

Aus dem Deutschen Diabetes Zentrum, Institut für klinische Biochemie und Pathobiochemie
Komm. Direktor: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Eckel

**Tyrosin- und Serinphosphorylierung zweier Varianten des Insulinrezeptorsubstrates-1:
„Wildtyp“ und „Mutante Gly⁹⁷²->Arg“**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

**Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf**

Vorgelegt von

Barbara Herzner

2006

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

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg
Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Eckel

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Ulrich Germing

Inhaltsverzeichnis

<u>1. Einleitung</u>	Seite
1.1. Einführung	4
1.2. Zielsetzung	11
<u>2. Material und Methoden</u>	
2.1. Material	12
2.1.1. Proteingewinnung	12
2.1.2. Phosphorylierungsexperimente	12
2.1.3. Gelelektrophorese und Detektion	13
2.2. Methoden	14
2.2.1. Proteingewinnung	14
2.2.1.1. Aufreinigen der GST-IRS-Fusionsproteine	14
2.2.1.2. Insulinrezeptoraufreinigung	16
2.2.2. Phosphorylierungsexperimente	17
2.2.2.1. Tyrosinphosphorylierung	17
2.2.2.2. Serin-/ Threoninphosphorylierung durch die Proteinkinase C (PKC)	17
2.2.2.3. Untersuchung des Effektes der Serin-/ Threoninphosphorylierung auf die Tyrosinphosphorylierung der Fusionsproteine	18
2.2.3. Gelelektrophoretische Auftrennung und Blotting der Proteine	19
<u>3. Ergebnisse</u>	
3.1. Proteingewinnung	22
3.1.1. Proteinaufreinigung aus E. coli	22
3.1.2. Insulinrezeptoraufreinigung	23
3.2. Phosphorylierungsexperimente	24
3.2.1. Tyrosinphosphorylierung	24
3.2.2. Serin-/ Threoninphosphorylierung durch die PKC	25
3.2.3. Effekt der Serin-/ Threoninphosphorylierung der Fusionsproteine auf die Tyrosinphosphorylierung	27

<u>4. Diskussion</u>		
4.1.	Proteingewinnung	31
4.1.1.	Proteinaufreinigung aus E. coli	31
4.1.2.	Insulinrezeptoraufreinigung	33
4.2.	Phosphorylierungsexperimente	34
4.2.1.	Tyrosinphosphorylierung	34
4.2.2.	Serin-/ Threoninphosphorylierung durch die PKC	36
4.2.3.	Effekt der Serin-/ Threoninphosphorylierung auf die Tyrosinphosphorylierung der Fusionsproteine	37
<u>5. Zusammenfassung</u>		41
<u>6. Abkürzungsverzeichnis</u>		42
<u>7. Literaturverzeichnis</u>		43
<u>8. Danksagung</u>		52
<u>9. Lebenslauf</u>		53

1. Einleitung

1.1 Einführung

Diabetes Mellitus bedeutet als nicht heilbare, chronische Krankheit eine einschneidende Diagnose für das Leben des betroffenen Patienten. Die Gesamtprävalenz des manifesten Diabetes mellitus in Deutschland liegt bei etwa 7 %, bei den über 70jährigen bei 25 % (Hauner et al 2003). Weltweit wird für das Jahr 2025 die Erkrankung an Typ 2- Diabetes von annähernd 300 Millionen Menschen erwartet (Seidell 2000). Angesichts dieser Entwicklung ist die Diabetesforschung eine der großen Aufgaben der Biowissenschaften und der Medizin.

Zu unterscheiden ist der Typ 1- Diabetes (Insulin- Dependent Diabetes, IDDM) vom Typ 2- Diabetes (Non- Insulin- Dependent Diabetes, NIDDM). Weitere, seltenere Formen entstehen durch genetische Defekte der β - Zell-Funktion, genetische Defekte der Insulinwirkung, Erkrankungen des exokrinen Pankreas, Endokrinopathien oder sie sind medikamenten- oder chemikalieninduziert (Scherbaum, Kap. Diabetes mellitus in Wolff & Weihrauch, „Internistische Therapie 2004/2005“).

Die Ursache des Typ 1- Diabetes ist ein Untergang der insulinproduzierenden β -Zellen der Langerhans- Inseln im Pankreas durch eine Insulitis mit zytotoxischen T-Zellen. In der Folge kommt es zu einer Produktion Autoantikörpern. Diese sind zum Teil bereits vor der klinischen Manifestation des Diabetes nachweisbar. Es sind Zytoplasmatische Inselzellantikörper (ICA), Glutamatdecarboxylase-Antikörper (GAD-A), Antikörper gegen die Tyrosinkinase (IA2-A) und Insulinautoantikörper (IAA) (Scherbaum, Kap. Diabetes mellitus, Wolff & Weihrauch, „Internistische Therapie 2004/2005“). Diese Form des Diabetes manifestiert sich in jedem Alter, häufig bereits in der Jugend. Sie wird durch die Kombination aus Diät und exogener Zufuhr von Insulin behandelt.

Demgegenüber ist der Typ 2- Diabetes eine Kombination aus gestörter Glukosetoleranz und verminderter Insulinsensitivität. Er basiert auf einer Störung vor allem der Leber, des Fett- und Muskelgewebes und der β - Zellen der Pankreas. Die Trias von gesteigerter Glukoseproduktion bei hepatischer Insulinresistenz, verminderter Glukoseaufnahme der Skelettmuskel- und Fettzellen und erniedrigter Insulinsekretion führen, sich gegenseitig verstärkend, zu einem pathologischen Blutglukosespiegel und zur Manifestation des Typ 2- Diabetes (De Fronzo, 1988).

Klinisch zeigt sich der Typ 2- Diabetes häufig erst nach bis zu 20 Jahren andauernder Insulinresistenz (Warram et al. 1990, Lillioja 1988) durch das Auftreten der irreversiblen Sekundärschäden wie Mikro- und Makroangiopathie und Neuropathie. Somit stellt die Aufklärung der Insulinresistenz eine zentrale Fragestellung der Diabetesforschung dar.

Nach dem derzeitigen Stand ergibt sich ein komplexes Zusammenspiel unterschiedlicher Faktoren, welche zur Erkrankung an Diabetes mellitus Typ 2 führen. Dazu gehören zum einen Umweltfaktoren und zum anderen genetische Prädisposition. Mehrere Studien zeigen, dass Adipositas zu einer höheren Inzidenz des Typ 2- Diabetes führt. Aus Daten der „Nurses Health Study“ (Colditz et al. 1990) geht eine Erhöhung des Erkrankungsrisikos um das 60fache hervor, wenn der Body-Mass-Index (BMI) über 34 liegt. Schon bei leichter Adipositas (BMI 27-28) ist das Risiko zehnfach größer. Zusätzlicher Faktor ist mangelnde Bewegung. Eine Studie bei Pima- Indianern (Kriska et al. 1993) belegt, dass körperliche Aktivität die Typ 2- Diabetes- Prävalenz um das 3-4fache gegenüber Personen ohne Bewegung senkt.

Das „Metabolische Syndrom“ („Syndrome X“; Saltiel 2000, Reaven et al. 1993) steht im Kontext mit der Insulinresistenz. Zusammengefasst sind hierunter der arterielle Hypertonus, die Stammfettsucht, Dyslipidämie, Atherosklerose und das Stein- Leeventhal- Syndrom. An der Aufklärung der pathophysiologischen Zusammenhänge wird geforscht.

Untersuchungen zum familiären Auftreten von Typ 2- Diabetes zeigen, dass neben dem Lebensstil auch erbliche Faktoren eine pathogenetische Relevanz haben. So liegt das Typ 2- Diabetes-Erkrankungsrisiko bei 80 %, wenn der homozygote Zwilling eines Probanden erkrankt ist (Harrison's „Principles of internal medicine“, 1998). Ein monogenetischer Erbgang konnte nicht gefunden werden. Teilweise belegt ist, dass polygenetische Variationen der Proteine der Insulinrezeptorkaskade und der verknüpften Stoffwechselwege ursächlich zur Entstehung von Typ 2- Diabetes beitragen.

Die Insulinrezeptorkaskade wird durch die Insulinbindung aktiviert. Durch den steigenden Blutglukosespiegel wird postprandial die Insulinsekretion der β -Zellen des Pankreas stimuliert. Die Hauptzielorgane des Insulin sind die Leber, deren Glukoseproduktion gedrosselt wird, und Skelettmuskel- und Fettzellen, deren Glukoseaufnahme stimuliert wird. Andererseits wirkt das Insulin auf den Fettstoffwechsel dieser Organe. Es erhöht die Fettsyntheserate in Leber und Fettgewebe und senkt die Freisetzung von Fettsäuren aus Skelettmuskel und Adipozyten (Pessin & Saltiel, 2000). Die Interaktion mit den Zielzellen findet über den Insulinrezeptor statt. Das

Protein setzt sich aus vier Untereinheiten zusammen, die jeweils paarweise angeordnet sind. Extrazellulär liegen die beiden α -Untereinheiten, an welchen das Insulin bindet. Übertragen wird das Signal per Konformationsänderung, wodurch die intrazellulär liegenden β -Untereinheiten aktiviert werden (van Obberghen et al. 1981). Sie haben eine Tyrosinkinasefunktion (Kasuga et al. 1983), ihre Substrate sind die Insulinrezeptorsubstrat-Proteine.

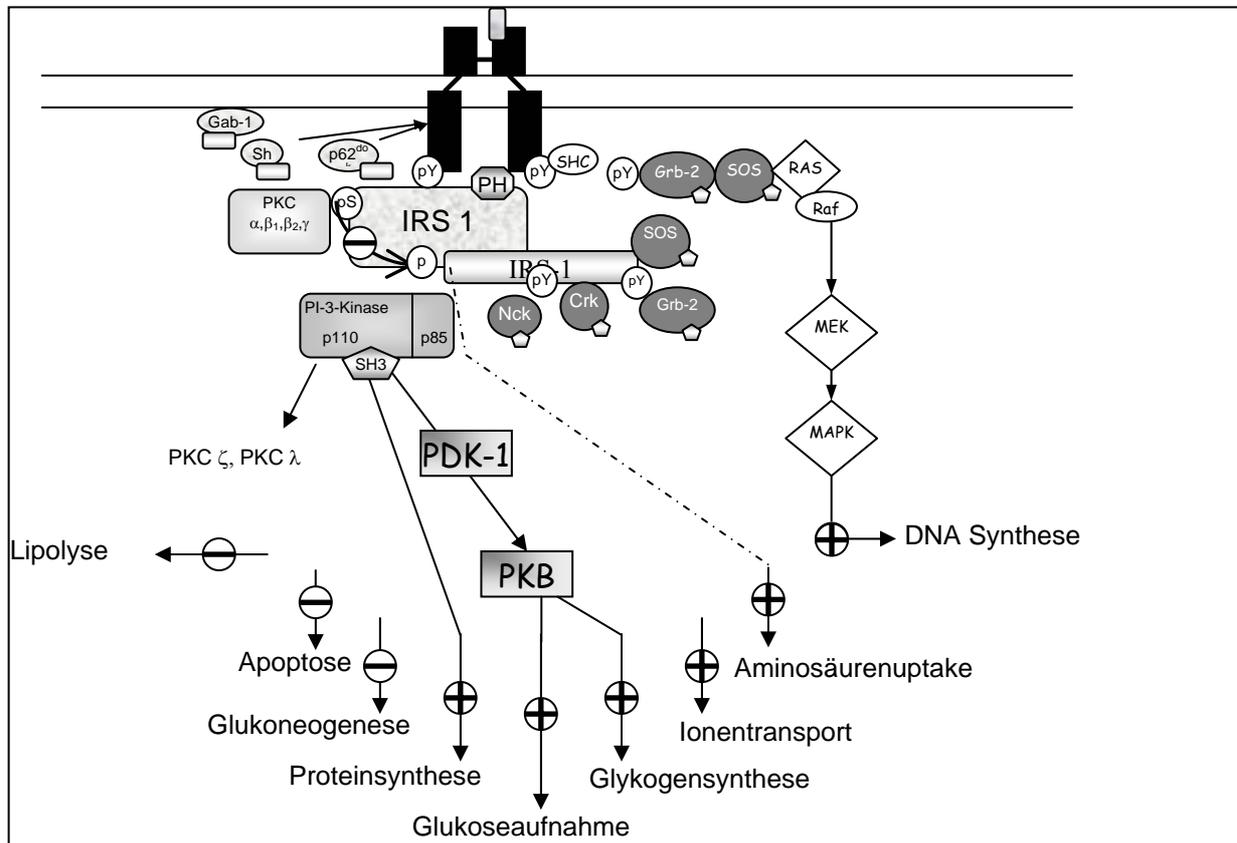


Abb 1: Die Insulinrezeptorkaskade und der MAP-Kinase-Weg

Durch die Bindung von Insulin an die α - Untereinheit des Insulinrezeptors wird die Insulinrezeptorkaskade aktiviert. Über das Shc-Protein erfolgt eine Aktivierung des MAP-Kinase-Wegs, dessen Wirkung vor allem die DNA- Synthese aktiviert.

Insulin
 pY Phosphotyrosin
 pS Phosphoserin
 α - Untereinheit des Insulinrezeptors
 β -Untereinheit des Insulinrezeptors
 SH3-Domäne
 + Steigerung
 - Inhibition
Grb-1/ 2: growth factor binding protein 1/ 2; **Shc:** ; **PKB:** protein kinase B; **PDK-1:** P3- dependent kinase 1; **MAPK:** mitogen- activated protein kinase; **PH:** pleckstrin homology; **SH2/ 3:** SRC homology 2/ 3 domain; **IRS:** insulin receptor substrate; **PI-3-Kinase:** phosphoinositide 3- kinase;

Die Insulinrezeptorsubstrate sind eine Gruppe von Proteinen, die alle durch den Insulinrezeptor phosphoryliert werden. Einige haben typische Elemente in ihrer Struktur: NH₂-terminal liegt die Pleckstrin- Homologie (PH) und/ oder eine phosphotyrosinbindende (PTB) Domäne. Zahlreiche Tyrosinphosphorylierungsstellen bilden die Bindungsstellen für SH2-

Proteine. Zur Interaktion mit SH3- oder WW- Domänen sind prolinreiche Abschnitte vorhanden. Hinzu kommen serin-/ threoninreiche Regionen der IRS-Proteine (White, 1998).

Über die PTB-Domäne erfolgt die Bindung an das spezifische juxtamembranäre NPXY-Motiv des Insulinrezeptors (Kaburagi et al. 1995). Eine weitere Interaktion mit dem Insulinrezeptor erfolgt vermutlich über die PH-Domäne der IRS und der Produkte des shc-Gens.

Bisher gefundene Substrate des Insulinrezeptors sind das Insulinrezeptorsubstrat-1 (IRS-1) (White, Maron & Kahn, 1985; Sun et al. 1991), das IRS-2 (Sun et al. 1995), IRS-3 (Lavan, Lane & Lienhard 1997; Smith-Hall et al. 1997), IRS-4 (Lavan et al. 1997), Grb2-associated binding protein (Gab 1) (Holgado- Madruga et al. 1996) und p62^{dok} (Yamanashi & Baltimore 1997). Die Insulinrezeptorsubstrate unterscheiden sich sowohl in ihrer Funktion als auch in ihrer Expression, die je nach Zellart differiert. Ubiquitär kommen IRS-1 und IRS-2 vor, während IRS-3 bislang nur in Adipozyten, Fibroblasten und Hepatozyten nachgewiesen wurde (Hosomi et al. 1994; Milarski et al. 1995; Zhang et al. 1996, Smith-Hall et al. 1997). IRS-4 wurde in Zellkultur von Embryonierzellen (Lavan et al. 1997) sowie in Herz- und Soleusmuskelzellen von Ratten und in menschlichen Skelettmuskelzellen (Schreyer et al. 2003) nachgewiesen, auch Gab1 kommt bei Säugetieren in vielen Geweben vor (Holgado- Madruga et al. 1996). Die meisten Substrate werden nach Insulinstimulus durch Tyrosinphosphorylierung aktiviert.

Die weitere Signaltransmission der Insulinrezeptorkaskade erfolgt über die SH2-Domänen der aktivierten Insulinrezeptorsubstrate. An die phosphorylierten IRS-1 und IRS-2 docken zahlreiche Enzyme und Adaptorproteine über ihre SH2-Domänen. Dazu gehören die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase), die Phosphotyrosinphosphatase (SHP 2), Grb2, Nck und Crk (White, 1998).

Zahlreiche Studien zeigen, dass IRS-1 und IRS-2 nicht beliebig gegeneinander austauschbar sind. Vielmehr koppeln sie an unterschiedliche Proteine. Experimente mit IRS-1-defizienten Embryonalzellen ergeben, dass zum Beispiel die mitogene Wirkung von Insulin via IRS-1 durch das IRS-2 nicht vollständig kompensiert werden kann. Zusätzlich kann aber eine Signaltransduktion über den MAP-Kinase-Weg (mitogen activated protein kinase) erfolgen (Bruning et al. 1997). In Muskelzellen IRS-1-defizienter Mäuse wird eine signifikante Reduktion der insulininduzierten Aktivierung der PI3-Kinase, des Glukosetransports, der p70S6-Kinase, der mRNA- Translation und der Proteinsynthese (Yamauchi et al. 1996) gemessen. In Adipozyten IRS-1-defizienter Mäuse übernimmt IRS-3 die Funktion des IRS-1 als Aktivator der PI3-Kinase (Smith-Hall et al. 1997).

IRS-4 wird nicht auf diesem Weg phosphoryliert (Schreyer et al. 2003). Als einziges der IRS-Proteine bindet p62^{dok} nicht an die PI3-Kinase (Yamanashi & Baltimore 1997).

