogenesis of the sorting endosome: the role of Rab5. *Traffic* 1, 695-701 (2000)

Wu, X. & Freeze, H.H.

GLUT14, a duplicon of GLUT3, is specifically expressed in testis as alternative splice forms. *Genomics* 80, 553-557 (2002)

Yang, C., Slepnev, V.I., Goud, B.

Rab proteins form in vivo complexes with two isoforms of the GDP-dissociation inhibitor protein (GDI). *J. Biol. Chem.* 269, 31891-31899 (1994)

Yang, C., Coker, K.J., Kim, J.K., Mora, S., Thurmond, D.C., Davis, A.C., Yang, B., Williamson, R.A., Shulman, G.I., Pessin, J.E.

Syntaxin 4 heterozygous knockout mice develop muscle insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 107, 1311-1318 (2001)

Yang, L., Tang, D., Burkhardt, B., Cao, L., Litherland, S., Atkinson, M.

Derivation of functional insulin producing cells from human bone marrow-derived stem cells (Abstract). 45. Jahrestagung der Amerikanischen Hämatologie-Gesellschaft, San Diego, CA, USA (2003)

Yeh, J.I., Verhey, K.J., Birnbaum, M.J.

Kinetic analysis of glucose transporter trafficking in fibroblasts and adipocytes. *Biochemistry* 34, 15523-15531 (1995)

Yu, B., Poirier, L.A., Nagy, L.E.

Mobilization of GLUT-4 from intracellular vesicles by insulin and K(+) depolarization in cultured H9c2 myotubes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 277, E259-E267 (1999)

Zeigerer, A., Lampson, M.A., Karylowski, O., Sabatini, D.D., Adesnik, M., Ren, M., McGraw, T.E.

GLUT4 retention in adipocytes requires two intracellular insulin-regulated transport steps. *Mol. Biol. Cell* 13, 2421-2435 (2002)

Zeigerer, A., McBrayer, M.K., McGraw, T.E.

Insulin stimulation of GLUT4 exocytosis, but not its inhibition of endocytosis, is dependent on RabGAP AS160. *Mol. Biol. Cell* 15, 4406-4415 (2004)

Zeng, J., Ren, M., Gravotta, D., De Lemos-Chiarandini, C., Lui, M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Xu, G., Shen, T.H., Morimoto, T., Adesnik, M., Sabatini, D.D.

Identification of a putative effector protein for rab11 that participates in transferrin recycling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 2840-2845 (1999)

Zerial, M. & McBride, H.

Rab proteins as membrane organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 107-117 (2001)

Zhang, F.L. & Casey, P.J.

Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annu. Rev. Biochem.* 65, 241-269 (1996)

Zhang, J. & Matthews, C.R.

Ligand binding is the principal determinant of stability for the p21(H)-ras protein. *Biochemistry* 37, 14881-14890 (1998 a)

Zhang, J. & Matthews, C.R.

The role of ligand binding in the kinetic folding mechanism of human p21(H-ras) protein. *Biochemistry* 37, 14891-14899 (1998 b)

Zhu, A.X., Zhao, Y., Flier, J.S.

Molecular cloning of two small GTP-binding proteins from human skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205, 1875-1882 (1994)

Zierath, J.R., Krook, A., Wallberg-Henriksson, H.

Insulin action and insulin resistance in human skeletal muscle. *Diabetologia* 43, 821-835 (2000)

Zisman, A., Peroni, O.D., Abel, E.D., Michael, M.D., Mauvais-Jarvis, F., Lowell, B.B., Wojtaszewski, J.F., Hirshman, M.F., Virkamaki, A., Goodyear, L.J., Kahn, C.R., Kahn, B.B.

Targeted disruption of the glucose transporter 4 selectively in muscle causes insulin resistance and glucose intolerance. *Nat. Med.* 6, 924-928 (2000)

Zorzano, A., Munoz, P., Camps, M., Mora, C., Testar, X., Palacin, M.

Insulin-induced redistribution of GLUT4 glucose carriers in the muscle fiber. In search of GLUT4 trafficking pathways. *Diabetes* 45, S70-S81 (1996)

Zorzano, A., Sevilla, L., Camps, M., Becker, C., Meyer, J., Kammermeier, H., Munoz, P., Guma, A., Testar, X., Palacin, M., Blasi, J., Fischer, Y.

Regulation of glucose transport, and glucose transporter expression and trafficking in the heart: studies in cardiac myocytes. *Am. J. Cardiol.* 80, 65A-76A (1997 a)

Zorzano, A., Sevilla, L., Tomas, E., Guma, A., Palacin, M., Fischer, Y.

