

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

**Das Insulinrezeptorsubstrat-4 (IRS-4) in Skelett- und Herzmuskulatur:
Untersuchungen zur Expression und IRS-4-vermittelten
Signaltransduktion**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Sylvia Schreyer

2005

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. J. Eckel

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. F. Schliess

**Das Insulinrezeptorsubstrat-4 (IRS-4) in Skelett- und Herzmuskulatur:
Untersuchungen zur Expression und IRS-4-vermittelten
Signaltransduktion**

vorgelegt von Sylvia Schreyer

Die Insulinrezeptorsubstrate (IRS) representieren Schlüsselemente der Insulin – Signalkaskade. Das IRS-4 ist das zuletzt eindeutig charakterisierte Mitglied der IRS – Familie. Zwei weitere, IRS-5/DOK4 und IRS-6/DOK5, wurden 2003 beschrieben (Cai et al., 2003). Die *in vivo* Funktion des IRS-4 ist bisher noch nicht eindeutig geklärt. Im Gegensatz zu IRS-1 und IRS-2, weist IRS-4 eine eingeschränkte Gewebeexpression auf, und war bisher auf Proteinebene in noch keinem Gewebe nachgewiesen worden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Expression von IRS-4 in Muskelgeweben der Ratte und in humanen Skelettmuskelzellen zu analysieren, und dessen Beteiligung im Insulin – Signaling zu untersuchen. Mittels Immunoblot und Immunopräzipitation konnte eine spezifische Expression von IRS-4 im Soleus, und im Herzmuskelgewebe der Ratte nachgewiesen werden, sowie in menschlichen Skelettmuskelzellen. In Gastrocnemius und Quadriceps von Wistar und WOK.W Ratten war es jedoch nicht signifikant nachweisbar. Eine starke Down – Regulation von IRS-4 wurde in Soleus- und Herzmuskelgewebe von WOK.W Ratten beobachtet, einem Tiermodell mit nahezu vollständigem Metabolischen Syndrom.

In humanen Skelettmuskelzellen unterliegen sowohl IRS-1 als auch IRS-2 nach Insulinstimulus einer rapiden Tyrosin-Phosphorylierung, wohingegen IRS-4 weder nach Insulin-, noch nach IGF-1 Stimulierung Tyrosin-phosphoryliert wird. Jedoch konnte eine 2-fache Erhöhung der IRS-4 Tyrosin-Phosphorylierung in Myozyten nachgewiesen werden, die hyperosmotischem Stress ausgesetzt waren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das IRS-4 im Herz- und im Skelettmuskel fasertypspezifisch exprimiert wird.

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass IRS-4 in primären Muskelzellen nicht als Substrat des Insulin- oder des IGF-1 Rezeptors dient, wahrscheinlich ist es jedoch am nicht-Rezeptor Tyrosinkinase – Signaling beteiligt.

INHALTSVERZEICHNIS

| | Seite |
|---------------------------------------------------------------------|--------------|
| 1. EINLEITUNG | 1 |
| 1.1. Diabetes mellitus | 1 |
| 1.2. Signalweiterleitung des Insulin | 5 |
| 1.3. Skelettmuskulatur und Insulinresistenz | 8 |
| 1.4. Herzmuskulatur und Insulinresistenz | 13 |
| 1.5. Struktur, Expression und Funktion der Insulinrezeptorsubstrate | 14 |
| 1.6. Ziel dieser Arbeit | 18 |
| | |
| 2. MATERIAL UND METHODEN | 20 |
| 2.1. Material | 20 |
| 2.1.1. Tiere | 20 |
| 2.1.2. Verbrauchsmaterialien | 20 |
| 2.1.3. Antiseren | 21 |
| 2.1.4. Molekulargewichtsmarker | 22 |
| 2.1.5. Zellsysteme | 23 |
| 2.1.6. Zellkulturmedien | 23 |
| 2.1.7. Kit-Systeme | 23 |
| 2.1.8. Chemikalien | 24 |
| 2.1.9. Puffer | 25 |
| 2.1.10. Geräte | 26 |
| 2.2. Methoden | 27 |
| 2.2.1. Tier-OP und Gewebeentnahme | 27 |
| 2.2.2. Kultivierung humaner Skelettmuskelzellen | 27 |
| 2.2.3. Herstellung von Lysaten | 28 |
| 2.2.3.1. Lysis von Rattengewebe | 28 |
| 2.2.3.2. Stimulation und Lysis humaner Skelettmuskelzellen | 28 |
| 2.2.4. Proteinbestimmung | 29 |
| 2.2.5. Immunopräzipitation | 29 |
| 2.2.5.1. Immunopräzipitation von IRS-Proteinen | 29 |
| 2.2.5.2. Immunopräzipitation von Phosphotyrosinen mit PY20 | 30 |
| 2.2.6. Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen | 30 |
| 2.2.7. Proteintransfer auf Membranen | 30 |
| 2.2.8. Immunodetektion | 31 |