Die Aktivierung der PI3-Kinase führt zur Phosphorylierung des Phosphoinositids an der D3-Position des Inositol-Rings, wobei verschiedene Isoformen dieser Lipidkinase zu unterscheiden sind. Die insulinsensitiven Klasse-1a-PI3-Kinasen sind zusammengesetzt aus einer 85 kDa-Adaptor-Untereinheit und einer katalytischen 110 kDa-Untereinheit (Hu et al. 1993, Dhand et al. 1994). Durch alternatives Splicing entstehen verschiedene Isoformen: p110 α , p110 β , p110 δ und p85 α und p85 β (Vanhaesebroeck et al. 1997; Dhand et al. 1994).

Neben anderen Substraten ist das Phosphatidylinositol-(3,4,5)-Trisphosphat das Hauptsubstrat der Klasse-1-PI3-Kinasen, die durch Insulin und andere Wachstumsfaktoren stimuliert werden (Nave, Siddle & Shepherd, 1996). Den PI3-Kinasen der Klassen 2 und 3 wird keine Funktion bei der Insulinsignaltransduktion zugeschrieben.

Vermittelt werden durch die Klasse-1a-PI3-Kinase die Glukoseaufnahme (Clarke et al. 1994; Okada et al. 1994; Tsakiridis et al. 1995; Yeh et al. 1995), die Proteinsynthese (Mendez et al. 1997), "membrane ruffling" (Kotani et al. 1994; Tsadirikis, Vranic & Klip 1995) und schließlich Zellwachstum und Proliferation (Jhun et al., 1994, McIlroy et al. 1997). So sind unter anderem die Genexpression des Glukosetransporters Isoform 4, (GLUT4) und der Glukose-6-Phosphatase PI3-Kinase-gesteuert (Agati, Yeagley & Quinn 1998; Dickens et al. 1998). Auch die Induktion der Hexokinase II und der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase sind PI3-Kinase-abhängig.

Die Signale werden von der PI3-Kinase auf die Proteinkinase B (PKB; RAC; cAkt), die p70S6-Kinase und auf die atypische Proteinkinase C weitervermittelt.

Ein anderer Stoffwechselweg ist der MAP- Kinase- Weg. Dessen Aktivierung beeinflusst Zellwachstum, Proliferation und Zelldifferenzierung. Er ist entscheidend für die Vermittlung mitogener Effekte.

Einen Einfluss auf die Insulinwirkung hat die Proteinkinase C (PKC). Bereits im Vorhinein wurde die negative Korrelation zwischen Body-Mass-Index und allgemeiner Insulinsensitivität angedeutet (Ferrannini et al. 1997). Im Detail zeigt sich eine enge Verknüpfung zwischen Insulinresistenz und erhöhten Lipidspiegeln im Blut (Pan et al. 1997). Die Verbindung könnte durch die Proteinkinase C (PKC) entstehen, eine Serin-/ Threoninkinase.

Strukturell enthalten die PKC-Enzyme N-terminal eine Regulierungseinheit, C-terminal befindet sich die katalytische Region. Mitte der achtziger Jahre wurde die ersten PKC-Isoenzyme geklont, wobei vier Domänen sind: C1-4 (Coussens et al. 1986). Die C1-Domäne findet sich in den meisten Isoformen, sie enthält einen cysteinreichen Abschnitt, der die Diacylglycerol-/ Phorbolsterbindungsstelle bildet (Bell et al. 1991). Die C2-Domäne beinhaltet die Erkennungsstelle für die Fettsäuren und bei einigen Isoformen die Ca^{2+} -Bindungseinheit. Die C3- und die C4-Domänen bilden die Bindungsstellen für ATP und die Substrate (Newton 1995).

Basierend auf ihrer Struktur und den nötigen Kofaktoren werden die Proteinkinasen der Gruppe C in drei Untergruppen eingeteilt: PKC α , β_1 , β_2 und γ sind die zuerst entdeckten und am besten untersuchten Isoformen. Ihnen ist gemein, dass sie alle zur Aktivierung Calcium benötigen. Die „neuartigen“ PKC-Isoformen δ , ϵ , η (L), θ und μ sind aufgebaut wie die konventionellen PKC, allerdings fehlt ihnen die Ca^{2+} -Bindungsstelle. Die dritte Untergruppe bilden die atypischen PKC ζ und λ . Sie unterscheiden sich signifikant in der Struktur von den anderen PKC-Isoformen.

Typischerweise phosphoryliert die PKC Serin- oder Threoninreste an diversen Proteinen. Angesichts der zahlreichen Substrate ergeben sich vielschichtige biologische Funktionen der PKC (Nishizuka et al. 1986). Dazu gehören Rezeptoraktivierung, Veränderung der Membranstruktur, Transkriptionsregulierung, Vermittlung von Immunantworten, Zellwachstumsregulation und viele andere Funktionen (Newton, Minireview 1995).

Die Aktivierung der konventionellen und neuartigen PKC durch Lipidmetaboliten führt zu einer herabgesetzten Substrattyrosinphosphorylierung und Zellfunktion (Qu et al. 1999): Die reversible Phosphorylierung durch intrazelluläre Kinasen und Phosphatasen ist ein wichtiger Mechanismus der intrazellulären Signaltransduktion. Bei Übergewicht und Insulinresistenz ist bei den Schlüsselementen der Insulinrezeptorkaskade der Phosphorylierungsstatus verändert. Dadurch könnte es zu einer Herabregulierung der insulinvermittelten Zellantworten kommen (Qu et al. 1999). Unterstützt wird die Theorie durch den Nachweis erhöhter PKC-Aktivierung in Modellen von Fettleibigkeit (Avignon et al. 1996) und diätinduzierter Insulinresistenz (Qu et al. 1999).

Weiterer zentraler Aspekt in der Erforschung der Insulinresistenz sind die genetischen Variationen von Komponenten der Insulinrezeptorkaskade. Im Insulinrezeptorgen finden sich Polymorphismen, deren Ausprägungen zu besonders schwerer Insulinresistenz führen. Diese

Syndrome sind vom Typ-2-Diabetes zu unterscheiden. "Typ-A-Syndrom", Leprechaunismus, Rabson-Mendenhall-Syndrom und "Lipoatrophic Diabetes" entstehen durch Defekte der Rezeptorexpression, der Ligandenbindung und der Tyrosinkinaseaktivität (Krook et al. 1996)

Deshalb konzentriert sich die Suche nach genetischen Defekten auf die Proteine der Insulinrezeptorkaskade. Screeninguntersuchungen des IRS-1 ergaben verschiedene Variationen. Genort für IRS-1 ist der lange Arm des humanen Chromosom 2 (Almind, Doria & Kahn, 2001). Neben nicht stoffwechselwirksamen Polymorphismen (Imai et al. 1994) fallen vor allem der Aminosäureaustausch von Alanin zu Prolin in Codon 513 und die Glycin zu Arginin-Substitution in Codon 972 auf. Beide Varianten treten bei Typ-2-Diabetikern gehäuft auf (Almind et al. 1993, Hitman et al. 1995).

Vor allem der Austausch im Codon 972 wird in klinischen und experimentellen Studien als möglicher Faktor gesehen, der zu Insulinresistenz und gestörter Glukosetoleranz führt. Eine Zusammenfassung von Untersuchungen in unterschiedlichen Bevölkerungsgruppen ergibt eine Genfrequenz der ⁹⁷²Gly->Arg-Variante bei Typ-2-Diabetikern von 10,7 % gegenüber 5,8 % in Kontrollpersonen (Hitman et al. 1995). Bei übergewichtigen Trägern der ⁹⁷²Gly->Arg-Variante zeigt sich eine Stoffwechsellaage, die deutlich durch Insulinresistenz gekennzeichnet ist. Die Insulinsensitivität ist um bis zu 50 % reduziert (Clausen et al. 1995; Baroni et al. 2001).

In vitro-Versuche mit 32D(IR)-Zellen, die mit Wildtyp- oder dem ⁹⁷²Gly->Arg-Insulinrezeptorsubstrat-1 transfiziert wurden, ergaben einen Rückgang um 36% der PI3-Kinase-Aktivität in Zellen mit Mutante-IRS-1. Auch die insulininduzierte DNA-Synthese war um 32 % reduziert. Daraus lässt sich schließen, dass die Mutation zu Insulinresistenz sowohl bei klinisch Gesunden als auch bei Diabetikern führen könnte (Almind et al. 1996).

1.2. Zielsetzung

Zielsetzung der vorgelegten Arbeit war es, zwei GST-Fusionsproteine von IRS-1, einerseits des Wildtyps und andererseits mit der Mutation ⁹⁷²Gly->Arg, auf ihre Phosphorylierbarkeit hin zu untersuchen.

Zunächst wurde die Tyrosinphosphorylierung der beiden Fusionsproteine durch die β -Untereinheit des Insulinrezeptors im Vergleich untersucht, dann sollten mögliche Unterschiede bezüglich der Serin-/Threoninphosphorylierung durch die PKC-Isoformen α , β_1 , β_2 , γ untersucht werden. Anschließend sollte die Auswirkung der Serin-/Threoninphosphorylierung auf die anschließende Tyrosinphosphorylierung der Fusionsproteine untersucht werden.

Dies dient als Modell für einen Teilaspekt der biochemischen Veränderungen in der Zelle bei Übergewicht.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1 Proteingewinnung

BL-21-SI™ competent cells	Stratagene, La Jolla, USA
Hefe Extrakt (Yeast Extract)	Merck, Darmstadt
Tryptone Peptone Pancreatic Digest of Casein	Becton Dickinson, USA
Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma Chemical Co. St. Louis, USA
t-Octylphenoxypolyethoxyethanol	
Glutathione Sepharose™ 4B	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Poly-Prep® Chromatography Columns	Bio-Rad Lab. Hercules, USA
Microcon Centrifugal Filter Devices	Millipore Corporation, Bedford, USA
Complete Proteaseschutz	Roche, Mannheim
Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Glutathione Reduced Form	SIGMA, München
Wheat Germ Agarose (WGA) immobilized on cross-linked 4 % beaded agarose	SIGMA, München
N-Acetylglucosamin	SIGMA, München
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Serum Albumin bovine, purified (BSA)	Behring Diagnostics GmbH, Marburg, Deutschland

2.1.2. Phosphorylierungsexperimente

HEPES	GIBCO BRL/ Life Technologies
Dithiothreitol (DTT)	SIGMA, München
Albumine fraction V, fatty acid free	Roche, Mannheim
Adenosin-5'-Triphosphat (ATP)	Roche, Mannheim
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Protein Kinase C α, β ₁ , β ₂ , γ, Rat Brain	Calbiochem, USA
Okadainsäure (Okadaic Acid, Sodium Salt)	SIGMA, München

L- α -Phosphatidyl-L-Serin, Sodium Salt	SIGMA, München
[γ - ³³ P]-ATP Redivue™ ³³ P-nucleotide	Amersham Pharmacia Biotech UK limited, Buckinghamshire, England
Bisindolylmaleimid I (BIM)	SIGMA, München

2.1.3. Gelelektrophorese und Detektion

Color Marker	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
10 kDa Protein Ladder	GIBCO BRL/ Life Technologies
PhastGel™ Homogeneous 12,5 %	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
PhastGel™ SDS Buffer Strips	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
PhastGel™ Silver Kit	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
8-18%-Gradienten-Gel	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Rotiphorese Gel 30	Carl Roth GmbH Co, Karlsruhe
TEMED	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
GelBond®PAG-Film	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
AntiIRS-1 Antikörper K6b, Kaninchen	Universität Leiden
AntiRabbit IgG HRP	Conjugate Promega, Madison, USA
Phosphotyrosine-RC20 : HRPO	Transduction Laboratories
AntibodyStrippingSoln.	Alpha Diagnostic Intl. Inc.
SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate	PIERCE, Rockford, Illinois, USA
Ponceau S	SIGMA, München
Nitrocellulosemembran	Schleicher & Schüll GmbH, Dassel
Gel Drying Film	Promega, Madison, USA
Imaging Plate	Fuji Film, Japan

Weitere Chemikalien wurden in p. A. Qualität von den Firmen Carl Roth GmbH Co (Karlsruhe), SIGMA (München) und Merck (Darmstadt) bezogen.

2.2. Methoden

2.2.1. Proteingewinnung

2.2.1.1. Aufreinigen der GST-IRS-Fusionsproteine

Zur Synthese der GST-Fusionsproteine (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) wurden kompetente E. coli-Bakterien (Stratagene, La Jolla, USA) der Firma Stratagene verwendet.

Die Plasmide für die IRS-1-Domänen Mutante und Wildtyp wurden von Herrn Dr. Ran (DDFI) synthetisiert.

Die Bakterien wurden nach einem Protokoll der Firma Stratagene transformiert. Zu den Bakterien gab man 2 % (1 µl auf 50 µl) β-Mercaptoethanol. Nach Zugabe der DNA und Lagerung auf Eis wurden die Bakterien auf 42 °C erhitzt. Nach anschließender Inkubation in SOC-Medium (SOB-Medium mit 500 µl 2M filter-steriler Glukose-Lösung) bei 37 °C wurden die Bakterien auf Agarplatten ausgesät und über Nacht bei 37 °C kultiviert.

Als Starter der Proteinsynthese dient das LacOperon, die transformierten Bakterien sind ampicillinresistent.

Als Basis für eine Bakteriengroßkultur wurden am Vortag je 5 ml zweifach YTA (16 g/l Tryptone; 10 g/l Yeast Extract; 5 g/l NaCl; 100 mg/ml Ampicillin) mit Bakterien geimpft und über Nacht bei 37 °C kultiviert.

Am nächsten Tag wurde die Übernachtskultur in einer Verdünnung 1:100 in zweifach YTA weiter inkubiert. Währenddessen wurde das Bakterienwachstum in der Großkultur per OD-Messung bei 600 nm kontrolliert. In der logarithmischen Phase (OD 0,6-0,8) des Wachstums wurde Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (dioxanfrei) (1 mM, Carl Roth GmbH & Co; Karlsruhe) als Starter für das LacOperon hinzu gegeben. Nach weiterer Inkubation (2-6 h/30 °C/ 260 upm) wurde die Großkultur bei 7.700 x g für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet mit eiskaltem PBS-Puffer (einfach PBS, Complete Proteaseschutz) resuspendiert und soniziert. Bei Raumtemperatur wurde die Suspension mit Triton X-100 (0,1 %) gemischt (30 min). Anschließend wurde das Lysat zentrifugiert (Sorvall, SS 34, 10.000 upm). Vom Überstand wurde eine Probe („Lysat“) entnommen, anschließend wurde er

mit Glutathion-Sepharose-Beads (Raumtemperatur; 30 min) inkubiert. Wenn nicht anders angegeben, wurden die folgenden Schritte bei 4 °C durchgeführt. Der Überstand mit dem an die Beads gekoppelten Fusionsprotein wurde über eine Poly-Prep-Säule gegeben, vom Durchfluß wurde eine Probe genommen. Dann wurden die Beads mit dreimal dem Zehnfachen des Säulenvolumens an eiskaltem PBS-Puffer gewaschen. Nach Zugabe des Säulenvolumens an Elutionspuffer (50 mmol/l Tris-HCl (PH 8,0); 10 mmol/l Glutathion) wurde alles zusammen 10 min bei Raumtemperatur aufgestellt, anschließend wurde das Eluat bei 4 °C gesammelt. Der letzte Vorgang wurde dreimal hintereinander durchgeführt. Das Eluat wurde bei -20 °C gelagert.

Zur Bestimmung des Proteingehaltes wurde der optische Test nach Bradford (BIO-RAD) angewandt.

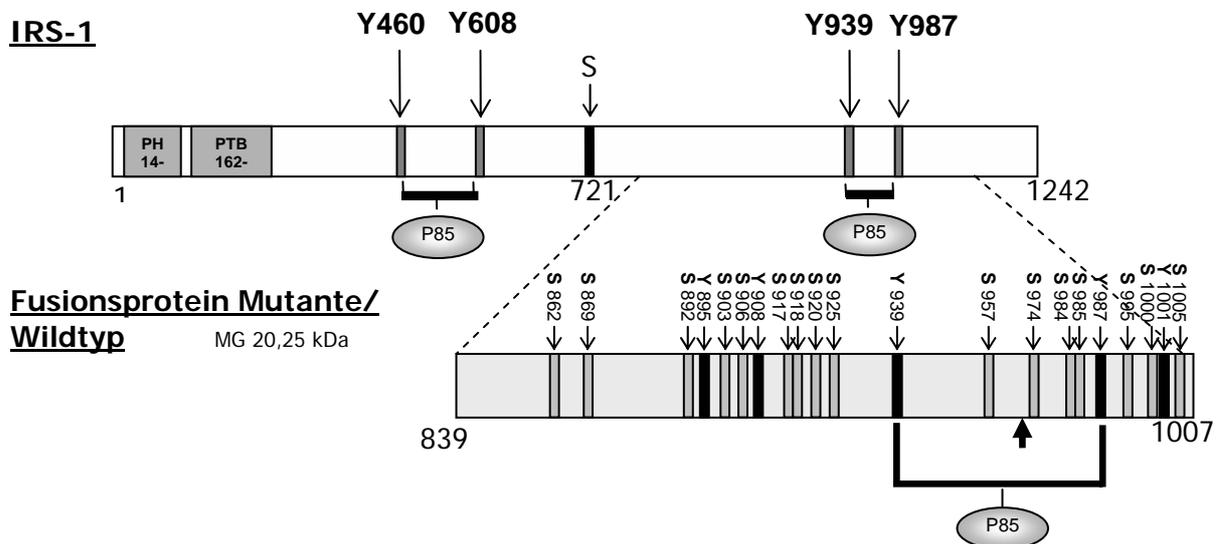


Abb. 2: IRS-1 und die Fusionsproteine

IRS-1 ist ein 1242 Aminosäuren (AS) großes Protein. Daraus wurden die beiden Fusionsproteine Mutante und Wildtyp gebildet, die jeweils aus 168 Aminosäuren bestehen (AS 839-1007). Sie beinhalten mit den Tyrosinphosphorylierungsstellen in Position 939 (Y⁹³⁹) und in Position 987 (Y⁹⁸⁷) eine der beiden Assoziationsstellen der P85-Untereinheit der PI-3-Kinase. Bei dem Mutante-Protein ist das Glycin 972 (Wildtyp) gegen ein Arginin (Mutation) ausgetauscht (▲).

```

0001 masppesdgf sdvrkvgylr kpksmhkrff vlraaseagg parleyyene kkwrhkssap
0061 krsiplescf ninkradskn khlvalytrd ehfaiaadse aeqdswyqal lqlhnrakgh
0121 hdgaaalgag ggggscsgss glgeagedls ygdvppgpaf kevwqvilkp kglgqtknli
0181 giyrlcltsk tisfvklse aaavvlqlmn irrcghsenf ffievgrsav tgpgefwmqv
0241 ddsvvaqnmh etileamram sdefrprskv qsssnncsnpi svplrrhhln npppsqvglt
0301 rrsrtesita tspasmvggk pgsfrvrass dgegtmsrpa svdgspsvps tnrthahrhr
0361 gsarlhpln hrsipmpas rcspatspv slssstsggh gtsdclfpr rssasvsgsp
0421 sdggfissde ygsspcdfsr sfrsvtpdsl ghtppargee elsnyicmgg kgpstltapn
0481 ghyilsrggn ghrctpgtg1 gtspalagde aasaadldnr frkrthsagt sptithqktp
0541 sqssvasiee ytemmpaypp gggsggrlpq hrhsafvptr sypeeglemh plerrgghhr
0601 pdsstlhtdd gymmpspgva pvpsgrkgsq dymmpspksv sapqqiinpi rrhpqrvdpn
0661 gymmmspsgg cspdiggggs ssssssnnavp sgtisygklwt ngvgghshv lphkppves
0721 sggkllpctg dymnmspvqd sntsspsdcy ygpedpqhkp vlsyyslprs fkhtqrpgep
0781 eegarhqhrlr lstssgrlly aataddssss tssdslgggy cgarlepsi1p hphhqvlgph
0841 lprkvdaaq tnsrlarptr lslgdpkast lprareqqqq qqp1lhpppep kspgeyvnie
0901 fgsdqsgyls gpvafhssps vrcpsqlqpa preeetgtee ymkmdlppgr raawqestgv
0961 emgrlgpapp gaasicrptr avpssrgdym tmqmscprqs yvdtspaapv syadmrtgia
1021 aeevs1prat maaassssaa sasptgpqga aelaahss1l ggpqgggms aftrvnlspn
1081 rnqsakvira dpqgcrrrhs setfsstpsa trvgntvpfg agaavggggg sssssedvkr
1141 hssasfenvw lrpge1lgap kepak1cgaa gglenglnyi dldlvkdfkq cpqectpepq
1201 ppppppphq1p lsgs1sstr rssedlsaya sisf1kqped rq