GLUT4 trafficking in cardiac and skeletal muscle: isolation and characterization of distinct intracellular GLUT4-containing vesicle populations. *Biochem. Soc. Trans.* 25, 968-974 (1997 b)

Zorzano, A., Palacin, M., Guma, A.

Mechanisms regulating GLUT4 glucose transporter expression and glucose transport in skeletal muscle. *Acta Physiol. Scand.* 183, 43-58 (2005)

7 ANHANG

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Insulinsignaltransduktion und Translokation des Glucosetransporters GLUT4.	14
Abb. 2	Struktur und funktionelle Domänen von Rab11A.	32
Abb. 3	Allgemeines Reaktionsschema des GDP-GTP-Zyklus von Rab-Proteinen.	36
Abb. 4	Integrität der Gesamt-RNA aus H9c2- bzw. H9c2-E2-Zellen sowie aus Ratten-Herzmuskelzellen.	100
Abb. 5	RT-PCR-Amplifikation der Rab11A-cDNA.	101
Abb. 6	Restriktionsanalyse von pCMV-Rab11A.	102
Abb. 7	Sequenzabschnitt der Rab11A-cDNA aus der Ratten-Kardiomyoblasten-Zelllinie H9c2.	103
Abb. 8	Restriktionsanalyse von pCMV-GLUT4myc.	105
Abb. 9	Restriktionsanalyse von pGEX-5X-3-Rab11A R70.	106
Abb. 10	Restriktionsanalyse von pGEX-5X-3-Rab11A L70, -Rab11A Q70 und -Rab11A R70.	108
Abb. 11	Reinigung von GST-Rab11A-Fusionsproteinen.	109
Abb. 12	Enzymatische Aktivität von GST-Rab11A-Fusionsproteinen.	110
Abb. 13	Optimierung der transienten Transfektion von H9c2-E2-Zellen.	112
Abb. 14	Überexpression von Rab11A und Rab11A N124I in H9c2-E2-Zellen.	113
Abb. 15	Überexpression von GLUT4myc in H9c2-E2-Zellen.	114
Abb. 16	Akt-Phosphorylierung in transfizierten H9c2-E2-Zellen.	116
Abb. 17	RT-PCR von Rab11A-cDNA und Restriktionsanalyse von pAV-CIG-Rab11A.	117
Abb. 18	Restriktionsanalyse von pAVG-Rab11A.	119
Abb. 19	Optimierung der adenoviralen Infektion von humanen Skelettmuskelzellen.	121
Abb. 20	Überexpression von Rab11A und GLUT4myc in humanen Skelettmuskelzellen.	122
Abb. 21	Insulin-stimulierte Glucoseaufnahme von H9c2-E2-Zellen.	124
Abb. 22	Insulin-stimulierte Glucoseaufnahme von humanen Skelettmuskelzellen.	126

Abb. 23	Insulin-stimulierte Translokation von GLUT4myc in H9c2-E2-Zellen.	128
Abb. 24	Insulin-stimulierte Translokation von GLUT4myc in humanen Skelettmuskelzellen.	131
Abb. 25	Fraktionierung der Gesamtmembran von GLUT4myc-transfizierten H9c2-E2-Zellen.	134
Abb. 26	Fraktionierung der Gesamtmembran von H9c2-E2-Zellen nach der Überexpression von Rab11A und GLUT4myc.	135
Abb. 27	Interaktion von Rab11A bei der intrazellulären Translokation des Glucosetransporters GLUT4 in Muskelzellen (Modell).	150