| | | |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.2.8.1. | Detektion mit verstärkter Chemilumineszenz (ECL) | 31 |
| 2.2.8.2. | Phospho-Tyrosinnachweis | 32 |
| 2.2.9. | Strippen der Blotmembran | 32 |
| 2.2.10. | Ponceau S – Färbung | 32 |
| 2.2.11. | Auswertung der Daten und Statistik | 33 |
| 3. | ERGEBNISSE | 34 |
| 3.1. | IRS-4 Expression in Muskelgeweben der Ratte | 34 |
| 3.1.1. | Wistar | 34 |
| 3.1.2. | WOK.W | 36 |
| 3.1.3. | Vergleich der Expression zwischen Wistar und WOK.W | 37 |
| 3.1.4. | Tyrosin-Phosphorylierung von IRS-4 nach Insulinstimulus | 41 |
| 3.2. | IRS-4 Expression in humanen Skelettmuskelzellen | 42 |
| 3.2.1. | Tyrosin-Phosphorylierung von IRS-4 nach Insulinstimulus - Insulin-Zeitreihe an IRS-4 Immunopräzipitaten aus humanen Skelettmuskelzellen | 43 |
| 3.2.2. | IRS-4 und IRS-2 Tyrosin-Phosphorylierung | 44 |
| 3.2.3. | Tyrosin-Phosphorylierung von IRS-4 nach Stimulierung der humanen Skelettmuskelzellen mit Insulin, IGF-1 und hyperosmolarem Stress | 45 |
| 4. | DISKUSSION | 48 |
| 4.1. | Expression und Funktion des Insulinrezeptorsubstrat-4 | 48 |
| 4.2. | Interaktionen der verschiedenen Insulinrezeptorsubstrate | 52 |
| 4.3. | IRS-4 Signaling nach Stimulation alternativer Signalwege | 54 |
| 5. | ZUSAMMENFASSUNG | 59 |
| 6. | LITERATURVERZEICHNIS | 60 |
| 7. | ANHANG | 76 |
| | Abkürzungen | 76 |
| | Abbildungsverzeichnis | 79 |
| | Danksagungen | 80 |
| | Curriculum Vitae | 81 |

1. EINLEITUNG

1.1. Diabetes mellitus

Der Diabetes mellitus, auch Zuckerkrankheit oder Zuckerharnruhr genannt, ist nach seiner Definition ein Sammelbegriff für verschiedene Formen von Glucosestoffwechselstörungen heterogener Ätiologien, deren gemeinsames Merkmal der relative oder absolute Insulinmangel, und somit ein chronisch erhöhter Blutzuckerspiegel (Hyperglycämie) ist (Pschyrembel, 1999). Dies resultiert aus Defekten der Insulinsekretion, der Insulinfunktion, oder beidem (American Diabetes Association, 2005). Es ist die häufigste endokrine Störung, in Deutschland sind etwa 5% der Bevölkerung an Diabetes mellitus erkrankt. Ätiologisch wird der Diabetes mellitus in vier grosse Gruppen unterteilt: I. Typ1 Diabetes – autoimmun oder idiopathisch, II. Typ2 Diabetes, III. andere spezifische Diabetesformen – hierunter fallen genetische Defekte der β -Zell-Funktion und der Insulinwirkung, Erkrankungen des exokrinen Pankreas, Endokrinopathien, Medikamenten-induzierte Diabetesformen, Infektionen, andere Formen von Immunerkrankungen, die zu Diabetes führen können, wie zum Beispiel durch Anti-Insulinrezeptor-Antikörper beim systemischen Lupus erythematoses, und andere genetische Syndrome, wie zum Beispiel das Down Syndrom, und IV. Gestationsdiabetes (American Diabetes Association, 2005). Insgesamt leiden nur 5-10% der Patienten an einem Typ1 Diabetes (Rinninger, Greten, 1998). Die überwiegende Mehrheit sind Typ2 Diabetiker.

Beim Typ1 Diabetes (früher insulin dependant diabetes mellitus, IDDM), dem Diabetes des Kindes- und Jugendalters, besteht ein nahezu absoluter Insulinmangel (Rinninger, Greten, 1998). Als Ursache gilt eine autoimmunologisch bedingte Zerstörung der insulinproduzierenden β -Zellen des Pankreas. (Harms, 1997; American Diabetes Association, 2005). Die häufige Assoziation mit bestimmten Antigenen des Histokompatibilitätskomplexes (spezifische HLA-DQ- und HLA-DR-Allelen) deutet auf eine genetische Prädisposition hin (Rinninger, Greten, 1998;

Harms, 1997). Desweiteren spielen Viren eine Rolle bei der Entstehung, zum Beispiel Mumps oder Coxsackie B₄, sowie das in der Kuhmilch enthaltene Rinderalbumin (Rinninger, Greten, 1998; Harms, 1997). Im Pankreas entsteht eine „Insulinitis“, das Immunsystem erkennt die β -Zellen als fremd, woraufhin Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen die Inselorgane infiltrieren. Die β -Zellen werden meist progredient über einen Zeitraum von mehreren Jahren durch zytotoxische Autoantikörper und zellvermittelte Immunreaktionen destruiert. Erst wenn mehr als 90% der pankreatischen β -Zellen zerstört sind, manifestiert sich klinisch eine Hyperglycämie als Ausdruck des Insulinmangels. Im Serum können schon einige Jahre vor der klinischen Diabetesmanifestation spezifische Autoantikörper nachweisbar sein, zum Beispiel zytoplasmatische Inselzellantikörper (ICA), Insulinautoantikörper (IAA), oder Glutamatdecarboxylaseantikörper (Anti-GAD₆₅) (Rinninger, Greten, 1998; American Diabetes Association, 2005).

Glucose ist das wichtigste energieliefernde Substrat, welches, durch den Insulinmangel bedingt, nicht mehr ausreichend in die Zellen aufgenommen werden kann. Die so entstehende Hyperglycämie verstärkt sich noch durch die kompensatorische Mehrsekretion von antiinsulinären Hormonen wie Wachstumshormon, Glucagon und Adrenalin. Bei einem Blutglucosespiegel von etwa 160 mg/dl ist die Nierenschwelle erreicht (bei Nierenerkrankungen kann sie auch höher liegen), Glucose wird mit dem Harn ausgeschieden (Glucosurie) und es kommt zur osmotischen Diurese. Eine verstärkte Lipolyse führt zu einem Anstieg der freien Fettsäuren im Blut, welche zu Ketonkörpern verstoffwechselt werden, und zu einer metabolischen Azidose führen können. Das klinische Bild wird stark von der Geschwindigkeit der Krankheitsentwicklung bestimmt. In ca. 80% der Fälle ist sie protrahiert, wobei Symptome wie Polyurie, vermehrter Durst, Gewichtsabnahme und allgemeine Leistungsschwäche im Vordergrund stehen. In 20% der Fälle ist die Entwicklung aber so schnell, dass sich eine ketoazidotische Stoffwechsellage mit Azetongeruch in der Atemluft, Übelkeit, Erbrechen, Bauchschmerzen, Zeichen der Exsikkose bis hin zu Bewusstseinstörung und Coma diabeticum, einstellt, was letal bedrohlich sein kann (Harms, 1997).