```

Abb. 3.: Aminosäure Sequenz des humanem IRS-1 und des Fusionsproteins

IRS-1 ist ein 1242 Aminosäuren langes Substrat der β - Untereinheit des Insulinrezeptors. Grau unterlegt ist die Sequenz des Wildtyp- Fusionsproteins. In Position 972 findet sich das Glycin, welches im Mutante- Protein durch ein Arginin ersetzt ist.

2.2.1.2. Insulinrezeptoraufreinigung

Zur Gewinnung des Insulinrezeptors wurden die Lebern von Wistarratten (gefüttert ad libidum, Gewicht 280-320 g, Harlan Winkelmann, Borcheln) entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Am Tag der Aufreinigung wurde eine Leber mit 3,5 ml Homogenisationspuffer (50 mM HEPES, pH 7,4; 1 % Triton X-100; Complete Proteaseschutz (zweifach)) pro Gramm Gewicht geturraxt. Anschließend wurde das Gemisch mit einem Potter feiner zerkleinert. Bei 10.000 x g wurden die groben Bestandteile der Leber in einem Rotor SS34 in einer Sorvall-Zentrifuge abzentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand mit dem durch das Triton gebundenen Protein wurde bei Raumtemperatur 60 Minuten solubilisiert. In der Ultrazentrifuge wurde der Überstand erneut zentrifugiert (100.000 x g ; 90 min; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) und das Pellet mit Membran- und sonstigen Zellbeständen erneut verworfen.

Unterdessen wurde eine Säule mit WGA-Beads (1,8 ml) mit mindestens dem zehnfachen ihres Volumens an eiskaltem Waschpuffer (Puffer B, 50 mM HEPES, pH 7,4; 0,1 % Triton X-100) äquilibriert.

Mit Hilfe einer Peristaltikpumpe wurde der Überstand auf die Säule aufgetragen, währenddessen binden alle glykosylierten Proteine an die Beads. Zum Waschen der Säule wurde wiederum Puffer B verwandt (75 ml/ml Säule). Zum Lösen der WGA-Fraktion von den Beads wurde 1 ml/ 1 g Leber Elutionspuffer (Puffer B; 0,3 M N-Acetyl-Glucosamin) über die Säule gegeben. Das Eluat wurde in Fraktionen à 500 µl gesammelt. Nach Bestimmung des Proteingehaltes nach Bradford wurden die Fraktionen aliquotiert und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.2. Phosphorylierungsexperimente

2.2.2.1. Tyrosinphosphorylierung

Die in vitro-Tyrosinphosphorylierung der Fusionsproteine durch den aufgereinigten Insulinrezeptor wurde im Phosphorylierungspuffersystem nach Sun et al. (1993) (zweifach: 40 mM Hepes; 2 mM DTT; 20 mM MgCl₂; 200 µg/ml BSA; 0,4 mM Na₃VO₄) durchgeführt. Im Folgenden werden die Standardversuchsbedingungen (Konzentration und Zeiten) angegeben. Abweichende Werte sind gesondert angegeben.

Zum Start der Reaktion wurde der Rezeptor (5 µg WGA-Protein) für 30 Minuten bei 30 °C mit Insulin (10⁻⁷ mol) in einfachem Phosphorylierungspuffer inkubiert, als Kontrolle wurde Insulinrezeptor ohne Insulin angesetzt. Danach wurde mit ATP (50 µM) die Autophosphorylierung des Rezeptors (10 min) gestartet.

Nach Zugabe des Fusionsproteins (1 µg) wurde dieses zehn Minuten durch den Insulinrezeptor phosphoryliert, anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 6-fach Laemmli (0,35 mol/l Tris-HCl (pH 6,8), 10,28% (w/v) SDS, 36% (v/v) Glycerin, 0,6 mol/l DTT, 0,012% (w/v) Bromphenolblau) und Erhitzen auf 95 °C (5 min) gestoppt.

Variiert wurden die Proteinmenge und die Insulinmenge, die Konzentrationen sind jeweils gesondert angegeben.

2.2.2.2 Serin-/ Threonin-Phosphorylierung durch die Proteinkinase C (PKC)

Die Phosphorylierung durch die PKC α, β₁, β₂, γ (Rat Brain, Calbiochem, USA) wurde zunächst durch die Bindung radioaktiven [³³P]-ATPs gemessen. Als Puffersystem diente ein

Kinasepuffer (zweifach: 40 mM HEPES, pH 7,4; 2 mM DTT; 20 mM MgCl₂; 200 µg/ ml BSA; 0,3 M CaCl₂). Das Reaktionsvolumen betrug 50 µl.

1 µg Fusionsprotein wurde an 10 µl Glutathion-Sepharose-Beads (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) gekoppelt (30 min; RT; 12.000 upm). Anschließend wurde das gekoppelte Protein mit 0,035 U PKC, 0,6 µg/µl Phosphatidylserin als Cofaktor sowie Okadainsäure als Phosphatasehemmer in Einfach-Kinasepuffer pipettiert. Zum Starten der Phosphorylierung wurde 50 µM nichtradioaktives ATP sowie zuzüglich 5 µCi [γ ³³P]-ATP hinzugegeben. Die Phosphorylierung dauerte 30 min bei 30 °C und wurde anschließend mit 1 ml eiskaltem PBS (einfach: 140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄ • 2 H₂O; 1,8 mM KH₂PO₄) gestoppt. Um die überschüssige Radioaktivität zu entfernen wurden die Beads abzentrifugiert und erneut in eiskaltem PBS-Puffer aufgenommen. Der Vorgang wurde dreimal wiederholt. Abschließend wurden die Beads mit 20 µl zweifach-Laemmli [20 % (v/v) Glycerin; 4 % (w/v) SDS; 0,01 % (w/v) Bromphenolblau; 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol; 125 mM Tris(HCl) pH 6,8] versetzt und bis zur Auftrennung im SDS-PAGE am darauffolgenden Tag bei -20 °C gelagert.

Bei der radioaktiven Serin-/ Threonin-Phosphorylierung wurden die Menge der PKC, die Phosphorylierungszeit und die Proteinmenge variiert.

2.2.2.3 Untersuchung des Effektes der Serin-/ Threoninphosphorylierung auf die Tyrosinphosphorylierung der Fusionsproteine

Die kombinierte Serin-/ Threonin- und Tyrosinphosphorylierung wurde in einem gemischten Puffersystem durchgeführt. Hierzu wurden der Kinase- und der Insulinrezeptorphosphorylierungspuffer kombiniert (zweifach: 40 mM HEPES, pH 7,4; 2 mM DTT; 20 mM MgCl₂; 200 µg/ ml BSA; 0,4 mM Na₃VO₄; 3,4 mM/ l CaCl₂).

Der Insulinrezeptor wurde hierzu in einfach-Phosphorylierungspuffer vorgelegt, durch Zugabe von Insulin (10⁻⁷ mol) wurde die Hormon-Rezeptor-Bindung (30 min/ 30 °C) aktiviert. Anschließend wurde 50 µM ATP hinzugegeben, wodurch die Autophosphorylierung des Insulinrezeptors gestartet wurde.

Unterdessen wurde die PKC mit Wildtyp- beziehungsweise Mutanteprotein in Einfach-Puffer vorgelegt. Als Aktivator der PKC diente 0,6 µg/µl Phosphatidylserin, als Phosphataseschutz wurde Okadainsäure zugesetzt. Zehn Minuten später wurde die Serin-/ Threonin-

phosphorylierung (30 min/ 30 °C) mit 50 µM ATP gestartet. Als Kontrolle diente Wildtyp- und Mutanteprotein ohne PKC.

Um den Einfluss der Serin-/ Threoninphosphorylierung auf die Tyrosinphosphorylierung zu untersuchen, wurde das durch die PKC vorbehandelte Substrat mit dem autophosphorylierten Insulinrezeptor inkubiert (10 min/ 30 °C). Als Kontrolle diente die Inkubation mit nicht aktiviertem Insulinrezeptor. Zum Teil wurde der PKC-Hemmstoff Bisindolylmaleimid I (BIM) zugesetzt, dies ist gesondert angegeben.

Abschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 6x-Laemmli-Puffer und durch fünfminütiges Aufkochen auf 95 °C gestoppt. Bis zur Auftrennung am darauf folgenden Tag wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

2.2.3. Gelelektrophoretische Auftrennung und Blotting der Proteine

Zur Kontrolle der Fusionsproteinaufreinigung wurden von Mutante- und Wildtypprotein jeweils Lysat, Durchfluß und Eluat aufgetragen. Wenn nicht anders angegeben, wurde die Probe auf 1 µg/ µl standardisiert und mit 6x-Laemmli und durch anschließendes Aufkochen denaturiert. Mit Hilfe des PhastSystems konnten die Proben auf zwei der 4 x 4 cm großen, homogenen 12,5 %- SDS- Gele gleichzeitig aufgetrennt werden. In der Entwicklungseinheit wurde dann das eine Gel silbergefärbt, während das andere in der Trenneinheit auf Nitrocellulosemembran (Schleicher & Schüll GmbH, Dassel) geblottet wurde.

Die Silberfärbung erfolgte mit dem PhastGel Silverkit™ nach dem dazugehörigen Protokoll.

Die Blotmembran wurde eine Stunde bei Raumtemperatur mit Blockierlösung (5 % Milchpulver in Waschpuffer) behandelt. Anschließend wurde der Antikörper K6b (antiIRS-1; Leiden) in einer Konzentration von 1:3000 in Blockierlösung mit der Membran inkubiert (1 h; Raumtemperatur). Nach dem einstündigen Waschen mit Waschpuffer [einfach TBST (pH 7,6; 10 mM Tris(HCl); 0,25 % Tween 20)] wurde der Zweitantikörper (antiRabbit-HRP; Promega Deutschland GmbH, Mannheim), vorgelegt im Verhältnis 1:10.000 in Blockierlösung, für eine Stunde auf die Membran gegeben. Nach dem abschließenden Waschen mit Waschpuffer (1 h; Raumtemperatur) wurde die Membran für etwa 4-10 Minuten in SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (PIERCE; Rockford, Illinois, USA) gelegt. Die Chemilumineszenz wurde anschließend mit dem LumiImager gemessen.

Bei Bedarf wurde der Blot gestrippt. Hierzu wurde die AntibodyStrippingSolution (Alpha Diagnostic International Inc., San Antonio, USA) in einer Verdünnung von 1:10 für 12 Minuten auf die Membran gegeben. Nach erneutem Blockieren der Membran (ca. 15 min) ist diese für eine neue Detektion präpariert.

Als Gegenprobe wurde der Blot auf die Glutathion-S-Transferase (GST) untersucht, als Kontrolle wurde reines GST-Protein aufgetragen. Die Inkubationszeiten waren die gleichen wie bei der Detektion auf IRS-1. Als Waschpuffer diente ebenfalls einfach-TBST, allerdings betrug die Tween 20-Konzentration 0,3 %. Dieser Waschpuffer mit 10 % Milchpulver diente als Blockierlösung. Erstantikörper war antiGST (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden), als Zweitantikörper diente antiGoat-HRP (Sigma Chemical Corp., St. Louis, USA).

Um die Proteine nach der in-vitro-Phosphorylierung aufzutrennen, wurde das Multiphor-II-System verwandt. Die Gele waren fertige 8-18 %-Gradienten-Gele (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) und selbstgefertigte 10 %-Gele [Trenngel: 4,9 ml Rotiphorese Gel 30 (Carl Roth GmbH & Co; Karlsruhe); 3,75 ml Tris pH 8,8; 6,1 ml H₂O; 150 µl 10 % SDS; 150 µl 10 % APS; 15 µl TEMED (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden); Sammelgel: 1,14 ml Rotiphorese Gel 30; 0,91 ml Tris pH 6,8; 4,81 ml H₂O; 70 µl 10 % SDS; 70 µl 10 % APS; 7 µl TEMED], als Trägerfolie diente GelBond[®]PAG-Film (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden).

Bei nichtradioaktivem Arbeiten wurden die Proteine nach der elektrophoretischen Auftrennung und dem anschließenden Blot auf Nitrocellulosemembran (Schleicher & Schüll GmbH, Dassel) auf ihre Tyrosinphosphorylierung hin untersucht. Dazu wurde die Membran zunächst eine Stunde lang bei Raumtemperatur mit BSA-Lösung blockiert [Waschpuffer (s.u.) mit 1 % bovinem Serumalbumin (Fraktion V; Roche, Mannheim); pH 7,5]. In einer Konzentration von 1:2500 wurde der antiPhosphotyrosin-Antikörper RC20 (Transduction Laboratories, USA) in Blockierlösung auf die Membran gegeben. Je nach Angabe dauerte die Inkubation eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Nach einstündigem Waschen wurde die Membran für 4-10 min in SuperSignal[®] West Pico Chemiluminiscent Substrate (PIERCE; Rockford, Illinois, USA) gelegt. Die Chemilumineszenz wurde anschließend mit dem LumiImager gemessen.

Bei der Verwendung von radioaktivem ATP wurde die ATP-Bindung der Proteine durch den PhosphoImager (Fuji) gemessen. Hierzu wurde das Gel nach der Elektrophorese silbergefärbt

und in Gel Drying Film (Promega, Madison, USA) getrocknet. Am darauffolgenden Morgen wurde das Gel auf eine Imaging Plate (IP, Fuji Film, Japan) aufgelegt. Die Expositionszeit betrug, wenn nicht anders angegeben, drei Tage.

Alle Daten wurden anschließend quantifiziert, soweit nicht anders angegeben wurde der Mittelwert aus drei voneinander unabhängigen Experimenten \pm SEM (Standardabweichung der Mittelwerte) gebildet. Der Vergleich der beiden Versuchsansätze „Mutante“ beziehungsweise „Wildtyp“ erfolgte mit dem t-Test nach Student. Dazu wurde das Computerprogramm „t-ease“ (ISI, Philadelphia, USA) verwandt.

3. Ergebnisse

3.1. Proteingewinnung

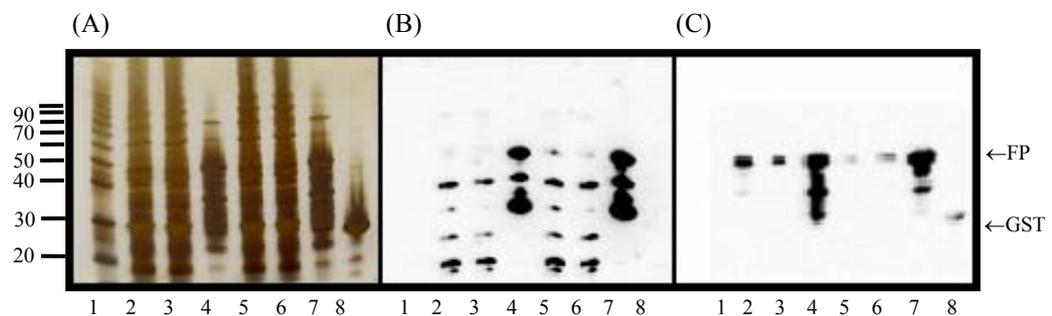


Abb.4: Silberfärbung und aIRS-1 K6b und aGST-Blot

Lanes: 1 10 kDa-Marker 3 Wt Durchfluß 5 Mt Lysat 7 Mt Eluat
 2 Wt Lysat 4 Wt Eluat 6 Mt Durchfluß 8 GST Eluat

Die Fusionsproteine wurden nach dem Protokoll der Firma Stratagene durch Kopplung an Glutathion-Sepharose Beads aus *E. coli* aufgereinigt. Bei Ablösung der Fusionsproteine von den Beads mit Hilfe des GST-Elutionspuffers wurden bei den vorbereitenden Schritten (Lysat, Durchfluß) und vom Eluat Proben entnommen und im SDS-Page aufgetrennt.