7.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Übersicht der Glucosetransporter (GLUT)-Familie.	7
Tab. 2	Übersicht der Proteinfamilien der Superfamilie der Kleinen GTP-bindenden Proteine.	29
Tab. 3	Aminosäure-Sequenz des katalytisch-aktiven PM3-Motivs von humanen Proteinen der Superfamilie der Kleinen GTP-bindenden Proteine.	34
Tab. 4	Klassifizierung der Rab11-FIP-Proteine.	44
Tab. 5	Übersicht der verwendeten Amplifikations- und Expressionsvektoren.	52
Tab. 6	Übersicht der verwendeten kompetenten <i>E. coli</i> - Zellen.	52
Tab. 7	Übersicht der verwendeten Primärzellen und Zelllinien.	53
Tab. 8	Zusammensetzung der Kulturmedien für humane Skelettmuskelzellen.	60
Tab. 9	Zusammensetzung des DMEM-Komplettmediums.	61
Tab. 10	Sequenz der Rab11A-spezifischen RT-PCR-Primer.	65
Tab. 11	Reaktionsschema für die PCR-Amplifikation der Rab11A-cDNA.	65
Tab. 12	Sequenz der GLUT4myc-spezifischen PCR-Primer.	66
Tab. 13	Reaktionsschema für die PCR-Amplifikation der GLUT4myc-cDNA.	66
Tab. 14	Sequenz der Rab11A- und GLUT4myc-spezifischen Mutagenese-PCR-Primer.	67
Tab. 15	Allgemeines Reaktionsschema der Mutagenese-PCR.	68
Tab. 16	Allgemeine Zusammensetzung der Transfektionsgemische für H9c2-E2-Zellen.	78
Tab. 17	Anzahl und biologische Aktivität der hergestellten Viruspartikel.	120

7.3 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung(en)
abs.	absolut
ADA	Amerikanische Diabetes-Gesellschaft
α -MEM	alpha-modifiziertes Minimum-Essential-Medium
Anm.	Anmerkung
Aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
AS	Aminosäure(n)
ATCC	American Type Culture Collection
bes.	besonders
BMI	Body-Mass-Index
BSA	Bovines Serumalbumin
Bsp.	Beispiel(e)
bzw.	beziehungsweise
ca.	cirka
cDNA	komplementäre DNA
CO ₂	Kohlendioxid
DDG	Deutsche Diabetes-Gesellschaft
DDS	Deutsche Diabetes-Stiftung
DDZ	Deutsches Diabetes-Zentrum
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosid-5'-triphosphat
2-DOG	2-Desoxy-D-[1- ¹⁴ C]-glucose
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
engl.	englisch
et al.	und andere (lat.)
etc.	und so weiter (lat.)
Fa.	Firma
FKS	Fötale Kälberserum
for	vorwärts (engl.)
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
griech.	griechisch
GST	Glutathion-S-transferase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GTS-Puffer	Glycerol-Tris-gepufferte Salzlösung
HA-Puffer	Hypotonischer Aufschluss-Puffer
HBS	HEPES-gepufferte Salzlösung
HCl	Salzsäure
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)

IA-Puffer	Isotonischer Aufschluss-Puffer
IDF	Internationale Diabetes-Föderation
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranosid
Kap.	Kapitel
KLH	Keyhole Limpet-Hämocyanin
konz.	konzentriert
lat.	lateinisch
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
max.	maximal
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
NaOH	Natriumhydroxid
n.b.	nicht bekannt
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBS-T	Phosphat-gepufferte Salzlösung + Tween 20 [®]
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rev	rückwärts (engl.)
RIPA	Radioimmunpräzipitationsassay
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription - Polymerase-Kettenreaktion
S.	Seite
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Tab.	Tabelle(n)
TAE	Tris / Acetat - Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
TBS	Tris-gepufferte Natriumchlorid-Lösung
TBS-T	Tris-gepufferte Natriumchlorid-Lösung + Tween 20 [®]
Tris / HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolett
WHO	Weltgesundheitsorganisation
VD	Verdünnung
vs.	versus
YTA-Medium	Hefe-Trypton-Ampicillin-Medium

Die Abkürzung der Aminosäuren erfolgte gemäß der Ein- bzw. Drei-Buchstaben-Regel der Internationalen Union für Reine und Angewandte Chemie (IUPAC).

7.4 Größen und Einheiten

A	Ampere
BLU	Biochemische Licht-Einheit (engl.)
bp	Basenpaar
bps	Basenpaare (engl.)
°C	Grad Celsius
Ci	Curie
cpm	Radioaktiver Zerfall pro Minute (engl.)
Da	Dalton
g	Gramm
(x) g	Gravitationskonstante (9,81 m/s ²)
h	Stunde
IC ₅₀	Halbmaximale Konzentration (engl.)
kb	Kilobasenpaar(e)
l	Liter
m	Meter
M	Molar
min	Minute
mol	Mol
m/v	Masse pro Volumen (Konzentration)
N	Normal
OD	Optische Dichte
PFU	Plaque-bildende Einheit (engl.)
s	Sekunde
S	Svedberg-Konstante (10 ⁻¹³ s)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (engl.)
U	Enzymeinheit (engl.)
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen (Konzentration)
W	Watt

7.5 Publikationsverzeichnis

Uhlig, M., Passlack, W., Eckel, J.