Die Therapie des Typ1 Diabetes besteht aus einer konsequenten Langzeitbehandlung, dessen Ziel die Normoglycämie ist, welche ein normales Wachstum, die Vermeidung von Spätschäden und eine normale soziale Integration ermöglicht. Die Hauptgesichtspunkte dieser Therapie sind die Gabe von Insulin, heute vorzugsweise menschliches, gentechnologisch hergestelltes Insulin, eine entsprechende Ernährungsweise, die durch regelmäßige körperliche Bewegung unterstützt werden soll, sowie regelmäßige Stoffwechselkontrollen wie Bestimmung des Blutzuckerspiegels, Messung der Glucoseausscheidung im Urin, und als längerfristigeren Marker die Kontrolle des Anteils von glycosyliertem Hämoglobin, dem HbA_{1c} (Harms, 1997). Eine gute Stoffwechseleinstellung bewahrt den Patienten vor akuten Komplikationen wie Ketoazidosen durch zu hohe Blutzuckerspiegel oder Hypoglycämien durch verhältnismäßig zu viel Insulin, als auch vor Spätkomplikationen, wie die diabetische Mikroangiopathie mit Nephropathie und Retinopathie, die Neuropathie, und die diabetische Makroangiopathie, die in Abhängigkeit von der Stoffwechselführung nach 10 – 20 Jahren auftreten (Harms, 1997).

Der Typ2 Diabetes, auch Altersdiabetes genannt (früher non insulin dependant diabetes mellitus, NIDDM), tritt meist bei älteren und häufig übergewichtigen Personen auf. Ein starker Anstieg der Inzidenz ist ab einem Lebensalter von 50 Jahren zu beobachten (Rinninger, Greten, 1998). Überernährung, Adipositas, Bewegungsmangel und eine positive Familienanamnese erhöhen die Prävalenz (Rinninger, Greten, 1998). Abzugrenzen davon sind Formen des Diabetes mellitus, die sekundär als Folgeerscheinung verschiedener anderer Krankheiten entstehen, zum Beispiel bei Pankreaserkrankungen, Lebererkrankungen, Medikation mit Glucokortikoiden, oder Endokrinopathien, die mit einer Erhöhung kontrainsulinärer Hormone einhergehen (American Diabetes Association, 2005). Anders als beim Typ1 Diabetes ist der hier zugrunde liegende Insulinmangel relativ. Das produzierte Insulin kann den Bedarf des Körpers nicht mehr decken. In frühen Stadien ist die Insulinsekretion oft sogar gesteigert (Hyperinsulinämie) (Papke, 1998), es liegt jedoch, bezogen auf den Blutzuckerspiegel, ein relatives Insulindefizit vor (American Diabetes

Association, 2005). An den Zielgeweben dieses Hormons, besonders Muskel- und Fettgewebe, ist die Wirkung vermindert, man spricht von einer Insulinresistenz (Rinninger, Greten, 1998). Man kann den Krankheitsverlauf vereinfacht in drei Phasen unterteilen: Anfangs kann die Insulinresistenz durch eine vermehrte Sekretion von Insulin kompensiert werden, so dass der Plasmaglucoosespiegel im Normbereich bleibt. Im weiteren Verlauf ist die Resistenz progredient, wodurch sich trotz Hyperinsulinämie eine pathologische Glucosetoleranz einstellt. Man spricht hier von Prä-Diabetes, definiert durch einen Nüchtern-Blutglucosewert von 100 – 125 mg/dl, bzw. einem 2h-Wert im OGTT (oraler Glucose-Toleranztest) von 140 – 199 mg/dl (American Diabetes Association, 2005). Im weiteren Verlauf verschlechtert sich auch die Insulinsekretion, es entsteht ein echter Insulinmangel. Darauf folgt eine Nüchternhyperglycämie und ein manifester Typ2 Diabetes (Rinninger, Greten, 1998). Dieser ist definiert durch Blutglucosewerte oberhalb der für den Prä-Diabetes festgesetzten Grenzen, oder einem zufälligen Blutglucosespiegel von mehr als 200 mg/dl, unabhängig von der letzten Mahlzeit (American Diabetes Association, 2005). Diese Manifestation erfolgt oft langsam und schleichend, oft sind die Patienten über Jahre symptomfrei, und erfahren nur durch Zufall bei einer Routineuntersuchung, oder durch das Auftreten von Folgeerscheinungen, dass sie an Diabetes erkrankt sind. Das liegt daran, dass oft die diabetestypischen Symptome wie Polyurie, Polydipsie und Gewichtsabnahme fehlen. Auch eine ketoazidotische Stoffwechsellage tritt nur sehr selten auf, da die verbleibende Insulinsekretion die Lipolyse noch wirksam hemmen kann (Rinninger, Greten, 1998).