A) silbergefärbtes SDS-Gel

B) Westernblot, Detektion mit AntiIRS-1-Antikörper K 6b

C) Redetektion mit AntiGST-Antikörper nach Stripping der Membran

GST = Glutathion-S-Transferase, **FP** = Fusionsprotein, **Mt** = Mutante, **Wt** = Wildtyp

3.1.1. Proteinaufreinigung aus *E. coli*

Die GST-Fusionsproteine „Wildtyp“ (Wt) und „Mutante“ (Mt) wurden nach Protokoll der Fa. Stratagene aufgereinigt. Da es sich um die Fusion aus Glutathion-S-Transferase (29 kDa) und der IRS-1-Sequenz (AS 839-1007, 168 AS, Summe aller Molekulargewichte der einzelnen Aminosäuren: 20,25 kDa) handelt, ergibt sich ein rechnerisches Molekulargewicht von 49,25 kDa.

In der Silberfärbung kann ein etwa 50 kDa großes Protein gezeigt werden (Abb.4 A). Zur Kontrolle wird ein zweites Gel auf Nitrocellulosemembran transferiert und zunächst mit dem Antikörper aIRS-1 K6b im Chemiluminiszenzverfahren detektiert. Nach Antikörperstripping zeigt eine Inkubation mit aGST Banden in der entsprechenden Höhe, die Kontrolle mit GST-Eluat ist positiv.

Die Signale bei etwa 50 kDa in beiden Fällen belegen die Annahme, dass es sich um die gesuchten Proteine handelt (Abb.4 B u. C). Mit der erfolgreichen Aufreinigung sind die Proteine für alle anschließenden Phosphorylierungsexperimente bereitgestellt.

3.1.2. Insulinrezeptoraufreinigung

Die Insulinrezeptoraufreinigung aus Rattenlebern mittels einer WGA-Säule ergab etwa 5 ml Eluat, das in 500 μ l-Fractionen gesammelt wurde. Für die Phosphorylierungsversuche verwendbar waren in etwa zwei Fractionen pro Aufreinigung, ihr Proteingehalt betrug zwischen 0,6 und 1,5 mg/ml (Abb 5).

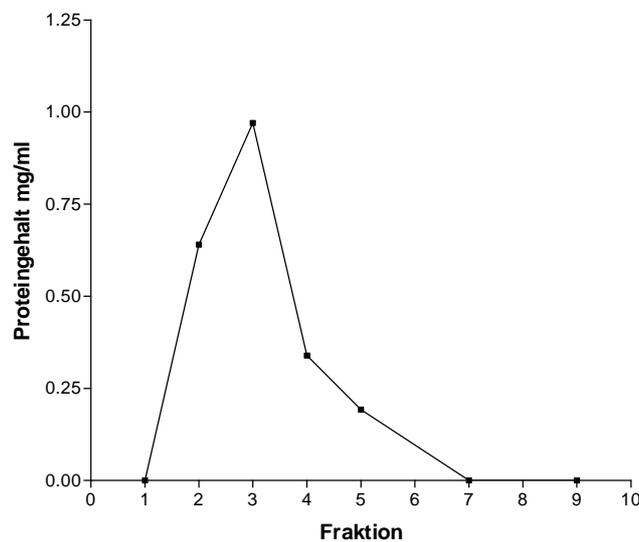


Abb. 5: Proteinausbeute einer WGA-Rezeptoraufreinigung

Der verwendete Insulinrezeptor wurde aus den Lebern von Wistar-Ratten gewonnen. Dazu wurde die Leber mit Homogenisationspuffer homogenisiert, gepottert und zentrifugiert. Die Aufreinigung der Membranfraktion erfolgte über die Kopplung an WGA-Beads. Die Ablösung von den Beads erfolgte mit GlcNAc-Elutionspuffer. Danach wurde der Proteingehalt der gewonnenen Eluatfraktionen (je 500 μ l) mit dem Proteintest nach Bradford gemessen. Dabei handelt es sich um ein Gemisch verschiedener membranständiger Proteine aus der Leber. Der Graph zeigt den Proteingehalt der einzelnen Fractionen in mg/ml Eluat. Dargestellt ist das Ergebnis einer repräsentativen Rezeptoraufreinigung.

3.2. Phosphorylierungsexperimente

3.2.1. Tyrosinphosphorylierung

Beide Fusionsproteine wurden durch die β -Untereinheit des Insulinrezeptors tyrosinphosphoryliert. Bei 30 °C wurde das Fusionsprotein mit 5 μ g WGA-Fraktion inkubiert. Nach Stoppen der Reaktion mit 6x Laemmli-Puffer wurde der Versuchsansatz im SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion des Nitrocelluloseblots mit dem Anti-Phosphotyrosinantikörper RC20 zeigte eine deutliche Bande bei etwa 48 kDa (s.o.) (Abb. 6). In Höhe von etwa 95 kDa stellte sich eine weitere Bande dar. Hierbei handelt es sich um die phosphorylierte β -Untereinheit des Insulinrezeptors (IR- β), die ein Molekulargewicht von 95 kDa hat. Die α -Untereinheit des Insulinrezeptors hat ein Molekulargewicht von 135 kDa und stellt sich im Blot nicht dar.

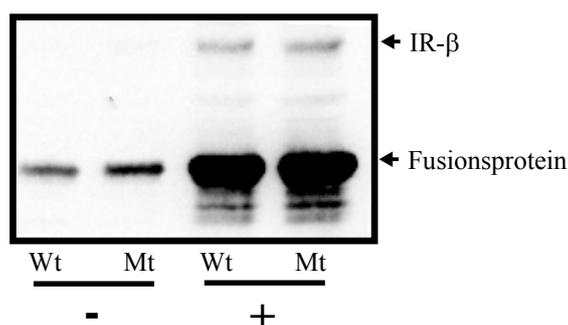


Abb. 6: Tyrosinphosphorylierung der Fusionsproteine und der IR- β -Untereinheit

Die Fusionsproteine Wildtyp (Wt) und Mutante (Mt) wurden mit dem Insulinrezeptor ohne (-) und mit 10^{-6} mmol (+) Insulin bei 30° C für 30 min. inkubiert. Nach der in-vitro-Phosphorylierung wird der Versuchsansatz im SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose-Membran geblottet. Die Detektion erfolgt mit dem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper RC20

Im Verlauf der Versuche wird die Fusionsproteinmenge mehrfach variiert, optimal ist 1 μ g/ Ansatz, so dass im Gel 0,33 μ g aufgetragen werden. Die Ergebnisse der Insulinvarianz zeigt die Abbildung 7. Zwischen 10^{-11} und 10^{-7} mol zeigt sich eine Steigerung des Insulin-effektes, darüber hinaus sind keine Effekte mehr nachzuweisen. Daraufhin wurde als optimale Insulinkonzentration 10^{-7} mol festgelegt.

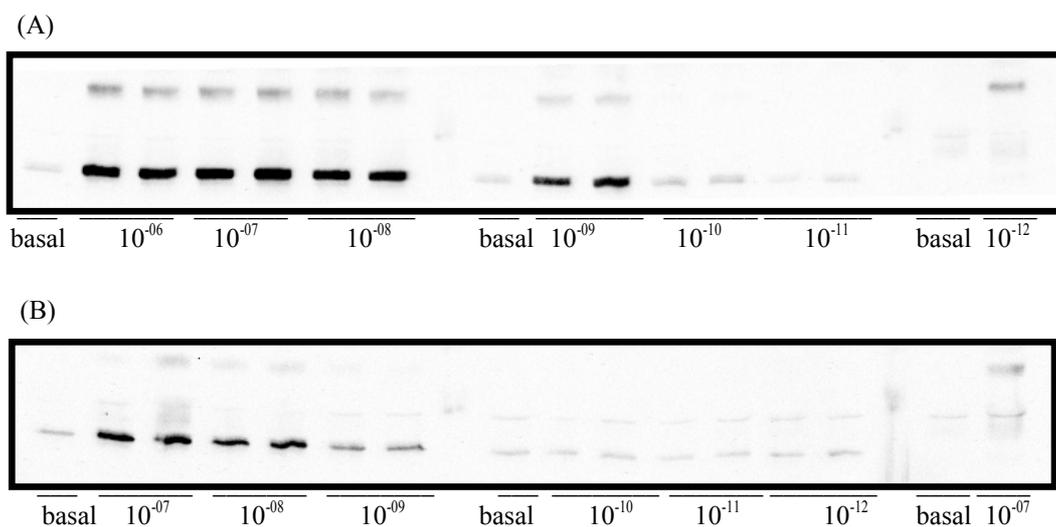


Abb. 7: Variation der Insulinkonzentration

Bei der *in vitro*-Tyrosinphosphorylierung der Fusionsproteine (Fp) durch den Insulinrezeptor wurde die Insulinkonzentration variiert. Pro Konzentrationstufe wurden zwei Ansätze gemacht. Die Angaben zur Konzentration finden sich unter den Banden, jeweils die letzten beiden Säulen zeigen den Insulinrezeptor allein, basal und mit der angegebenen Insulinkonzentration stimuliert. (A) zeigt die Ergebnisse der Mutante-Versuche, (B) das Wildtyp-Experiment.

3.2.2. Serin-/ Threoninphosphorylierung durch die PKC

In der nächsten Versuchsreihe wurden die Fusionsproteine zunächst an Glutathion-Sepharose-Beads gekoppelt und dann mit der Proteinkinase C α , β_1 , β_2 , γ (im Folgenden nur noch als „PKC“ bezeichnet) und ^{33}P -ATP inkubiert. Die Versuchsansätze wurden im SDS-PAGE aufgetrennt, das Gel wurde silbergefärbt und für drei Tage auf eine Photoplatte (Fujifilm Imaging Plate) aufgelegt. Es zeigten sich am PhosphoImager eindeutige, aber sehr schwache Banden in Höhe der Fusionsproteine. Zeitgleiche Beobachtungen durch M. Sommerfeld (AG Eckel, DDFI) zeigten eine sterische Behinderung der Phosphorylierung durch die Glutathion-Sepharose-Beads. Daraufhin wurden die Fusionsproteine erst nach der Serinphosphorylierung an die Beads gekoppelt, woraufhin sich wesentlich bessere Signale zeigten. In Abbildung 8 wird der Unterschied deutlich.

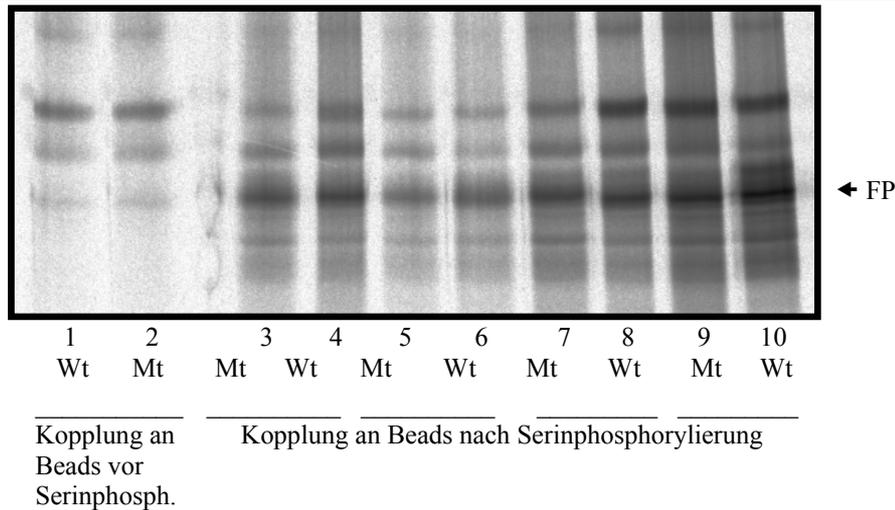


Abb. 8: Serinphosphorylierung der Fusionsproteine durch die PKC

Das Fusionsprotein (Fp) wurde mit ^{33}P -ATP-markiertem ATP durch die PKC in vitro-serinphosphoryliert. Dazu wurde es an Glutathion-Sepharose-Beads gekoppelt, L. 1 u. 2 zeigen das Ergebnis, wenn die Kopplung vor der Phosphorylierung stattgefunden hat, bei den Versuchansätzen 4 bis 11 wurde nachher gekoppelt.

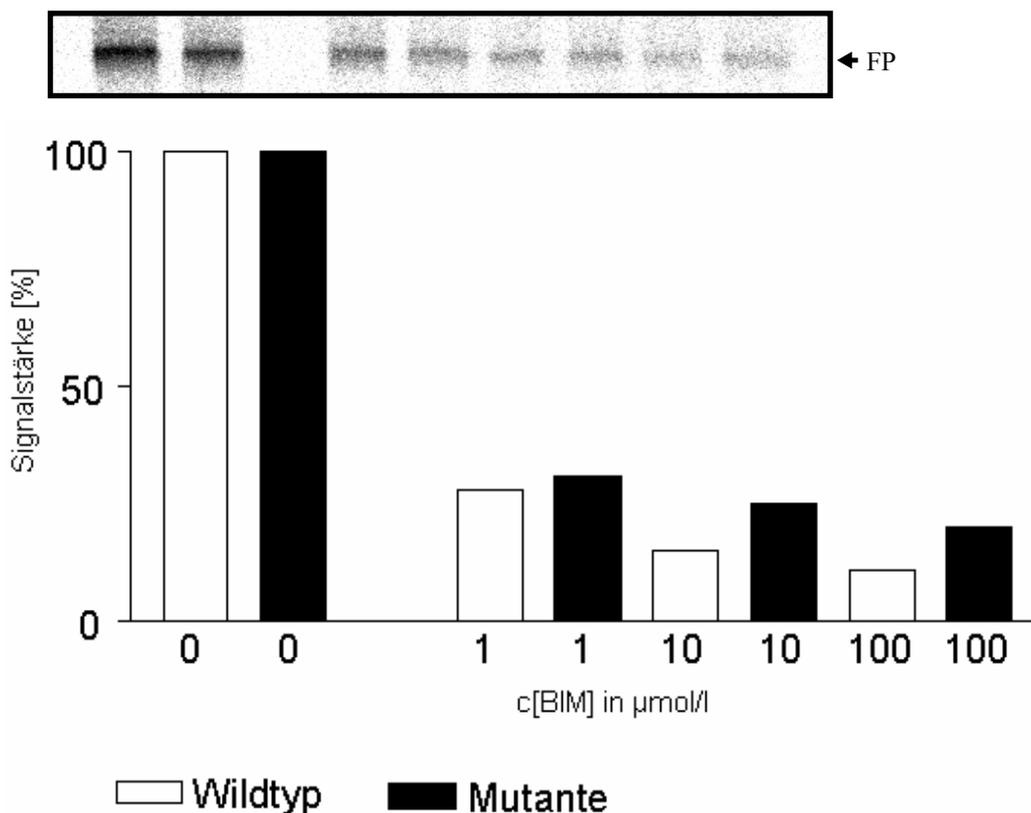


Abb. 9: Hemmung der PKC durch Bisindolylmaleimid I

Die beiden Fusionsproteine (Fp) wurden mit der PKC inkubiert und mit ^{33}P -markiertem ATP serin-/ threoninphosphoryliert. Nach Auftrennung im Westernblot wurde das Gel silbergefärbt und im PhosphorImager ausgewertet. Im Vergleich wurde die PKC nicht (L 1 und 2), und mit ansteigender BIM-Konzentration (1-100 μmol , L 4-10) gehemmt.

Teil A zeigt die Fusionsproteinbanden in der PhosphoImagerdarstellung

Teil B zeigt die Abnahme der Phosphorylierung in Abhängigkeit von der zunehmenden BIM-Konzentration

Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von dreien.

Außerdem wurde die PKC-Menge variiert, von 0,035 u auf die doppelte und auf die fünffache Enzymmenge. Für die weiteren Versuche wurden 0,07 u PKC eingesetzt.

Darüber hinaus wurde in diesem Ansatz die PKC-Aktivität mit 100 nM Bisindolylmaleimid I (BIM) gehemmt. Es zeigte sich nur eine geringfügige Hemmung, darum schlossen sich weitere Tests zur Variation der BIM-Konzentration pro Ansatz an (Abb. 9).

3.2.3. Effekt der Serin-/ Threoninphosphorylierung der Fusionsproteine auf die Tyrosinphosphorylierung

Nachdem weder bei der Tyrosinphosphorylierung noch bei der Serin-/ Threoninphosphorylierung der IRS 1- Fusionsproteine ein signifikanter Unterschied zwischen dem Mutantprotein und dem Wildtypprotein gefunden werden konnte, wurde abschließend der Einfluss der phosphorylierten Serine und Threonine auf die Tyrosinphosphorylierung durch die IR- β - Untereinheit untersucht. Um eine Phosphorylierung von IR- β durch die PKC weitgehend auszuschließen, wurde die Aktivität der PKC nach Inkubation mit den Fusionsproteinen und vor Zugabe der IR- β mit 100 μ mol Bisindolylmaleimid I gehemmt (Abb. 10).