Functional role of Rab11 in GLUT4 trafficking in cardiomyocytes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 235, 1-9 (2005)

Uhlig, M., Passlack, W., Eckel, J.

Identification and characterisation of a novel variant in the highly conserved catalytic center of Rab11a. *Eur. J. Med. Genet.* 49, 29-36 (2006)

Dietze-Schroeder, D., Sell, H., **Uhlig, M.**, Koenen, M., Eckel, J.

Autocrine action of adiponectin on human fat cells prevents the release of insulin resistance-inducing factors. *Diabetes* 54, 2003-2011 (2005)

Ezenwaka, C., Kalloo, R., **Uhlig, M.**, Eckel, J.

Relationship between adiponectin and metabolic variables in Carribean offspring of patients with type 2 diabetes mellitus. *Horm. Metab. Res.* 36, 238-242 (2004)

Ezenwaka, C., Kalloo, R., **Uhlig, M.**, Schwenk, R., Eckel, J.

The E23K variant in the Kir6.2 subunit of the ATP-sensitive K⁺ channel does not augment impaired glucose tolerance in Carribean subjects with a family history of type 2 diabetes. *J. Endocrinol.* 185, 439-444 (2005)

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenhändig 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, 20.03.2006

DANKSAGUNG

Mein herzlicher Dank gilt allen Mitgliedern der AG Eckel, insbesondere **Birgit** Hurow, Dr. **Daniela** Dietze-Schroeder, **Daniela** Ledwig, **Henrike** Sell, Dr. **Irini** Rakatzi, **Karin** Deckers-Thomas, **Kristin** Aduroja, **Magdalene** Stosik, **Marlis** Koenen, Dr. **Miriam** Klähn, Dr. **Sonja** Vahsen, **Daniel** Knierim, Dr. **Mark** Sommerfeld und **Robert** Schwenk, sowie **Daniella** Herzfeld de Wiza und Dr. **Sabine** Hucken für die freundschaftliche Zusammenarbeit und die angenehme Atmosphäre innerhalb und außerhalb des Laborbereiches.

Besonders großer Dank gebührt **Waltraud** Paßlack. Ihr technisches Können, ihre reiche Laborerfahrung und ihre tatkräftige Unterstützung, ihre herzliche Art und ihr Spaß haben mir sehr geholfen und werden mir immer in Erinnerung bleiben. Ebenso ihre holländischen Butterkekse !

Dr. **Christiane** Bellin, ehemalige Mitarbeiterin am Deutschen Diabetes-Zentrum, danke ich sehr für ihre herzliche Kollegialität und Freundschaft sowie für ihre gelebte Art des Rheinischen Frohsinns: „Et hätt noch immer jot jejangé !“

Bei den langjährigen Mitarbeitern des Deutschen Diabetes-Zentrums **Dr. Ralf-Rüdiger Flörke**, **Dr. Lothar Kühn** und **Prof. Dr. Peter Rösen** möchte ich mich für die Vielzahl informativer und unterhaltsamer Gespräche diesseits und jenseits von Wissenschaft und Forschung bedanken.

Ein herzlicher Dank geht an meine Freunde, mit denen ich seit mehr als einem Jahrzehnt privat und wissenschaftlich eng verbunden bin. Danke an Dr. **Susanne** Stein (Frankfurt / M.), Dr. **Uta** Schmidt-Straßburger (Neu-Ulm), DI **Berndt** Schreiber (Kleve), Dr. **Birger** Herzog (London), Dr. **Dirk** Pohlers (Jena), Dr. **Günter** Päth (Würzburg), Dr. **Holger** Willenberg (Düsseldorf) und Dr. **Thomas** Zimmermann (Dresden).

Mein ganz besonderer Dank gilt **meinen Eltern**: Für ihre liebevolle Begleitung in allen Zeiten und ihre wahrhaft außergewöhnliche Unterstützung, die mir den Abschluss dieser Dissertation ermöglicht hat ! Für die privaten „Drittmittel“ ! Für die vielen Briefe und Postkarten, die mich mit ihnen und meiner kursächsischen Heimat Dresden auch in der Ferne immer verbunden haben ! Danke Mama - Danke Papa !

Abschließend möchte ich mich sehr bei meiner Freundin Dr. **Verena** Schmitz (und ihrer Familie) bedanken: Für ihre „weit“-reichende Unterstützung aus Konstanz und ihre große Geduld ! Für ihren hoffnungsvollen Mut und ihr besonderes Verständnis ! Für ihre Liebe !

„Vale, scientia !“