Anders als beim Typ1 Diabetes steht bei der Therapie nicht die Substitution des defizienten Insulins im Vordergrund, sondern eine konsequente Diät ist die Basis jeder Behandlung. Diese soll durch körperliche Betätigung ergänzt werden (Rinninger, Greten, 1998). Oft ist durch Gewichtsreduktion und der Einhaltung gewisser Ernährungsweisen schon eine Normalisierung der Stoffwechsellage erreichbar. Ist dies jedoch nicht der Fall, wird der Einsatz von oralen Antidiabetika erforderlich. Verwendet werden hierzu Sulfonylharnstoffe (zum Beispiel Glibenclamid, Glipizid, Glisoxepid), die direkt Kalium-Kanäle an pankreatischen β -Zellen

blockieren. Der dadurch verminderte Kalium-Ausstrom bewirkt eine Depolarisation der Zellmembran, es kommt zu einer Öffnung von spannungsabhängigen Kalzium-Kanälen, der nachfolgende Kalzium-Ausstrom triggert die Exozytose insulinhaltiger Granula (Sönnichsen et al., 1998). Die Biguanide (als einziges Präparat nur noch Metformin verfügbar), wirken, indem sie durch eine Blockade der mitochondrialen Atmungskette und ein dadurch bedingtes Energiedefizit die Gluconeogenese und die mukosale Glucoseresorption vermindern. Es kommt zu einem Anstieg des anaeroben Energiestoffwechsels, was die Gefahr der Laktatazidose birgt, weshalb 1978 alle Biguanide mit Ausnahme von Metformin vom Markt genommen wurden (Sönnichsen et al., 1998). Ein weiterer Wirkstoff ist Acarbose, ein kompetitiver Glucosidase-Hemmstoff. Er verzögert die Resorption von Glucose aus Di-, Oligo-, und Polysacchariden im Dünndarm, wodurch postprandiale Blutglucosespitzen geglättet werden (Papke, 1998). Desweiteren stehen Glinide, Sekretagoga, die zu einer kurzfristigen Insulinsekretion führen als Alternative zu Sulfonylharnstoffen zur Verfügung, und Glitazone, Sensitizer, die die Insulinsensitivität der peripheren Gewebe steigern (Herold, 2003). Erst wenn auch dies nicht mehr ausreicht, wird auch ein Typ2 Diabetes insulinpflichtig.

1.2. Signalweiterleitung des Insulin

Insulin steuert ein weites Spektrum an Stoffwechselwirkungen, wie Stimulation der Glucoseaufnahme, Glycogen-, Lipid- und Proteinsynthese, Antilipolyse, Aktivierung der Transkription spezifischer Gene und Modulation des zellulären Wachstums und Differenzierung. Die intrazelluläre Signalkaskade, über die diese Hormonwirkungen erzielt werden, wurde und wird intensiv erforscht (Review: Taha und Klip, 1999; Litherland et al., 2001).

Der Insulinrezeptor besteht aus zwei α - und zwei β -Ketten, wobei die α -Untereinheiten an der extrazellulären Seite der Plasmamembran lokalisiert sind und die Bindungsstelle für Insulin beinhalten, und die β -Untereinheiten die Membran durchspannen (Taha und Klip, 1999). Die Hormonbindung führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors und somit zur Aktivierung einer Tyrosin-spezifischen Protein-Kinase im zytosolischen Anteil der

β -Ketten, wodurch bestimmte Tyrosinreste der β -Untereinheiten autophosphoryliert werden (White und Kahn, 1994).