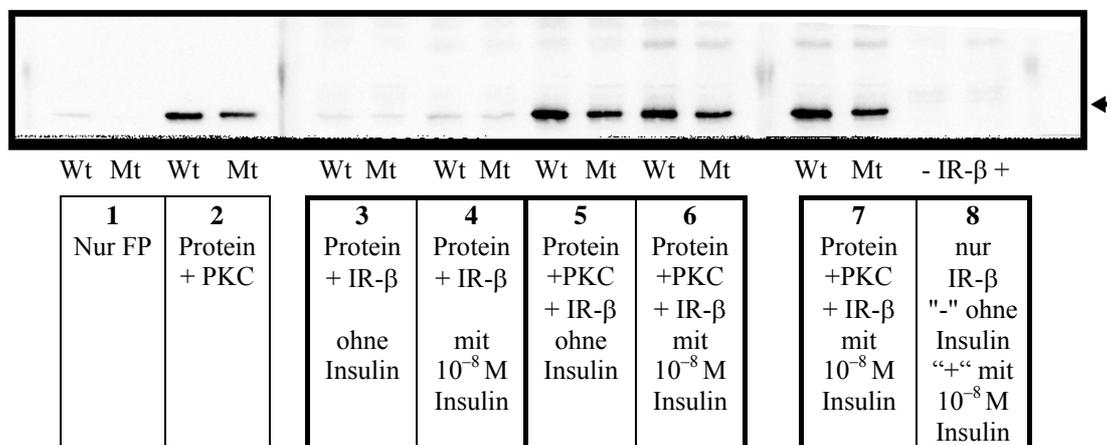


Abb. 10: Nicht-radioaktive Serin-/ Threoninphosphorylierung mit anschließender Tyrosinphosphorylierung

Es wurden Wildtyp- (Wt) und Mutante- (Mt) Fusionsprotein nur mit der PKC (2) und nur mit dem Insulinrezeptor (ohne (3) und mit (4) Insulin) inkubiert. Außerdem wurde das Fusionsprotein nacheinander mit der PKC und mit dem Insulinrezeptor zur Reaktion gebracht. Und zwar ohne Insulin (5) und mit Insulin (6,7). In den Absätzen 8 – und + wurde der Insulinrezeptor allein mit und ohne Insulinstimulus inkubiert.

Es wurde mit dem AntiPhosphotyrosin-Antikörper RC20 detektiert

◀ markiert jeweils die Höhe der Bande der Fusionsproteine

Diese Versuchsreihe sollte zunächst nicht radioaktiv durchgeführt werden. Hierzu wurde als Puffersystem der Phosphorylierungspuffer nach Sun et al. gewählt. Anders als bei der reinen Tyrosinphosphorylierung wurde als PKC-Cofaktor Kalzium in Form von CaCl_2 (1,7 mmol) zugesetzt, so wie bereits bei den vorangegangenen Serin-/ Threoninphosphorylierungen. Die Detektion der Phosphotyrosine sollte mit RC20 erfolgen.

Soweit der gedachte Ansatz, in der Durchführung ergaben sich aber zwei gravierende Probleme, die in Abbildung 11 deutlich werden: Zum einen zeigt RC20 in Höhe der Fusionsproteine Signale nach reiner Serin-/ Threoninphosphorylierung, zum anderen konnte in diesem Puffersystem mit Kalzium auch ohne vorherige Inkubation mit der PKC keine Tyrosinphosphorylierung durch die IR- β mehr nachgewiesen werden.

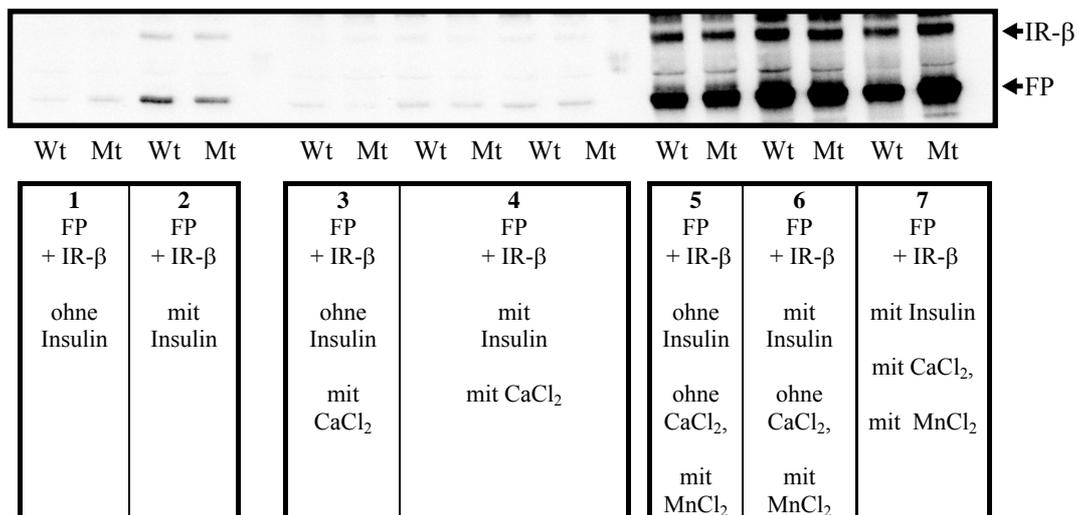


Abb. 11: Vergleich verschiedener Puffer zur kombinierten Phosphorylierung

Nach dem üblichen Schema wurden die Fusionsproteine einer Tyrosinphosphorylierung durch den Insulinrezeptor unterzogen. Variiert wurden die Zusatzstoffe zum Phosphorylierungspuffer wie angegeben.

Ohne Kalzium ist der Puffer in L 1 und 2, dann wurde Kalziumchlorid zugesetzt (3 und 4).

In Ansatz 5 und 6 wurde zusätzlich Manganchlorid hinzugefügt.

Mt = Mutante, Wt= Wildtyp, IR- β = β -Untereinheit des Insulinrezeptors

Eine Komplexierung des Kalziums mit EGTA hatte nicht den gewünschten Effekt, es konnte keine Phosphorylierung nachgewiesen werden. Allerdings ist bekannt, dass Manganchlorid (MnCl_2) die Tyrosinphosphorylierung begünstigt. Abbildung 11 zeigt, dass unter Zugabe von MnCl_2 zum Phosphorylierungspuffer eine hochgradige Verstärkung des Phosphotyrosinsignals erreicht wird. Diese Wirkung ist unabhängig davon, ob Kalzium im Puffer enthalten ist oder

nicht, so dass für dieses Problem eine überaus zufriedenstellende Lösung gefunden werden konnte.

Das andere unerwartete Problem stellte sich durch die Tatsache, dass der antiPhosphotyrosin-Antikörper RC20 nachweislich Phosphoserine und Phosphothreonine detektierte. Deshalb wurde die Radioaktivmethode mit ^{33}P -ATP gewählt, mit der bereits die reine Serin-/ Threoninphosphorylierung nachgewiesen wurde.

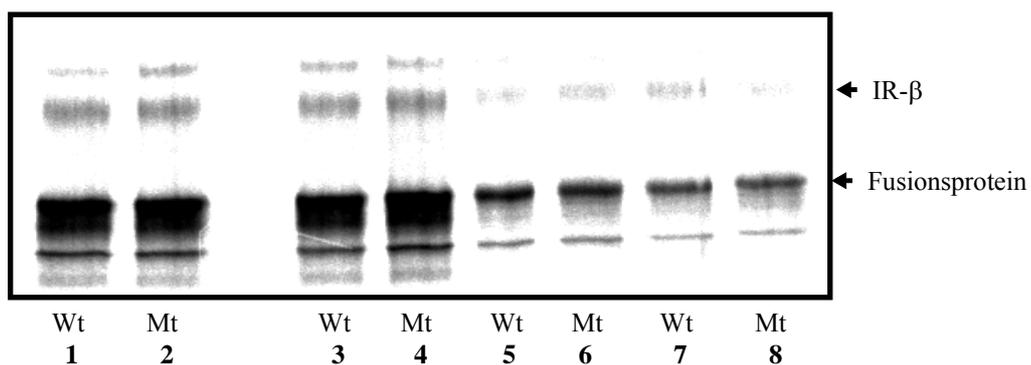


Abb. 12: Hemmung der Tyrosinphosphorylierung durch vorhergehende Serin-/ Threonin - phosphorylierung der Fusionsproteine

- 1 bis 4:** 1 μg Fusionsprotein wurde mit 10 μCi ^{33}P -ATP durch 5 μg WGA bei Stimulation durch 10^{-7} M Insulin tyrosinphosphoryliert. Anschließend erfolgte die elektrophoretische Auftrennung im SDS-PAGE und die Detektion im PhosphoImager.
- 5 bis 8:** Die Fusionsproteine wurden nicht-radioaktiv durch die PKC serin-/ threoninphosphoryliert, bevor sie unter gleichen Bedingungen wie in 1 bis 4 tyrosinphosphoryliert wurden.

So konnte schließlich gezeigt werden, dass eine vorherige Serin-/ Threoninphosphorylierung durch die PKC die Tyrosinphosphorylierung durch IR- β hemmt. Die PKC wurde vor Zugabe des WGA- Materials mit 100 mmol Bisindolylmaleimid I gehemmt (Abb.12). Dadurch kann ein Einfluss auf IR- β weitgehend ausgeschlossen werden. Abbildung 13 fasst drei Versuche zur Reduktion der Tyrosinphosphorylierung zusammen. Eine deutliche Reduktion ist zu erkennen. Allerdings besteht kein signifikanter Unterschied zwischen dem Wildtyp- und dem Mutanteprotein.

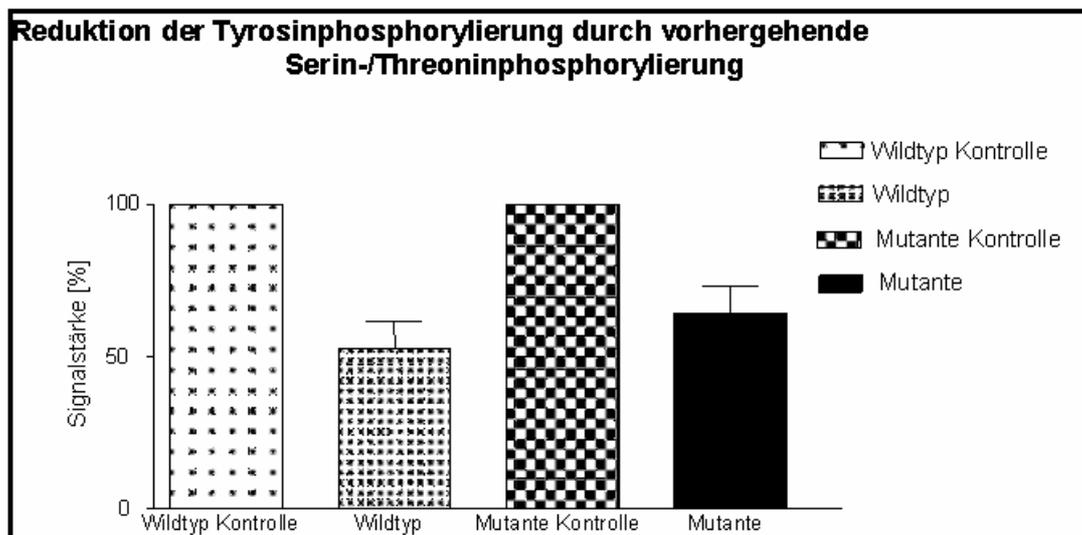


Abb. 13: Hemmung der Tyrosinphosphorylierung nach Serin-/ Threoninphosphorylierung

Dargestellt ist die statistische Auswertung aus drei Versuchen zur Hemmung der Tyrosinphosphorylierung. Dazu wurden die Banden der beiden Fusionsproteine quantifiziert und jeweils im Vergleich zur reinen Tyrosinphosphorylierung (Kontrolle) ausgewertet. Der Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante ist nicht signifikant.

4. Diskussion

4. 1. Proteingewinnung

4.1.1. Proteinaufreinigung aus E. coli

In der vorgelegten Arbeit ging es darum, zwei GST-Fusionsproteine von IRS-1, einerseits des Wildtyps und andererseits mit der Mutation $^{972}\text{Gly}\rightarrow\text{Arg}$ auf ihre Phosphorylierbarkeit hin zu untersuchen.

Zunächst wurde die Tyrosinphosphorylierung der beiden Fusionsproteine durch die β -Untereinheit des Insulinrezeptors im Vergleich untersucht, dann wurden Unterschiede bezüglich der Serin-/Threoninphosphorylierung durch die PKC-Isoformen α , β_1 , β_2 , γ eruiert. Anschließend wurde die Auswirkung der Serin-/Threoninphosphorylierung auf die anschließende Tyrosinphosphorylierung der Fusionsproteine analysiert.

Dies dient als Modell für einen Teilaspekt der biochemischen Veränderungen in der Zelle bei Übergewicht.

So bestand die erste Aufgabe darin, die Fusionsproteine für die in vitro- Versuche zum Vergleich der beiden humanen IRS- 1- Varianten „Wildtyp“ und „Mutante $^{972}\text{Gly}\rightarrow\text{Arg}$ “ zu gewinnen.

Die Proteine wurden mit dem bereits etablierten pGEX- Vektoren- System erstellt (Diplomarbeit M. Sommerfeld, DDFI, 1999). Durch die pGEX- Vektoren können in E. coli fremde Polypeptide gebildet werden. Die Form erlaubt eine schnelle Aufreinigung, ohne dass die Proteine denaturiert werden (Smith und Johnson, 1988). Die fremden Polypeptide werden an das C-terminale Ende der Glutathion- S- Transferase (GST) fusioniert. Die GST ist ein eukaryotisches 26-kDa-Protein aus dem Cytoplasma. Das Gen für den pGEX- Vektor wurde ursprünglich aus Schistosoma japonicum kloniert (Smith et al., 1986). Der große Vorteil des Systems liegt darin, dass die Fusionsproteine löslich bleiben. Exprimiert man native Proteine in E. coli, so denaturieren und präzipitieren sie häufig.

Die Subklonierung der DNA in das pGEX-Vektorplasmid wurde bereits in früheren Arbeiten in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt (Dissertation Dr. H. Ran). Diese Experimente ergaben als optimale Fusionsproteine die IRS-1-Ausschnitte von AS 839 bis 1007, einmal als Wildtyp und

zum anderen mit der Mutation ⁹⁷²Gly->Arg. Nach der Transformation der Plasmide in E. coli wurden die Bakterien zum größten Teil eingefroren.

Zur Aufreinigung der Fusionsproteine wurden die Bakterien nach Protokoll kultiviert (Smith et al., 1993). Nach Solubilisierung und Aufreinigung der Proteine über eine Glutathionagarosebeadsäule wurde das Eluat im Phastsystem aufgetrennt. Nach Silberfärbung zeigten sich sowohl beim Wildtyp als auch bei Auftrennung des Mutanteeluats deutliche Banden in Höhe von 50 kDa, also im errechneten Molekulargewichtsbereich. Zudem zeigen sich einige Bruchstücke in der Eluatlane was mit anderen Arbeiten übereinstimmt. Vermutlich handelt es sich um degradierte Fragmente des Fusionsproteins, die an Glutathion binden. Sie sind nicht einfach zu eliminieren, eventuell könnte die Zugabe von Proteaseinhibitoren (Aprotinin und Phenylmethylsulfonylfluorid) das Protein stabilisieren oder EDTA zum Lysepuffer hinzugefügt werden. Die Bakterienkultur wurde zur Steigerung der Effektivität länger mit IPTG inkubiert (Smith et al. 1993).

Mit Fortschreiten der Experimente zeigte sich, dass die Proteinfragmente die Analysierbarkeit der erhobenen Daten nicht beeinträchtigten, so dass auf weitergehende Maßnahmen zur Stabilisierung der Fusionsproteine verzichtet werden konnte. So sind bei der Detektion mit dem antiIRS-1-Antikörper K6b eine deutliche Bande in Höhe von 50 kDa sowie einige kleinere Fragmente zu erkennen. Im Eluat ergibt sich bei der Detektion mit antiGST ein ähnliches Bild. In den Phosphorylierungsexperimenten zeigt sich eine deutlich Bande, die gut vom Rest abzugrenzen ist. Wie im Protokoll zur Aufreinigung der Fusionsproteine angegeben, behalten sie ihre Funktionalität und Antigenität (Smith et al., 1993)

Neben dem Silbergel wurde ein zweites PhastGel auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und wie beschrieben mit antiIRS-1 K6b detektiert. Die Gegenprobe mit antiGST nach Stripping der Membran zeigt, dass es sich in Höhe von 50 kDa um das von uns hergestellte Fusionsprotein handelt.

Ein Silbergel wurde nach jeder Aufreinigung angefertigt, es zeigten sich keine Unterschiede. Eine Lagerung der Bakterien bei -80 °C auch über mehrere Monate ist also nicht beeinträchtigend.

Zusätzlich gibt es noch die Möglichkeit, das synthetisierte Protein durch spezifische Proteasen von der GST abzuspalten. Häufig beeinträchtigt aber die GST die Antigenität und Aktivität des Proteins nicht (Smith et al., 1993). Die Ergebnisse bestätigen diese Beobachtung

auch in bezug auf die IRS-1-Abschnitte, die in unserer AG verwendet werden. In Weiterführung der vorgelegten Arbeit wäre eine Untersuchung des abgespalteten Proteins aber sicher von Interesse, um einen direkten Vergleich für die beiden Proteine vorzulegen.

Betont sei jedoch an dieser Stelle, dass eine Abspaltung den Umgang mit den Proteinen erschweren würde. Durch Bindung an die Glutathion-Sepharose-Beads konnte das radioaktiv serinphosphorylierte Protein fixiert werden, während das überschüssige ^{33}P -Phosphat abgewaschen wurde. Ohne diese Möglichkeit könnten keine derart klaren Banden im Radioaktivscreening erreicht werden.

4.1.2. Insulinrezeptoraufreinigung

Zentrales Element der vorgelegten Arbeit ist die Tyrosinphosphorylierung der Fusionsproteine durch den Insulinrezeptor. Gewonnen werden konnte er aus der Leber von Wistarratten durch Aufreinigung der glykosylierten Proteine aus dem Lebergewebe nach dem Protokoll von Burant et al. (1984). Zunächst wurde das Gewebe zerkleinert und mit Triton die Proteine herausgelöst. Nach anderen Zwischenschritten konnten über eine WGA-Säule die glykosylierten Proteine gebunden werden. Durch Eluierung mit N-Acetyl-Glucosamin wurde die Membranfraktion gewonnen. Für die Phosphorylierungsexperimente wurde konstant 5 μg WGA-Protein pro Versuchsansatz eingesetzt. Nach der Reaktion wurde der Versuchsansatz im SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit RC20 detektiert.