Abbildung 1

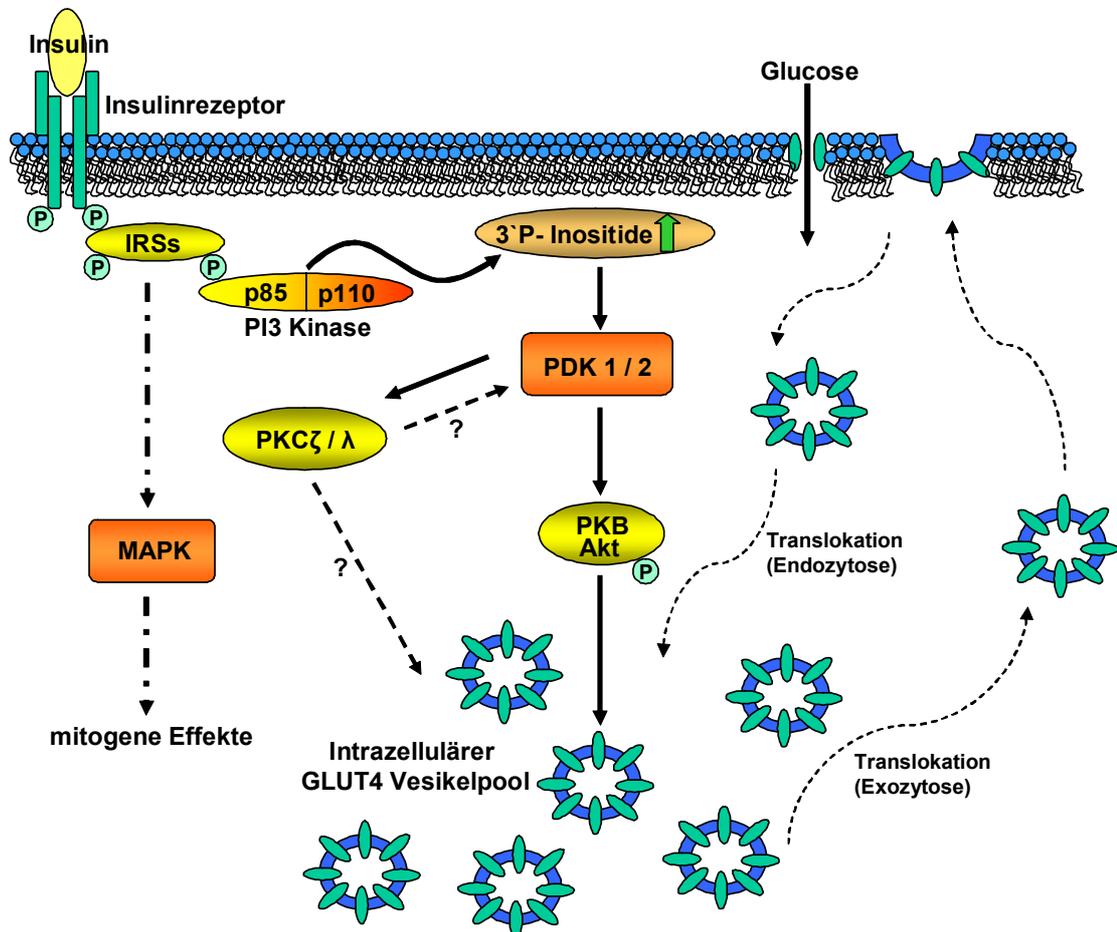


Abbildung 1: Intrazelluläre Mechanismen der Insulinvermittelten Glucoseaufnahme (modifiziert nach Holloszy & Hansen, 1996 und Hayashi et al., 1997)

Die Insulinbindung führt zu einer intrazellulären Signalkaskade, an dessen Ende unter anderem die Translokation von GLUT4 Vesikeln an die Plasmamembran steht, wodurch Glucose in die Zelle aufgenommen wird.

Der aktivierte Insulinrezeptor katalysiert die Phosphorylierung verschiedener Insulinrezeptorsubstrate, eine Gruppe von Proteinen mit ähnlichem strukturellen Aufbau. Sie verfügen an ihrem NH₂-terminalen Ende über eine so genannte Pleckstrin-homologe Domäne (PH-Domäne) und einer Phosphotyrosin-Bindungsdomäne (PTB-Domäne), und im carboxyterminalen

Bereich über mehrere Tyrosin-Phosphorylierungsmotive (Taha und Klip, 1999). Mittlerweile zählen zu dieser Gruppe mindestens neun Proteine, IRS-1 bis IRS-4, drei Isoformen von Shc, Gab-1, und p62^{dok} (Van Obberghen et al., 2001).

2003 wurden zwei weitere Proteine identifiziert, IRS-5/DOK4 und IRS-6/DOK5, die ebenfalls dieser Gruppe zugeordnet werden können (Cai et al., 2003). Die bislang am besten charakterisierten Vertreter dieser Gruppe sind IRS-1 und IRS-2. Die phosphorylierten IRS-Proteine binden und aktivieren verschiedene SH₂-Domänen haltige Proteine, als wichtigstes hier die Klasse 1a Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3-Kinase) (Litherland et al., 2001). Dieses Heterodimer besteht aus einer katalytischen (p110), und einer regulatorischen (p85) Untereinheit, welche unter anderem zwei SH₂-Domänen enthält (Litherland et al., 2001). Die Interaktion von Tyrosin-phosphorylierten IRS Proteinen mit p85 führt zu einer vermehrten Synthese von 3'-Phosphoinositiden (Phosphatidylinositol (3,4)-bisphosphat und Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphat) nahe der Plasmamembran (Litherland et al., 2001). Der PI3-Kinase wird eine zentrale Rolle in der Weiterleitung des Insulinsignals zugeschrieben, jedoch sind die genauen Mechanismen der PI3-Kinase vermittelten GLUT4 Translokation bisher weitgehend ungeklärt. Die Aktivierung der Proteinkinase B (PKB/AKT), eine PH-Domänen haltige Serin/Threonin-Kinase, scheint hier ein weiterer wichtiger Schritt zu sein (Taha und Klip, 1999). Die Produktion von 3'-Phosphoinositiden durch PI3-Kinase aktiviert die Phosphoinositid-abhängige Proteinkinasen-1 (PDK1) und -2 (PDK2) über einen bislang ungeklärten Mechanismus, welche dann die PKB durch Phosphorylierung an bestimmten Serin- und Threoninresten aktivieren (Taha und Klip, 1999). Auch die atypischen PKC-Enzyme PKC ζ und PKC λ werden PI3-Kinase-abhängig aktiviert, wobei, zumindest bei PKC ζ auch PDK1 eine Rolle spielt (Taha und Klip, 1999). Es scheint, dass sich das durch Insulin ausgelöste Signal über den PI3-Kinase-abhängigen Weg an dieser Stelle der Kaskade in zwei verschiedene Wege teilt, über PKB und über PKC (Taha und Klip, 1999). Inwieweit diese miteinander interagieren, und welche Rolle sie bei der Translokation von GLUT4 zur Plasmamembran spielen, muss noch geklärt werden (Litherland et al., 2001).

Der MAP-Kinase Signalweg ist ein PI3-Kinase unabhängiger Weg, der durch IRS-abhängige Aktivierung von Grb2, einem SH₂-Domänen haltigem Protein, ausgelöst wird. Über mehrere Schritte wird die MAP-Kinase aktiviert, wodurch zum Beispiel Transkriptionsfaktoren gesteuert werden. Dieser Signalweg ist nicht sehr insulin sensitiv (Taha und Klip, 1999). Es gibt mindestens drei Formen der MAPK, die in z.T. unterschiedliche Signalkaskaden verwickelt sind: ERK (extrazellulär signalregulierte Kinase), JNK (c-Jun NH₂-terminale Kinase) und p38 MAPK (Widmann et al., 1999). ERK1/2 werden hauptsächlich durch Wachstumsfaktoren aktiviert, wohingegen JNK und p38 MAPK vor allem durch zellulären Stress oder auch durch Insulin aktiviert werden (Chen Z. et al., 2001)

Nicht nur Insulin, auch Muskelkontraktion steigert die Glucoseaufnahme, und zwar unabhängig von IRS-Phosphorylierung und Aktivierung der PI3-Kinase. Die beiden Stimuli sind sogar additiv. Die genaue Signalkaskade ist jedoch nicht vollständig geklärt. Sowohl Insulin, als auch Kontraktion, stimulieren das MAP-Kinase Signaling, wobei keine Evidenz für einen gesteigerten Glucosetransport vorliegt. Auch dem bei Kontraktion aus dem sarkoplasmatischen Retikulum freigesetztem Ca²⁺ wird eine Rolle bei der Aktivierung und Initialisierung von Signalwegen zugeschrieben. Desweiteren steigern Aktivierung von AMPK und Freisetzung von NO den Glucosetransport in Skelettmuskelgewebe (Litherland et al., 2001), und auch Hyperosmolarität kann die Glukoseaufnahme steigern (Toyoda et al., 1986).

1.3. Skelettmuskulatur und Insulinresistenz

Die Skelettmuskulatur ist das quantitativ wichtigste insulinsensitive Gewebe, sowohl nach oraler als auch intravenöser Glucose-Zufuhr (DeFronzo et al., 1992). Beim Typ2 Diabetes ist die Fähigkeit von Insulin vermindert, die Glucoseaufnahme in peripheren Geweben zu stimulieren (Andreasson et al., 1991). Als Ursache für diese Einschränkung werden verschiedene Ansätze diskutiert.

So stellt sich die Frage, ob veränderte **Insulinrezeptor** Expression oder Mutationen am Rezeptor eine Rolle bei der Entstehung von Insulinresistenz und somit von Typ2 Diabetes spielen. Verschiedene Studien

zeigen eine Assoziation zwischen der Aktivität der Insulinrezeptor-Tyrosinkinase und dem Auftreten von Übergewicht und Typ2 Diabetes (Arner et al., 1987, Maegawa et al., 1991, Nolan et al., 1994). Andere belegen eine normale Rezeptorfunktion in Skelettmuskelgewebe bei Typ2 Diabetes (Caro et al., 1987, Klein et al., 1995). Eine neuere Studie (Krook et al., 2000 (1)) zeigt keine Beeinträchtigung der Autophosphorylierung des Insulinrezeptors im Skelettmuskel bei moderat übergewichtigen Typ2 Diabetikern im Vergleich zu einer Kontrollgruppe. Interessant hierzu sind auch natürlich auftretende Rezeptormutationen im Rahmen von anderen Erkrankungen oder Syndromen, da sie Einblicke in die Insulinwirkung beim Menschen gewähren, wie zum Beispiel das Donohue's Syndrom, oder Leprechaunismus, ein seltenes autosomal-rezessiv erbliches gynäkotropes Dysmorphiesyndrom mit Hyperinsulinämie und Hypertrophie der Langerhans-Inseln infolge Insulinrezeptordefekt (Pschyrembel). Die betroffenen Kinder werden extrem klein („small for gestational age“, SGA) geboren, entwickeln trotz des Fehlens von funktionellen Insulinrezeptoren keine Ketoacidose, und sterben meist innerhalb des ersten Lebensjahres. In einigen Fällen leben sie auch länger. Bei Untersuchungen an Knock-Out Mäusen, die den gleichen Rezeptordefekt aufwiesen, fiel auf, dass die Jungtiere normalgewichtig waren, jedoch alle innerhalb Stunden durch Ketoacidoseentwicklung starben (Accili et al., 1996).

Die **Insulinrezeptorsubstrate**, IRS-1 bis IRS-6, sind ein weiterer Punkt intensiver Forschung, wobei die meisten Daten zu den Proteinen IRS-1 und IRS-2 vorliegen. In der Skelettmuskulatur von Typ2 Diabetikern ist die IRS-1-Phosphorylierung nach Insulin-Stimulus sowohl *in vivo* als auch *in vitro* vermindert (Bjornholm et al., 1997, Krook 2000 (1)), wobei *in vitro* festgestellt wurde, dass dies trotz normaler Insulinrezeptor-Autophosphorylierung der Fall ist. In Adipozyten von Typ2 Diabetikern ist die insulinabhängige Phosphorylierung von IRS-1 und dessen Expression herabgesetzt, IRS-2 ist unverändert (Rondinone et al., 1997). IRS-2 scheint hier größtenteils für die Aktivierung von PI3-Kinase verantwortlich zu sein, im Gegensatz zu gesunden Kontroll-Adipozyten, wo IRS-1 etwa 70% zu der insulinabhängigen PI3-Kinase Aktivität beiträgt (Rondinone et al., 1997). In insulinresistenter Skelettmuskulatur wurde eine verminderte IRS-1

Expression lediglich in Assoziation mit morbidem Adipositas festgestellt (Goodyear et al., 1995), nicht jedoch bei moderat übergewichtigen Typ2 Diabetikern (Bjornholm et al., 1997; Krook et al., 2000 (1)). Trotz der normalen Expression von IRS-1 ist die Insulin-stimulierte Tyrosin-Phosphorylierung stark herabgesetzt. IRS-2 spielt im menschlichen Skelettmuskelgewebe eine eher untergeordnete Rolle bei der insulinabhängigen Aktivierung von PI3-Kinase (Krook et al., 2000 (1)). Es besteht also eine verminderte Fähigkeit des Insulinrezeptors IRS-1 zu phosphorylieren. Hohe Spiegel an freien Fettsäuren könnten hierbei eine auslösende Rolle spielen. Studien an Tieren zeigen, dass eine fettreiche Ernährung die Insulinwirkung an Skelettmuskel- und Fettgewebe direkt beeinträchtigt (Kraegen et al., 1986). Eine fünfstündige Lipidinfusion bei gesunden Probanden bewirkt eine akute und starke Reduktion von insulinabhängiger PI3-Kinase-Aktivität durch IRS-1 (Dresner et al., 1999). In Gewebekulturen wird eine vermehrte Serin-Phosphorylierung an IRS-1 bei erhöhten Spiegeln von Glucose, Insulin und $TNF\alpha$ festgestellt, was eine Beeinträchtigung der downstream Signaltransduktion zur Folge hat (Kellerer et al., 1995, Pillay et al., 1996, Qiao et al., 1999, Hotamisligil et al., 1996). Inwieweit diese Mechanismen auch *in vivo* zur Insulinresistenz beitragen, und ob die IRS-1 Serin-Phosphorylierung in der Skelettmuskulatur von Typ2 Diabetikern erhöht ist, ist noch unklar.