Bei einem Molekulargewicht von etwa 95 kDa zeigt sich deutlich die β -Untereinheit des Insulinrezeptors. Übereinstimmend mit der allgemein anerkannten Theorie zur Fortleitung des Insulinsignals (Torqvist et al. 1987) wird sie tyrosinphosphoryliert.

Die Phosphorylierung sowohl der IR- β -Untereinheit als auch beider Fusionsproteine des humanen IRS-1 zeigt, dass eine Interaktion stattfindet, obwohl die Proteine unterschiedlichen Organismen entstammen. Die Sequenzierung verschiedener Klone und die Konstruktion der kompletten humanen IRS-1-cDNA zeigte ein sehr hohes Maß an Homologie zwischen humanem und Ratten-IRS-1. Auf der Ebene der Aminosäuresequenz erscheint humanes IRS-1 als 1242 Aminosäuren langes Protein, das zu 88 % identisch mit Ratten-IRS-1 ist. Die 14 potentiellen Tyrosinphosphorylierungsstellen, die im Ratten-IRS-1 bereits beschrieben wurden, zeigen sich vollständig im humanen IRS-1 wieder (Araki et al. 1993). Zusammenfassend aus der Sequenzanalyse und den Ergebnissen der eigenen durchgeführten Tyrosinphosphorylierungen des

humanen IRS-1 ergibt sich also, dass die Kombination aus dem Insulinrezeptor der Ratte und den Fusionsproteinen aus dem humanen IRS-1 möglich ist.

4.2. Phosphorylierungsexperimente

4.2.1. Tyrosinphosphorylierung

Detaillierte Untersuchungen des IRS-1 unter Insulinstimulation zeigten acht Tyrosine, die durch den aktivierten Insulinrezeptor phosphoryliert werden, darunter die Tyrosine 608, 628, 939 und 987, die als YMXM-Motive erscheinen. Die Methioninreste an Y+1 und Y+3 -Position unterstützen die Phosphorylierung durch den Insulinrezeptor (Shoelson et al. 1992). Auch andere Tyrosine werden phosphoryliert: Y460ICM, Y895VNI, Y1172IDL und Y1222ASI (Sun et al. 1993). Hinzu kommen dreizehn weitere Tyrosine, die ebenfalls durch den Insulinrezeptor oder durch andere Tyrosinkinase phosphoryliert werden könnten, da sie in der Nähe eines Aspartats oder eines Glutamats liegen (White, 1997).

In Bezug auf die beiden IRS-1-Fusionsproteine Wildtyp und ⁹⁷²Gly->Arg-Mutante zeigt dies, dass sie zwei der wichtigsten Tyrosinphosphorylierungsstellen des Insulinrezeptors enthalten. Wie die Motive um Y608, Y628 dienen auch die in den Fusionsproteinen enthaltenen Y939 und Y987 zur Weiterleitung des Insulinsignals. Es sind im phosphorylierten Zustand die Interaktionsstellen für p85, der regulatorischen Untereinheit der PI3-Kinase (Ruderman et al. 1990, Myers et al. 1992).

Besondere Beachtung gilt hier der Mutation der Aminosäure in Position 972. Durch den Austausch eines Glycins gegen ein Arginin ergibt sich eine erhebliche Ladungsverschiebung, positioniert genau zwischen den beiden p85-Bindungsstellen. Dadurch könnte es entweder zu einer sterischen Behinderung der Interaktion zwischen IRS-1 und der p85-Untereinheit der PI3-Kinase kommen. Andererseits könnte die Interaktion durch eine Störung der Tyrosinphosphorylierung durch den Insulinrezeptor beeinträchtigt sein. Damit wäre auf molekularer Basis im *in vitro*-Versuchsansatz eine mögliche Ursache für die erhöhte Insulinresistenz und verminderte Glukosetoleranz der Träger der ⁹⁷²Gly->Arg-Mutation gefunden (Almind et al. 1993, Imai et al. 1994, Clausen et al. 1995, Ura et al. 1996, Zhang et al. 1996, Yamada et al. 1998, Baroni et al. 2001).

Übereinstimmend mit ersten Versuchen durch Herrn Dr. Z. Ran (AG Eckel, DDFI) konnte ein Unterschied in der Intensität der Tyrosinphosphorylierung zwischen Mutante- und Wildtypprotein nicht nachgewiesen werden. Dabei wurden verschiedene Faktoren des Versuchssystems variiert. Als optimal erwiesen sich pro Ansatz je 1 µg Fusionsprotein und 5 µg WGA-Material, stimuliert durch Insulin in einer Konzentration von 10⁻⁷ mol/l. Die Aktivierung erfolgte mit 50 µM ATP. Auch bei den variierten Ansätzen konnten keine Unterschiede gefunden werden. Gleiche Beobachtungen machten Yoshimura et al. 1997, als sie den Phosphorylierungsstatus von Wildtyp- und Mutanteprotein nach Insulinstimulation im 32D (IR)-Zellsystem untersuchten (s.u.).

Demgegenüber stehen die Beobachtungen verschiedener Arbeitsgruppen in modifizierten Zellkultursystemen. Im 32D (IR)-Zellsystem wird der Insulinrezeptor überexprimiert, K. Almind et al. transfizierten 1996 eben diese Zellen mit humanem Wildtyp-IRS-1 sowie mit Mutante ⁹⁷²Gly->Arg-IRS-1. Im Vergleich war in den Mutante-Zellen die Bindung an p85a um 25 % reduziert, die IRS-1-assoziierte PI3-Kinase-Aktivität sank um 36 %. Mit dem gleichen Zellsystem arbeiteten Yoshimura et al. 1997, sie beobachteten 43 % Rückgang der Bindung sowie 39 % Reduktion der PI3-Kinase-Aktivität.

Auch in RIN-b-Zellen wurde Wt-IRS-1 und ⁹⁷²Gly->Arg-IRS-1 überexprimiert. Durch die Anhäufung von IRS-1-Protein kam es bei den Wt-IRS-1-Zellen zu einem Anstieg der glukose- oder insulinstimulierten Tyrosinphosphorylierung. Dieser Effekt konnte mit dem mutierten IRS-1-Protein nicht erreicht werden. Stattdessen sank in letzterem System ebenfalls die PI3-Kinase-Bindung. M. Frederici et al. untersuchten 2001 neun verschiedene Inselzellkulturen, drei von heterozygoten ⁹⁷²Gly->Arg-Trägern und sechs von Wildtypträgern. Vor der Stimulation war die PI3-Kinase-Aktivität um 17 % erniedrigt, nach Insulinstimulation um 36 %.

In L6 Skelettmuskelzellen wurden die beiden Proteine überexprimiert. Die Beobachtungen gleichen denen in den anderen Zellsystemen: Abnahme der PI3-Kinase-Aktivität, der Glukoseaufnahme, der Akt Phosphorylierung, sowie Zunahme der basalen Glykogensynthasekinase-3-Aktivität (Hribal et al. 2000) in ⁹⁷²Gly->Arg-IRS-1- L6-Muskelzellen im Vergleich zu jenen L6- Skelettmuskelzellen, in denen Wt-IRS-1 überexprimiert war.

Der exakte Mechanismus, der die Abnahme der PI3-Kinase-Aktivität bewirkt, bleibt unklar. Spekulationen gehen in zwei Richtungen: Es wird postuliert, dass die ⁹⁷²Gly->Arg-Mutation

einen Effekt auf die Tertiärstruktur des IRS-1 haben könnte, und/oder direkt die Assoziationsstelle moduliert. Dadurch wäre die p85a-Interaktion gestört. (Almind et al. 1996).

Zusammenfassend wäre es sicher interessant, die IRS-1/ p85a-Interaktion in vitro Versuch zu untersuchen, da auf diese Weise andere Einflüsse weitergehend ausgeschlossen werden können. Ein entsprechendes System für andere GST-IRS-1-Fusionsproteine ist in der Arbeitsgruppe etabliert (durch M. Sommerfeld).

Ein Unterschied bezüglich der Tyrosinphosphorylierung zwischen ⁹⁷²Gly->Arg-IRS-1-Protein und Wt-IRS-1-Protein konnte also nicht gezeigt werden.

4.2.2. Serin-/ Threoninphosphorylierung durch die PKC

Im Zusammenhang mit der Untersuchung der Träger der ⁹⁷²Gly->Arg-Mutation deutet sich aber ein anderer Aspekt an: die Assoziation zwischen Mutation, Übergewicht und Insulinresistenz. Heterozygote Träger mit Übergewicht zeigen eine niedrigere Insulinsensitivität als übergewichtige Nichtträger (Clausen et al. 1995). Eine andere Studie zeigte, dass das ⁹⁷²Gly->Arg-Allel bei Übergewichtigen häufiger vorkommt als bei Schlanken. Die Träger hatten einen höheren Body-Mass-Index, ein höheres Fasteninsulin, höhere Triglyzeridwerte und eine höhere Insulinresistenz als Übergewichtige ohne Mutation (Baroni et al. 2001).

Darüber hinaus ergibt sich eine Assoziation zwischen Übergewicht und der Entstehung des Typ 2- Diabetes, die genauen pathophysiologischen Zusammenhänge sind noch nicht geklärt. Es finden sich mehrere Hypothesen, die zurzeit Gegenstand intensiver Forschung sind. Hauptsächliches Augenmerk richtet sich dabei auf das Fettgewebe, da dieses bei Übergewicht vermehrt aufgebaut wird. Insbesondere untersucht wird die endokrinologische Funktion der Adipozyten.

Reguliert werden könnte die Ausschüttung durch β_3 -Adrenozeptoragonisten, da sich fast ausschließlich auf den Adipozyten β_3 -Rezeptoren finden. Appliziert man Nagern oder Probanden β_3 -Agonisten, so kommt es zu einer Erhöhung der Glukoseaufnahme in allen Fettzellen im Körper. Die hepatische Glukoneogenese wird unterdrückt (de Souza et al. 1997, Weyer et al. 1998). β_3 -Adrenozeptoragonisten könnten die Ausschüttung einiger Mediatoren bewirken.

Bekannt sind bislang vor allem $\text{TNF}\alpha$, Plasminogenaktivator-Inhibitor-1 (Homöostase), Angiotensinogen (Gefäßtonus) und Leptin, das eine zentrale Rolle im Energiehaushalt spielt.

Sie werden neben freien Fettsäuren und Glycerol stoffwechselwirksam ausgeschüttet (Kahn B. et al. 2000). Wie sie genau wirken und reguliert werden muss noch geklärt werden. Neueste Literatur lässt spekulieren, dass die Ursache hierbei möglicherweise polygener Natur ist.

In vitro stimuliert wurde in dieser Arbeit die Erhöhung verschiedener Proteinkinase-C-Isoformen (PKC) in der Membranfraktion verschiedener Körperzellen, die ebenfalls bei Übergewichtigen festgestellt wurde. Insbesondere die PKC- β ist im Westernblot der Membranfraktion von Muskelzellen übergewichtiger, insulinresistenter Patienten vermehrt nachzuweisen (Itani et al. 2000). Die Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe ergaben, dass das erhöhte PKC-Level zu einer vermehrten Serin-/ Threoninphosphorylierung des Insulinrezeptors führt, wodurch es zu einem Absinken des Insulinsignals kommt. Eine weitere Hypothese geht davon aus, dass die Serin-/ Threoninphosphorylierung des IRS-1 dazu führt, dass es vom Insulinrezeptor nicht mehr tyrosinphosphoryliert wird (Schmitz-Peiffer et al., 2000). Von dieser Hypothese geht auch die Fragestellung der vorgelegten Arbeit aus.

Zum Nachweis der Serin-/ Threoninphosphorylierung wurden die Fusionsproteine mit einer Mischung der konventionellen PKC-Isoformen α , β_1 , β_2 , γ inkubiert. Die Detektion des Serin-/ Threoninsignals erfolgte radioaktiv, in dem ^{33}P -ATP zur Phosphorylierung eingesetzt wurde. Die Versuchsansätze wurden im SDS- PAGE aufgetrennt, das Gel auf eine Fotoplatte aufgelegt. Es konnten deutliche Banden in Höhe von 50 kDa gezeigt werden.

Die Sequenzanalyse zeigt, dass es in den beiden Fusionsproteinen je fünfzehn Serine und sechs Threonine gibt. Sie liegen zum Teil in den sechs bekannten Serin-/ Threoninphosphorylierungsstellen, von denen wiederum zwei in unmittelbarer Nachbarschaft zur $^{972}\text{Gly}\rightarrow\text{Arg}$ -Mutation liegen.

Die Auswertung der Signale ergab auch bei der Serin-/ Threoninphosphorylierung keine Unterschiede zwischen Mutante und Wildtyp.

4.2.3. Effekt der Serin-/ Threoninphosphorylierung auf die Tyrosinphosphorylierung der Fusionsproteine

Nachdem sowohl bei der Tyrosinphosphorylierung durch den Insulinrezeptor als auch bei Serin-/ Threoninphosphorylierung durch die PKC α , β_1 , β_2 , γ keine Unterschiede zwischen den

beiden Fusionsproteinen Wildtyp und Mutante gefunden werden konnte, wurde zum Abschluss die nacheinander geschalteten Phosphorylierungen untersucht.

Dazu sollten die Proteine zunächst serinphosphoryliert und anschließend tyrosinphosphoryliert werden. Die Detektion sollte mit dem antiPhosphotyrosinantikörper RC20 erfolgen. Um sicherzustellen, dass der Insulinrezeptor nicht serin-/ threoninphosphoryliert wird, wurde die PKC mit Bisindolylmaleimid I gehemmt.

Der eindeutige Nachweis scheiterte bei diesem experimentellen Ansatz an zwei so nicht erwarteten Faktoren:

Überraschenderweise zeigte sich nach Inkubation mit RC20 ein Serin-/ Threoninphosphorylierungssignal in Höhe des Fusionsproteins. Dies war mehrfach reproduzierbar. Zwei verschiedene Ursachen kommen hierfür in Betracht: Entweder liegt eine Kreuzreaktivität des RC20 für Phosphoserin und/oder Phosphothreonin vor. In der Literatur ist diese Kreuzreaktivität nicht beschrieben. Anderenfalls könnte es sein, dass die PKC auch Tyrosin phosphoryliert, wofür sich bisher aber auch keine Literaturnachweise finden lassen.

Zudem zeigte sich bei der reinen Tyrosinphosphorylierung kein Signal. Vergleichende Untersuchungen wiesen das dem Puffer zugesetzte Kalzium als Ursache auf, da sonst nichts am System verändert wurde. Kalzium ist aber als Kofaktor für die PKC unerlässlich, eine vollständige Elimination des Kalziums zwischen den Versuchsschritten ist technisch nicht möglich. Komplexierung mit EGTA und EDTA konnte die Versuchsbedingungen nicht verbessern, es zeigte sich weiterhin kein Phosphotyrosinsignal. Behoben wurde das Problem durch die Zugabe von Manganchlorid. Zudem wurde das Signal noch um ein Vielfaches stärker im Vergleich zu den bisherigen Versuchen. Für weitere Experimente in diesem System würde sich somit anbieten, dem Phosphorylierungspuffer Manganchlorid zuzusetzen, um eine effektivere Tyrosinphosphorylierung zu erreichen.

Durch Zusatz des Manganchlorids zum Puffer und durch Anwendung der Phosphorylierungsmethode mittels radioaktiv markierten ³³P-ATPs konnten die abschließenden Untersuchungen schließlich durchgeführt werden.

Dazu wurde zunächst der Insulinrezeptor nicht radioaktiv autophosphoryliert. In einem parallelen Ansatz wurde die Serin-/ Threoninphosphorylierung der Fusionsproteine „Wildtyp“ beziehungsweise „Mutante“ durch die PKC, ebenfalls nicht radioaktiv, gestartet. Nach dreißig

Minuten wurde die Aktivität der PKC durch die Zugabe von 100 μ M Bisindolylmaleimid I gehemmt, um auszuschließen, dass der Insulinrezeptor ebenfalls durch die PKC phosphoryliert wird. Die serin-/ threoninphosphorylierten Proteine wurden nun mit dem Insulinrezeptor inkubiert. Das nun zugesetzte ATP war radioaktiv markiert. Das weitere Vorgehen, Stoppen der Reaktion, Kopplung an Beads, Auftrennung im SDS-PAGE, Silberfärbung und Einlesen im FujiImager erfolgte wie bei der reinen Serin-/ Threoninphosphorylierung.

Die Quantifizierung der Ergebnisse ergab einen signifikanten Rückgang der Tyrosinphosphorylierung. Da die Aktivität der PKC gehemmt wurde, bevor sie mit dem Insulinrezeptor in einen Versuchsansatz kam, ist der Rückgang des Phosphorylierungssignals auf die Serin-/ Threoninphosphorylierung der IRS-1-Fusionsproteine zurückzuführen. Im Gegensatz dazu steht die Annahme, die Reduktion der Tyrosinphosphorylierung sei auf die übermäßige Serin-/ Threoninphosphorylierung des Insulinrezeptors zurückzuführen (Itani et al. 2000). Andere Ergebnisse in unserer Arbeitsgruppe weisen aber ebenfalls darauf hin, dass die Phosphorylierung der IRS-Proteine der entscheidende Faktor ist, der zu einer Verminderung der Insulinantwort führt (persönliche Mitteilung durch M. Sommerfeld). Im Mittel wurde die Tyrosinphosphorylierung des Wildtypproteins um 48 %, die des Mutanteproteins um 40 % gehemmt.

Der Unterschied zwischen den beiden Proteinen ist nicht signifikant.

Damit zeigte sich auch im dritten Teil der Experimente kein Unterschied zwischen den beiden IRS-Proteinen „Mutante $^{972}\text{Gly}\rightarrow\text{Arg}$ “ Und „Wildtyp“.