Zu den Substraten IRS-3 und IRS-4 liegen bislang wenige Informationen hinsichtlich ihrer Rolle bei der Glucosehomöostase vor. Eine Überexpression von IRS-3 in Ratten-Adipozyten führt zu einer vermehrten GLUT4-Translokation an die Zelloberfläche (Zhou et al., 1999), jedoch sind IRS-3 Knockout-Mäuse hinsichtlich Wachstum, Glucosehomöostase und Glucosetransport in Adipozyten normal (Liu et al., 1999). Auch IRS-4 vermag die Zahl der GLUT4 Moleküle an der Plasmamembran zu steigern (Zhou et al., 1999), IRS-4 Knockout-Mäuse weisen außerdem unter anderem einen leicht beeinträchtigten oralen Glucosetoleranztest auf (Fantin et al., 2000).

Die Aktivierung der **Phosphatidylinositol 3-Kinase** (PI3-Kinase) ist einer der Hauptmechanismen für die Steigerung des insulinabhängigen Glucosetransports, vor allem in Skelettmuskulatur und in Adipozyten (Rondinone et al., 1997, Zierath et al., 1998, Bjornholm et al., 1997,

Shepherd et al., 1997, Wojtaszewski et al., 1998). Bei Typ2 Diabetikern und morbid übergewichtigen Patienten ist die Aktivität vermindert, was zum Einen aus der herabgesetzten Expression bzw. Tyrosin-Phosphorylierung von IRS-1 resultiert, zum Anderen aus einer verminderten Expression der p85-Untereinheit der PI3-Kinase (Goodyear et al., 1995). Studien zeigen auch einen eingeschränkten Glucosetransport in Skelettmuskelgewebe von Typ2 Diabetikern bei Insulinkonzentrationen, die sowohl bei Diabetikern als auch bei den Kontrollgruppen, die gleiche PI3-Kinase-Aktivität bewirkt haben (Krook et al., 2000 (1)). Die Aktivierung der PI3-Kinase allein ist also, zumindest in der Skelettmuskulatur von Typ2 diabetischen Patienten, nicht ausreichend, um den Glucosetransport zu steigern. In menschlichem Skelettmuskelgewebe gibt es mindestens sieben Isoformen der PI3-Kinase-Adapteruntereinheit, welche spezifische Signalwege downstream aktivieren könnten (Shepherd et al., 1997). Es wäre denkbar, ist jedoch nicht erwiesen, dass in der Skelettmuskulatur von Typ2 Diabetikern alternative Isoformen, verglichen mit gesunden Vergleichspersonen, rekrutiert werden.

Die Serin/Threonin-Kinase **PKB (Proteinkinase B, AKT)** ist ein downstream Angriffspunkt der PI3-Kinase und wird durch PDK1 (Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphat-abhängige Protein-Kinase) aktiviert (Alessi et al., 1997). In 3T3-L1 Adipozyten steigert PKB die GLUT4-Translokation und den Glucosetransport (Kohn et al., 1996; Tanti et al., 1997). Eine erhöhte Aktivität der PKB konnte in Skelettmuskelgewebe sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nach Insulinstimulierung beobachtet werden (Krook et al., 1998, Shepherd et al., 1997, Kim et al., 1999). Eine Verminderung der Aktivität konnte bei hohen Insulinkonzentrationen bei Typ2 Diabetikern festgestellt werden, ein eingeschränkter Glucosetransport ist jedoch schon bei niedrigeren Insulinkonzentrationen der Fall (Krook et al., 1998). Außerdem wurden bei *in vivo* Stimulation mit Insulin in der Skelettmuskulatur von Typ2 Diabetikern, trotz reduzierter PI3-Kinase-Aktivität, normale PKB-Aktivitäten gemessen (Kim et al., 1999). Es sind noch weitere Forschungen nötig, um die Regulation von PKB in der Skelettmuskulatur, und dessen Rolle bei der Entstehung von Insulinresistenz, zu verstehen.

Insulinstimulierung und Muskelkontraktion führen zu einer Aktivierung der **MAP-Kinase**, welche bei den metabolischen und mitogenen Effekten von Insulin eine Rolle spielt (Chen Z. et al., 2001). Die MAP-Kinasen-Aktivierung erfolgt unabhängig von der PI3-Kinase (Shepherd et al., 1997), und ist in isoliertem Skelettmuskelgewebe von Typ2 Diabetikern nicht beeinträchtigt (Krook et al., 2000 (1)).