Unabhängig von der PKC-Aktivität ist die PI3-Kinase Aktivität in Inselzellen von Mutationsträgern reduziert. Im Vergleich zu den Inselzellen von Nichtträgern ist sie im Basalzustand um 17 % niedriger, nach Insulinstimulation ist die PI3-Kinase-Aktivität 36 % geringer (Federici et al. 2001). In dem Zusammenhang erscheint es interessant, ob ähnliche Ergebnisse auf der Ebene der Fusionsproteine außerhalb des Zellsystems nachzuweisen sind. Dazu sollte die Interaktion der beiden Proteine im Vergleich untersucht werden, und zwar zum einen ohne und zum anderen mit vorheriger Inkubation mit der PKC.

In Übereinstimmung mit den hier dargestellten Beobachtungen, dass auf dem Signaltransduktionsweg des Insulinrezeptors keine Unterschiede zwischen dem $^{972}\text{Gly}\rightarrow\text{Arg}$ -IRS-1 und dem nicht veränderten IRS-1 bestehen, sind neuere Untersuchungen von Marchetti et al. Demnach ist die Insulinkonzentration in Inselzellen von Mutationsträgern verringert, es

finden sich vermehrt unreife Sekretionsgranula, reife Granula sind im Vergleich weniger vorhanden. Die physiologische Korrelation zwischen steigenden Blutzuckerspiegeln und einer vermehrten Insulinsekretion ist aufgehoben (Marchetti et al. 2002). Der Defekt wäre also im Signaltransduktionsweg der Blutglukose in β -Zellen zu suchen, in dem IRS-1 offensichtlich ebenfalls eine Schlüsselfunktion innehat. Mit diesen Beobachtungen ließen sich die erhöhten Blutglukosespiegel, die verminderte Insulinproduktion und die erhöhte Bereitschaft der Mutationsträger an Typ 2- Diabetes zu erkranken erklären.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass in den Experimenten der vorliegenden Arbeit kein Unterschied zwischen den beiden IRS-1-Varianten „Wildtyp“ und „Mutante $^{972}\text{Gly}\rightarrow\text{Arg}$ “ besteht. Das gilt sowohl für die alleinige Tyrosinphosphorylierung beider Fusionsproteine durch die IR- β -Untereinheit, als auch für die Serin-/ Threoninphosphorylierung durch die PKC-Isoformen α , β_1 , β_2 , γ . Auch bei der Nacheinanderschaltung beider Phosphorylierungsarten zeigt sich kein signifikanter Unterschied.

Zusammenfassung

Tyrosin- und Serinphosphorylierung zweier Varianten des Insulinrezeptorsubstrates-1: „Wildtyp“ und „Mutante Gly⁹⁷²->Arg“

In der vorgelegten Arbeit wurden mit dem pGEX-System zwei verschiedene Proteine der IRS-1, „Wildtyp“ und „Mutante 972Gly->Arg“ mit der Glutathion-S-Transferase fusioniert, um sie im Hinblick auf Unterschiede bezüglich ihrer Phosphorylierungseigenschaften zu untersuchen. Damit sollte im in vitro- Modell gezeigt werden, ob die in vivo mehrfach beschriebene Insulinresistenz der Merkmalsträger auf eine verminderte Tyrosinphosphorylierung des 972Gly->Arg-IRS-1 durch den Insulinrezeptor zurückzuführen ist. Der zweite Teil basiert auf der Beobachtung, dass Merkmalsträger zu Übergewicht, erhöhter Insulinresistenz und Typ 2-Diabetes neigen. Es ist bekannt, dass bei Übergewichtigen die PKC-Aktivität erhöht ist. Durch Inkubation der Fusionsproteine mit PKC wurde diese Stoffwechselsituation imitiert. Abschließend wurden beide Proteine erst serin-/ threoninphosphoryliert und danach tyrosinphosphoryliert, um nachzuweisen, dass die erhöhte PKC-Aktivität zu einem Rückgang der Tyrosinphosphorylierung und dadurch zu einer gestörten Insulinwirkung führt.

Die Versuche ergeben, dass im Phosphorylierungsverhalten kein Unterschied zwischen den beiden IRS-1-Varianten „Wildtyp“ und „Mutante 972Gly->Arg“ besteht. Das gilt sowohl für die alleinige Tyrosinphosphorylierung beider Fusionsproteine durch die IR- β -Untereinheit, als auch für die Serin-/ Threoninphosphorylierung durch die PKC-Isoformen α , β 1, β 2, γ . Auch bei der Nacheinanderschaltung beider Phosphorylierungsarten zeigt sich kein signifikanter Unterschied.

Daraus ist zu schließen, dass der in der Literatur beschriebene Rückgang der PI3-Kinase-Aktivität nicht auf einen im Vergleich zum Wildtyp-IRS-1 veränderten Phosphorylierungsstatus des IRS-1 mit der 972Gly->Arg-Mutation zurückzuführen ist. Weiterführend wären Studien zur Interaktion zwischen der p85 α -Untereinheit der PI3-Kinase und den durch beide Phosphorylierungsschritte präparierten IRS-1-Proteinen sinnvoll. Durch die gute Kontrollierbarkeit der zugeführten Versuchsbestandteile könnten Wirkungen anderer Enzyme ausgeschlossen werden.

Die Serin-/ Threoninphosphorylierung durch die PKC ist bei beiden IRS-Proteinen nicht signifikant unterschiedlich. Deshalb muss an dieser Stelle festgestellt werden, dass die Verbindung zwischen Übergewicht der Merkmalsträger und deren Neigung zu erhöhter Insulinresistenz nicht durch eine veränderte Serin-/ Threoninphosphorylierung des 972Gly->Arg-IRS-1 zu erklären ist. Die grundsätzlich erhöhte PKC-Aktivität bei Übergewicht hat keinen speziellen Einfluss bei Merkmalsträgern, so dass andere Modelle zur Erklärung der Insulinresistenz rekrutiert werden müssen.

Bestätigt wird der Rückgang der Tyrosinphosphorylierung durch vorherige Serin-/ Threoninphosphorylierung beider IRS-1-Proteine durch die PKC-Isoformen α , β 1, β 2, γ . Der Rückgang ist auf die Serin-/ Threoninphosphorylierung des IRS-1 zurückzuführen, da die PKC durch Bisindolylmaleimid I gehemmt wurde, bevor sie mit dem Insulinrezeptor zusammenkam. Damit wird bestätigt, dass die Reduktion der Tyrosinphosphorylierung auf die Serin-/ Threoninphosphorylierung des IRS-1 und nicht auf die des Insulinrezeptors zurückzuführen ist.

7. Abkürzungsverzeichnis

AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
AS	Aminosäure
BIM	Bisindolylmaleimid I
BMI	Body-Mass-Index
BSA	Bovines Serumalbumin
DAG	Diacylglycerol
DTT	Dithiotreitol
g	Erdbeschleunigung; $9,81 \text{ m/s}^2$
Gab	Grb-2 associated binder
GRB-2	Growth factor binding protein-2
GST	Glutathion-S-Transferase
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperacin-N-Ethansulfonsäure
HRP	Horsraddish peroxidase
IA2-A	Tyrosin Phosphatase 2A
IAA	Insulinautoantikörper
ICA	Autoantikörper gegen Inselzellzytoplasma
IDDM	Insulin-dependent Diabetes
IGF	Insulin-like growth factor
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactosid
IRS	Insulinrezeptorsubstrat 1
kDa	Kilodalton
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEK	MAPK-Kinase
MEKK	MAPK-Kinase-Kinase
mRNA	Messenger RNA
Na ₃ VO ₄	Natriumvanadat
NIDDM	Non-insulin-dependent Diabetes
p62dok	60 kDa Gap-associated protein
PAGE	Polyacrylgelelektrophorese
PH	Pleckstrin homology
PI3-Kinase	Phosphoinositid-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PTB	Phosphotyrosin-bindend
Raf	Onkogen
RAS	Renin-Angiotensin-System
SHB	Src homology 2 domain protein
Shc	SH2-containing sequence
SHP2	SH2-domain containing protein tyrosine phosphatase-2
Sos	Son of sevenless

7. Literaturverzeichnis

Agati J. M., Yeagley D., Quinn P. G.

Assessment of the roles of mitogen-activated protein kinase., phosphatidylinositol 3-kinase., protein kinase B and protein kinase C in insulin inhibition of cAMP-induced phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription
J. Biol. Chem. 273:18751-18759, 1998

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

Amino acid polymorphisms of insulin receptor substrate-1 in non-insulin-dependent diabetes mellitus
Lancet 342: 828-832, 1993

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

A common amino acid polymorphism in insulin receptor substrate-1 causes impaired insulin signaling
J. Clin. Invest. 97: 2569-2575, 1996

Almind K., Doria A., Kahn C. R.

Putting the genes for type II diabetes on the map
Nature medicine Vol. 7, No. 3: 277-279, 2001

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

Human skeletal muscle insulin receptor substrate-1: Characterization of the cDNA, gene and chromosomal localization
Diabetes 42: 1041-1054, 1993

Avignon A., Yamada K., Zhou X., Spencer B., Cardona O., Saba-Siddique S., Galloway L., Standaert M. L., Farese R. V.

Chronic activation of protein kinase C in soleus muscles and other tissues of insulin-resistant type II diabetic Goto-Kakizaki (GK), obese/aged, and obese/Zucker rats. A mechanism for inhibiting glycogen synthesis
Diabetes 45(10):1396-404, 1996

Baroni M. G., Arca M., Sentinelli F., Buzzetti R., Capici F., Lovari S., Vitale M., Di Mario U.

The G972R variant of the insulin receptor substrate-1 (IRS-1) gene, body fat distribution and insulin resistance
Diabetologia 44: 367-372, 2001

Bell R. M., Burns D. J.

Lipid activation of protein kinase C
J. Biol. Chem. 15:266(8):4661-4, 1991

Bruning J. C., Winnay J., Cheatham B., Kahn C. R.

Differential signaling by insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and IRS-2 in IRS-1-deficient cells
Mol. Cell Biol. 17:1513-1521, 1997

Burant C. F., Treutelaar M. K., Landreth G. E., Buse M. G.

Phosphorylation of insulin receptors solubilized from rat skeletal muscle
Diabetes 33(7):704-8, 1984

Clarke J. F., Young P. W., Yonezawa K., Kasuga M., Holman G. D.

Inhibition of the translocation of GLUT1 and GLUT4 in 3T3-L1 cells by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor wortmannin
Biochem. J., 300:631-635, 1994

Clausen J. O., Hansen T., Bjørbaek C.; Echwald S. M., Urhammer S. A., Rasmussen S., Andersen C. B., Hansen L., Almind K., Haralddóttir J., Borch-Johnsen K., Perdersen O.

Insulin resistance: Interactions between obesity and a common variant of insulin receptor substrate-1
Lancet 346: 397-402, 1995

Colditz G. A.

A prospective assessment of moderate alcohol intake and major chronic diseases
Ann. Epidemiol. 1(2):167-77, 1990

Coussens L., Parker P. J., Rhee L., Yang-Feng T. L., Chen E., Waterfield M. D., Francke U., Ullrich A.

Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signaling pathways
Science 22;233(4766):859-66, 1986

De Fronzo R. A.

Lilly lecture 1987. The triumvirate: Beta-cell, muscle, liver: a collision responsible for NIDDM
Diabetes 37: 667-687, 1988

de Souza C. J., Hirshman M. F., Horton E. S.

CL-316-243, a beta3-specific adrenoceptor agonist, enhances insulin-stimulated glucose disposal in nonobese rats
Diabetes 46(8):1257-63, 1997

Dhand R., Hara K., Hiles I., Bax B., Gout I., Panayotou G., Fry M. J., Yonezawa K., Kasuga M., Waterfield M. D.

PI 3-kinase: structural and functional analysis of intersubunit interactions
EMBOJ, 13:511-521, 1994

Dickens M., Svitek C. A., Culbert A. A., O'Brien R. M., Tavaré J. M.

Central role for phosphatidylinositol 3-kinase in the repression of glucose-6-phosphatase gene transcription by insulin
J. Biol. Chem. 273:20144-20149, 1998

Ehrmann D. A., Tang X., Yoshiuchi I., Cox N.J., Bell G. I.

Relationship of insulin receptor substrate-1 and -2 genotypes to phenotypic features of polycystic ovary syndrome.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 87(9):4297-300, 2002

Ertunc D., Tok. E.C., Aktas A., Erdal E. M., Dilek S.

The importance of IRS-1 Gly972Arg polymorphism in evaluating the response to metformin treatment in polycystic ovary syndrome
Hum reprod. 2005 Jan 21

Federici M., Hribal M. L., Ranalli M., Marselli L., Porzio O., Lauro D., Borboni P., Lauro R., Marchetti P., Melino G., Sesti G.

The common Arg972 polymorphism in insulin receptor substrate-1 causes apoptosis of human pancreatic islets
FASEB 15: 22-24, 2001

Federici M., Pandolfi A., De Filippis E. A., Pellegrini G., Menghini R., Lauro D., Cardellini M., Romano M., Sesti G., Lauro R., Consoli A.

G972R IRS-1 variant impairs insulin regulation of endothelial nitric oxide synthase in cultured human endothelial cells
Circulation. 2004; 109: 399-405.

- Ferrannini E., Natali A., Bell P., Cavallo-Perin P., Lalic N., Mingrone G.**
Insulin resistance and hypersecretion in obesity. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR).
J. Clin. Invest. 100(5):1166-73, 1997
- Florez J. C., Sjogren M., Burt N., Orho-Melander M., Schayer S., Sun M., Almgren P., Lindblad U., Tuomi T., Gaudet D., Hudson T. J., Daly M. J., Ardlie K. G., Hirschhorn J. N., Altshuler D., Groop L.**
Association testing in 9,000 people fails to confirm the association of the insulin receptor substrate-1 G972R polymorphism with type 2 diabetes
Diabetes 2004 Dec., 53 (12): 3313-8
- Ginsberg H. N.**
Insulin resistance and cardiovascular disease
J. Clin. Invest. 106: 453-458, 2000
- Fauci A.S., Braunwald E., Isselbacher K.J., Wilson J.D., Martin J.B., Kasper D.L., Hauser S.L., Longo D.L.**
Harrison's Principles of internal Medicine, Vol. 2
McGraw-Hill Companies, ISBN 0-07-020293-1
- Hauner H., Köster I., von Ferber L.**
Diabetesprävalenz in Deutschland
Dtsch med Wochenschr 2003; 128: 2632-2638
- Hitman G.A., Hawrami K., McCarthy M.I., Viswanathan M., Snehalatha C., Ramachandran A., Tuomilehto J., Tuomilehto-Wolf E., Nissinen A., Pedersen O.**
Insulin receptor substrate-1 gene mutations in NIDDM; implications for the study of polygenic disease
Diabetologia 38: 481-486, 1995
- Hözl B., Iglseder B., Stadlmayr A., Hedegger M., Moré E., Reiter R., Sandhofer F., Paulweber B.**
Intima media thickness of carotid arteries is reduced in heterozygous carriers of the Gly972Arg variant in the insulin receptor substrate-1 gene
Eur. J. Clin. Invest. 33: 110-116, 2003
- Holgado-Madruga M., Emlet D. R., Moscatello D. K., Godwin A. K., Wong A. J.**
A Grb2-associated docking protein in EGF- and insulin-receptor signalling
Nature 379: 560-563, 1996
- Hosomi Y., Shii K., Ogawa W., Matsuba H., Yoshida M., Okada Y., Yokono K., Kasuga M., Baba S., Roth R. A.**
Characterization of a 60-kilodalton substrate of the insulin receptor kinase.
J. Biol. Chem. 269:11498-11502, 1994
- Hribal M. L., Federici M., Porzio O., Lauro D., Borboni P., Accili D., Lauro R., Sesti G.**
The Gly->Arg972 amino acid polymorphism in insulin receptor substrate-1 affects glucose metabolism in skeletal muscle cells
J. Clin. Endocrinol. Metab. 85: 2004-2013, 2000
- Hu P., Mondino A., Skolnik E. Y., Schlessinger J.**
Cloning of a novel ubiquitously expressed human phosphatidylinositol 3-kinase and identification of its binding site on p85
Mol. Cell. Biol. 13:7677-7688, 1993
- Imai Y., Fusco A., Suzuki Y., Lesniak M. A., D'Alfonso R., Sesti G., Bertoli A., Lauro R., Accili D., Taylor S. I.**
Variant sequences of insulin receptor substrate-1 in patients with Noninsulin-Dependent Diabetes Mellitus
J. Clin. Endocrinol. Metab. 79: 1655-1658, 1994

Imai Y., Philippe N., Sesti G., Accili D., Taylor S. I.

Expression of variant forms of insulin receptor substrate-1 identified in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus
J. Clin. Endocrinol. Metab. 82: 4201-4207

Itani S. I., Zhou Q., Pories W. J., MacDonald K. G., Dohm G. L.

Involvement of protein kinase C in human skeletal insulin resistance and obesity
Diabetes 48: 1353-1358, 2000

Jhun B. H., Rose D. W., Seely B.L., Rameh L., Cantley L., Saltiel A. R., Olefsky J. M.

Microinjection of the SH2 domain of the 85-kilodalton subunit of phosphatidylinositol 3-kinase inhibits insulin-induced DNA synthesis and c-fos expression.
Mol Cell Biol. 14(11):7466-75, 1994

Kaburagi Y., Yamamoto-Honda R., Tobe K., Ueki K., Yachi M., Akanuma Y., Stephens R. M., Kaplan D., Yazaki Y., Kadowaki T.

The role of the NPXY motif in the insulin receptor in tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and Shc.
Endocrinology 136: 3437-3443, 1995

Kadowaki T.

Insights into insulin resistance and type 2 diabetes from knockout mouse models
J. Clin. Invest. 106: 459-465, 2000

Kahn B. B., Flier J. S.

Obesity and insulin resistance
J. Clin. Invest. 106: 473-480, 2000

Kasuga M., Fujita-Yamaguchi Y., Blithe D. L., Kahn C. R.

Tyrosine-specific protein kinase activity is associated with the purified insulin receptor.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 80(8):2137-41, 1983

Kotani K., Yonezawa K., Hara K., Ueda H., Kitamura Y., Sakaue H., Ando A., Chavanieu A., Calas B., Grigorescu F., et al.

Involvement of phosphoinositide 3-kinase in insulin- or IGF-1-induced membrane ruffling.
EMBO J. 15;13(10):2313-21, 1994

Kriska A. M., LaPorte R. E., Pettitt D. J., Charles M. A., Nelson R. G., Kuller L. H., Bennett P. H., Knowler W. C.

The association of physical activity with obesity, fat distribution and glucose intolerance in Pima Indians.
Diabetologia 36(9):863-9, 1993

Krook A., O'Rahilly S.

Mutant insulin receptors in syndromes of insulin resistance.
*Baillieres Clin. Endocrinol. Metab. Jan;*10(1):97-122, 1996

Lavan B. E., Fantin V. R., Chang E. T., Lane W. S., Keller S. R., Lienhard G. E.

A novel 160-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated embryonic kidney cells is a new member of the insulin receptor substrate family.
J. Biol. Chem. 272:21403-21407, 1997

Lavan B. E., Lane W. S., Lienhard G. E.

The 60-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated adipocytes is a new member of the insulin receptor substrate family.
J. Biol. Chem. 272: 11439-11443, 1997

Le N. M., Kohanski R. A., Wang L.-H., Sadowski H. B.

Dual mechanism of signal transducer and activator of transcription 5 activation by the insulin receptor
Mol. Endocrinol. 16(12): 2764-2779, 2002

Le Fur S., Le Stunff C., Bougnères P.

Increased insulin resistance in obese children who have both 972 IRS-1 and 1057 IRS-2 polymorphism
Diabetes 51 (Suppl. 3): S304-307, 2002

Lillioja S., Bogardus C.

Obesity and insulin resistance: lessons learned from the Pima Indians
Diabetes Metab Rev. 4(5):517-40, 1988

Marchetti P., Lupi R., Federici M., Marselli L., Masini M., Boggi U., del Guerra S., Patanè G., Piro S., Anello M., Bergamini E., Purrello F., Lauro R., Mosca F., Sesti G., del Prato S.

Insulin secretory function is impaired in isolated human islets carrying the Gly972-> Arg IRS-1 polymorphism

Diabetes 51: 1419-1424, 2002

McGettrick A. J., Feener E. P., Kahn C. R.

Human insulin receptor substrate-1 (IRS-1) polymorphism G972R causes IRS-1 to associate with the insulin receptor and inhibit receptor autophosphorylation

J. Biol. Chem. 2005 Feb 25 280(8): 6441-6

McIlroy J., Chen D., Wjasow C., Michaeli T., Backer J. M.

Specific activation of p85-p110 phosphatidylinositol 3'-kinase stimulates DNA synthesis by ras- and p70 S6 kinase-dependent pathways

Mol. Cell. Biol. 17:248-255, 1997

Mendez R., Kollmorgen G., White M. F., Rhoads R. E.

Requirement of protein kinase C zeta for stimulation of protein synthesis by insulin.

Mol. Cell. Biol. 17:5184-5192, 1997

Milarski K. L.; Lazar D. F., Wiese R. J., Saltiel A. R.

Detection of a 60 kDa tyrosine-phosphorylated protein in insulin-stimulated hepatoma cells that associates with the SH2 domain of phosphatidylinositol 3-kinase.

Biochem. J.: 308:579-583, 1995

Myers M. G. jr., Backer J. M., Sun X. J., Shoelson S., Hu P., Schlessinger J., Yoakim M., Schaffhausen B., White M. F.

IRS-1 activates phosphatidylinositol 3'-kinase by associating with src homology 2 domains of p85.

Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 89(21):10350-4, 1992

Nave B. T., Siddle K., Shepherd P. R.

Phorbol esters stimulate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate production in 3T3-L1 adipocytes: implications for stimulation of glucose transport.

Biochem. J. 318:203-205, 1996

Newton A. C.

Protein kinase C. Seeing two domains.

Curr. Biol. 5(9):973-6, 1995

Nishizuka Y.

Studies and perspectives of protein kinase C.

Science 18;233(4761):305-12, 1986

Nishizuka Y., Nakamura S.

Lipid mediators and protein kinase C for intracellular signalling.

Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. Suppl. 22(1):S. 202-3, 1995

- 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
- Pan DA., Lillioja S., Kriketos A. D., Milner M. R., Baur L. A., Bogardus C., Jenkins A. B., Storlien L. H.**
Skeletal muscle triglyceride levels are inversely related to insulin action.
Diabetes 46(6):983-8, 1997
- Pessin J. E., Saltiel A. R.**
Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance
J. Clin. Invest. 106: 165-169, 2000
- Porzio O., Federici M., Hribal M. L., Lauro D., Accili D., Lauro R., Borboni P., Sesti G.**
The Gly972-> Arg amino acid polymorphism in IRS-1 impairs insulin secretion in pancreatic β -cells
J. Clin. Invest. 104: 357-364, 1999
- Previs S. F., Withers D., Ren J.-M., White M. F., Shulman G. I.**
Contrasting effects of IRS-1 versus IRS-2 gene disruption on carbohydrate and lipid metabolism in vivo
J. Biol. Chem. 275: 38990-94, 2000
- Qu X., Seale J. P., Donnelly R.**
Tissue and isoform-selective activation of protein kinase C in insulin-resistant obese Zucker rats – effects of feeding
J. Endocrin. 162: 207-214, 1999
- Reaven G. M.**
Role of insulin resistance in human disease (syndrome X): an expanded definition
Annu. Rev. Med. 44: 121-131, 1993
- Ruderman N. B., Kapeller R., White M. F., Cantley LC.**
Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by insulin.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 87(4):1411-5, 1990
- Saltiel A. R.**
The molecular and physiological basis of insulin resistance: emerging implications for metabolic and cardiovascular diseases
J. Clin. Invest. 106: 163-164, 2000
- Schmitz-Peiffer C.**
Signalling aspects of insulin resistance in skeletal muscle: mechanisms induced by lipid oversupply
Cell Signal 12 (9-10): 583-594, 2000
- Schmitz-Peiffer C.**
Protein kinase C and lipid-induced insulin resistance in skeletal muscle.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 967:146-57, 2002
- Schreyer S., Ledwig D., Rakatzi I., Klötting I. and Eckel J.**
Insulin Receptor Substrate-4 Is Expressed in Muscle Tissue without Acting as a Substrate for the Insulin Receptor
Endocrinology 144(4):1211-8, 2003
- Seidell J.C.**
Obesity, insulin resistance and diabetes — a worldwide epidemic
Br J Nutr. 2000 Mar;83 Suppl 1:S5-8. Review.

- Sesti G, Federici M., Hribal M. L., Lauro D., Sbraccia P., Lauro R.**
Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders
FASEB J. 15: 2099-2111, 2002
- Sesti G., Marini M. A., Cardellini M., Sciacqua A., Frontoni S., Andreozzi F., Irace C., Lauro D., Gnasso A., Perticone F., Lauro R.**
The Arg⁹⁷² variant in insulin receptor substrate-1 is associated with an increased risk of secondary failure to sulfonylurea in patient with type 2 diabetes
Diabetes Care 27: 1394-1398, 2004
- Shoelson S. E.**
SH2 and PTB domain interactions in tyrosine kinase signal transduction.
Curr. Opin. Chem. Biol. 1(2):227-34, Review, 1997
- Shulman G. I.**
Cellular mechanisms of insulin resistance
J. Clin. Invest. 106: 171-176, 2000
- Smith D. B., Johnson K. S.**
Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase.
Gene 15: 67(1):31-40, 1988
- Smith-Hall J., Pons S., Patti M. E., Burks D. J., Yenush L., Sun X. J., Kahn C. R., White M. F.**
The 60 kDa insulin receptor substrate functions like an IRS protein (pp60IRS3) in adipose cells.
Biochemistry 36: 8304-8310, 1997
- Stern M. P.**
Strategies and prospects for finding insulin resistance genes
J. Clin. Invest. 106: 323-327, 2000
- Stumvoll M., Fritsche A., Volk A., Stefan N., Madaus A., Maerker E., Teigeler A., Koch M., Machicao F., Häring H.**
The Gly972Arg polymorphism in the insulin receptor substrate-1 gene contributes to the variation in insulin secretion in normal glucose-tolerant humans
Diabetes 50: 882-885, 2001
- Stumvoll M., Stefan N., Fritsche A., Madaus A., Tschritter O., Koch M., Machicao F., Häring H.**
Interaction effect between common polymorphisms in PPAR γ 2 (Pro12Ala) and insulin receptor substrate 1 (Gly972Arg) on insulin sensitivity
J. mol. Med. 80:33-38, 2002
- Sun X. J., Rothenberg P. L., Kahn C. R., Backer J. M., Araki E., Wilden P. A., Cahill D. A., Goldstein B. J., White M. F.**
Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein.
Nature 352: 73-77, 1991
- Sun X. J., Wang L.-M., Zhang Y., Yenush L., Myers Jr. M. G., Glasheen E., Lane W. S., Pierce J. H., White M. F.**
Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling.
Nature 377: 173-177, 1995
- t'Hart L. M., Nijpels G., Dekker J. M., Maassen J. A., Heine R. J., van Haefen T. W.**
Variations in insulin secretion in carriers of variants in IRS-1 and -2
Diabetes 51, 884-887, 2002
- Taha C., Klip A.**
The insulin signaling pathway (Topical Review)
J. Membrane Biol. 169: 1-12, 1999

Torqvist H. E., Pierce M. W., Frackelton. A. R., Nemenhoff R. A., Avruch J.

Identification of Insulin receptor tyrosine residues autophosphorylated in vitro
Biochem J. 262 No. 21: 10212-10219, 1987

Tsakiridis T, Vranic M., Klip A.

Phosphatidylinositol 3-kinase and the actin network are not required for the stimulation of glucose transport caused by mitochondrial uncoupling: comparison with insulin action.
Biochem J. 309 (Pt 1):1-5, 1995

Tsakiridis T., McDowell H. E., Walker T., Downes C. P., Hundal H. S., Vranic M., Klip A

Multiple roles of phosphatidylinositol 3-kinase in regulation of glucose transport, amino acid transport, and glucose transporters in L6 skeletal muscle cells.
Endocrinology 136:4315-4322, 1995

Ura S., Araki E., Kishikawa H., Shirotani T., Todaka M., Isami S., Shimoda S., Yoshimura R., Matsuda K., Motoyoshi S., Miyamura N., Kahn C. R., Shirichi M.

Molecular scanning of the insulin receptor substrate-1 (IRS-1) gene in Japanese patients with NIDDM: identification of five novel polymorphisms
Diabetologia 39: 600-608, 1996

Van Obberghen E., Kasuga M., LeCam A., Itin A., Hedo J.-A., Harrison L. C.

Biosynthetic labeling of insulin receptor: studies of subunits in cultured human IM-9 lymphocytes.
Proc. Natl. Acad. Sci. 78:1052-1056, 1981

Vanhaesebroeck B., Leever S. J., Panayotou G., Waterfield M. D.

Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers.
Trends. Biochem. Sci. 22:267-272, 1997

Vanhaesebroeck B., Welman M. J., Kotani K., Stein R., Warne P. H., Zvelebil M. J., Higashi K., Volinia S., Downward J., Waterfield M. D.

P110delta, a novel phosphoinositide 3-kinase in leukocytes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94(9): 4330-4335, 1997

Virkamäki 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

Warram J. H., Martin B. C., Krolewski A. S., Soeldner J. S., Kahn C. R.

Slow glucose removal rate and hyperinsulinemia precede the development of type II diabetes in the offspring of diabetic parents
Ann. Intern. Med. 113(12):909-15, 1990

Weyer C., Tataranni P. A., Snitker S., Danforth E. jr., Ravussin E.

Increase in insulin action and fat oxidation after treatment with CL 316,243, a highly selective beta3-adrenoceptor agonist in humans.
Diabetes 47(10):1555-61, 1998

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

Insulin rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of a Mr-185,000 protein in intact cells
Nature 318:183-186, 1985

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(1-2):3-11, 1998

Wick K. R., Werner E. D., Langlais P., Ramos F. J., Dong L.Q., Shoelson S. E., Liu F.
Grb 10 inhibits insulin-stimulated insulin receptor substrate (IRS)-phosphatidylinositol 3-kinase/ Akt signaling pathway by disrupting the association of IRS-1/ IRS-2 with the insulin receptor
J. Biol. Chem. 278 (10): 8460-8467, 2003

Winder W. W., Hardie D. G.
AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes.
Am. J. Physiol. 277(1 Pt 1):E1-10, 1999

Wolff, Weihrauch
Internistische Therapie 1004- 2005
Elsevier Urban und Fischer, ISBN 3-437-23181-2

Yamanashi Y., Baltimore D.
The effects of wortmannin on rat skeletal muscle. Dissociation of signaling pathways for insulin- and contraction-activated hexose transport.
Cell 88: 205-211, 1997

Yamanda K., Yuan X., Ishiyama S., Shoji S., Kohno S., Koyama K.-I., Koyanagi A., Koyama W., Nonaka K.
Codon 972 polymorphism of the insulin receptor substrate-1 gene in impaired glucose tolerance and late-onset NIDDM
Diabetes Care 21: 753-756, 1998

Yamauchi T., Tobe K., Tamemoto H., Ueki K., Kaburagi Y., Yamamoto-Honda R., Takahashi Y., Yoshizawa F., Aizawa S., Akanuma Y., Sonenberg N., Yazaki Y., Kadowaki T.
Insulin signalling and insulin actions in the muscles and livers of insulin-resistant, insulin receptor substrate 1-deficient mice.
Mol. Cell. Biol. 16(6):3074-84, 1996

Yeh J. I., Gulve E. A., Rameh L., Birnbaum M. J.
The effects of wortmannin on rat skeletal muscle. Dissociation of signaling pathways for insulin- and contraction-activated hexose transport.
J. Biol. Chem. 3;270(5), 1995

Yoshimura R., Araki E., Ura S., Todaka M., Tsuruzoe K., Furukawa N., Motoshima H., Yoshizato K., Kaneko K., Matsuda K., Kishikawa H., Shirichi M.
Impact of natural IRS-1 mutations on insulin signals
Mutations of IRS-1 in the PTB-Domain and near SH2 protein binding sites result in impaired function at different steps of IRS-1 signaling
Diabetes 46: 929-936, 1997

Zhang Y., Wat N., Stratton I. M., Warren-Perry M. G., Orho M., Groop L., Turner R. C.
UKPDS 19: heterogeneity in NIDDM: separate contributions of IRS-1 and beta 3-adrenergic-receptor mutations to insulin resistance and obesity respectively with no evidence for glycogen synthase gene mutations. UK Prospective Diabetes Study
Diabetologia 39: 1505-1511, 1996

Ich danke Herrn Prof. Dr. J. Eckel für die Überlassung des Themas und für seine konstruktive Begleitung in allen Phasen dieser Dissertation.

Ich danke Herrn Z. Ran für die Bereitstellung der Plasmide und besonders Herrn Mark R. Sommerfeld, ohne dessen außerordentlich engagierte Einarbeitung ich die Experimente nicht in dieser Form hätte durchführen können.

Ich danke allen aus der Arbeitsgruppe, die die Zeit im Diabetes Forschungsinstitut zu einem der schönsten Abschnitte meines Studiums gemacht haben.

Ich danke meinen Vorgesetzten Dr. K. Schappei und Dr. M. Paridon und meinen Kollegen für die Unterstützung in der letzten Phase.

Ich danke meiner Familie und allen anderen, die mich während der verschiedenen Phasen bei der Erstellung dieser Dissertation unterstützt haben. Besonders danke ich meiner Schwester Anna-Maria und meinem Vater, die die Arbeit Korrektur gelesen haben.

Ich danke meinem Ehemann Niko, dass er auf so viele Stunden knapp bemessener Freizeit mit mir verzichtet hat, damit ich die Dissertation vollenden konnte.

9. Lebenslauf

Name: Barbara Herzner
Geburtsdatum und -ort: 16.03.77 in Düsseldorf
Anschrift: Schloßstr. 6
46535 Dinslaken
Familienstand: verheiratet

Schulbildung:

08/ 1983- 07/ 1987 Grundschule in Düsseldorf
08/ 1987- 06/ 1996 Erzbischöfliches St.- Ursula- Gymnasium in Düsseldorf, Abschluss mit der Allgemeinen Hochschulreife

Freiwilliges Soziales Jahr

09/ 1996- 05/ 1997 Als Pflegekraft auf der allgemein- und viszeralchirurgischen Station im Marienhospital/ Düsseldorf

Studium

ab 10/ 1997 Studium der Humanmedizin an der Heinrich- Heine- Universität in Düsseldorf
08/ 1999 Ärztliche Vorprüfung
03/ 2001 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03/ 2003 Abschluss mit dem 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/ 2003 - 11/ 2004 Studium der Humanmedizin an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität in Bonn
10/ 2003 - 09/ 2004 Praktisches Jahr in der Asklepios- Kinderklinik St. Augustin und in der Zürcher Höhenklinik Wald, Schweiz
17.11.2004 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Famulaturen

09/ 2000 Im Rahmen der Promotion im biochemischen Labor im Deutschen Diabetesforschungsinstitut in Düsseldorf
09/ 2001 Gefäßchirurgie (Diakonissenkrankenhaus Speyer)
02- 03/ 2002 Ambulante HIV/ AIDS-Klinik (Mpumalanga, Südafrika)
09/ 2002 Institut für diagnostische Radiologie (Universitätsklinik Düsseldorf)

Promotion:

Seit 02/ 2000 Bei Herrn Prof. Dr. J. Eckel in der Abteilung Klinische Biochemie des Deutschen Diabetesforschungsinstitutes in Düsseldorf zum Thema "Tyrosin- und Serinphosphorylierung zweier Varianten des Insulinrezeptorsubstrates-1: „Wildtyp“ und „Mutante Gly972->Arg“

Seit 01/ 2005 Assistenzärztin in der Geriatrischen Klinik des Marienhospitals Wesel (CA Dr. Schappei)