Eine wichtige Rolle in der Glucosehomöostase spielt der Glucosetransporter **GLUT4**. Die Translokation dieser Transporter in die Plasmamembran wird durch Insulin, Hypoxie und körperliche Aktivität stimuliert. Ein Mangel an GLUT4 resultiert in einem insulinresistenten Phänotyp (Katz et al., 1995, Zisman et al., 2000), eine gesteigerte Expression hat auch eine erhöhte Glucoseaufnahme zur Folge (Leturque et al., 1996, Ren et al., 1995). Die Menge der GLUT4 Transporter in der Skelettmuskulatur von Typ2 diabetischen Patienten ist laut Studien von 1990 (Handberg et al., 1990, Pedersen et al., 1990) vergleichbar mit gesunden Kontrollpersonen, jedoch erniedrigt bei morbid übergewichtigen Typ2 Diabetikern (Dohm et al., 1991). Neuere Studien zeigen, dass sowohl die Insulin-, als auch die Hypoxie-stimulierte GLUT4 Translokation in der Skelettmuskulatur von Typ2 Diabetikern stark beeinträchtigt ist, obwohl sie über unterschiedliche Signalwege ausgelöst wird (Ryder et al., 2000). Es könnte sich also um einen allgemeinen Defekt der Translokation von GLUT4 in der Skelettmuskulatur von Typ2 Diabetikern handeln.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass, trotz einiger Defekte an verschiedenen Proteinen in der Insulinkaskade, keines davon ursächlich für die starke Einschränkung des insulininduzierten Glucosetransportes bei Typ2 Diabetikern scheint (Krook et al., 2000). Gründe dafür könnten sein, dass der Glucosetransport abhängig von einer Kinase erfolgt, die noch nicht erforscht wurde, oder dass die Aktivität der verschiedenen Moleküle bei der Signalweiterleitung kontextspezifisch ist, und in den richtigen zellulären Kompartimenten erfolgen muss. Auch das extrazelluläre Milieu ist sehr bedeutsam. Einflussgrößen auf die Insulinsensitivität in der Skelettmuskulatur sind zum Beispiel das Körpergewicht und der Körperfettanteil, der Blutzuckerspiegel, und die körperliche Fitness. Hyperglycämie bewirkt einen verminderten Glucosetransport in

Skelettmuskelgewebe, Kurz-Infusionen von Fettsäuren senken die Aktivität der PI3-Kinase, Muskelkontraktionen haben eine direkte Steigerung des Glucosetransportes zur Folge, und erhöhen außerdem die Wirksamkeit von Insulin. Dass in vielen Studien oft unterschiedliche Ergebnisse *in vivo* und *in vitro* zu beobachten sind, zeigt, dass das *in vivo* Milieu signifikant zur Pathogenese des Typ2 Diabetes beiträgt (Krook et al., 2000).

1.4. Herzmuskulatur und Insulinresistenz

Nicht nur in der Skelettmuskulatur, sondern auch am Myokard spielt Insulin eine Rolle bei der Regulation des Energiemetabolismus. Hier hat jedoch die Fettsäureoxidation einen größeren Stellenwert, sie liefert etwa 80% der kardialen ATP-Produktion. Bei der Utilisation von Glucose hingegen ist der Sauerstoffverbrauch pro Mol ATP geringer, und die Glucoseaufnahme am Herzen wird bei Ischämie gesteigert (Oliver und Opie, 1994). Außerdem nimmt man an, dass durch Glucose gewonnenes ATP für Ionenkanäle und Pumpen verwendet wird (Weiss und Lamp, 1989). Die limitierenden Größen des Glucosemetabolismus sind der Glucosetransport und Hexokinase. Zwei Transporter-Isoformen werden hauptsächlich exprimiert, GLUT1 und GLUT4, in einem Verhältnis von 1:3 (Kraegen et al., 1993). Forschungen an genetischen (*fa/fa*) Obese Zucker Ratten zeigen, dass die Insulinresistenz des kardialen Glucosetransports durch eine Verminderung der Aktivierung von PI3-Kinase und vermehrte Phosphorylierung von Serin/Threonin an IRS-1 erklärt werden kann (Kolter et al., 1997).

Aktivatoren des kardialen Glucosetransports sind Insulin - über die Aktivierung von PI3-Kinase und Translokation von GLUT4, wobei hier festgestellt wurde, dass p85-alpha die PI3-Kinase Aktivität zu den GLUT4-Vesikeln herstellt, und p85-beta den hauptsächlichsten Regulator von IRS-1 und IRS-2 abhängiger PI3-Kinase-Aktivierung darstellt (Cheatham und Kahn, 1995; Kessler et al., 2001), Kontraktion – auch hier werden GLUT4 Transporter an die Plasmamembran transloziert, im Gegensatz zur Skelettmuskulatur sind Insulinwirkung und Kontraktion am Herzen nicht additiv (Kolter et al., 1992), desweiteren geht die Kontraktions-induzierte Signalweiterleitung einen zumindest teilweise alternativen Weg zur Insulin-abhängigen Signalweiterleitung (Till et al., 1997). Ischämie und Hypoxie –

über einen PI3-Kinase unabhängigen Weg, wahrscheinlich durch Stimulation von AMP-aktivierter Protein Kinase (Russell et al., 1999), und Catecholamine – α -adrenerge Stimulation führt über einen PI3-Kinase abhängigen Weg, der additiv zur Insulinwirkung ist, zu erhöhter Glucoseaufnahme (Doenst und Taegtmeyer, 1999), kurzzeitige β -adrenerge Stimulation führt PI3-Kinase unabhängig zu einer Steigerung der Glucoseaufnahme. Dieser Weg ist ebenfalls additiv zur Insulinwirkung. Langzeitstimulation der β -Rezeptoren bewirkt jedoch eine Inhibierung der Insulin-stimulierten Glucoseaufnahme und der Insulin-induzierten Autophosphorylierung des Insulinrezeptors (Morisco et al., 2005).

Kardiale Insulinresistenz konnte bisher bei Patienten mit KHK, kardialer Hypertrophie, auch ohne Hypertension, und Typ2 Diabetes festgestellt werden (Paternostro et al., 1999), nicht jedoch bei Typ1 Diabetes und unkompliziertem Typ2 Diabetes. Um die ganze Bedeutung der kardialen Insulinresistenz zu verstehen, ist noch weitere Forschung auf diesem Gebiet nötig.

1.5. Struktur, Expression und Funktion der Insulinrezeptorsubstrate

Die Pathophysiologie des Typ2 Diabetes beinhaltet Defekte der Gewebesensitivität für Insulin plus herabgesetzte Insulinsekretion. Die steigende Insulinresistenz bewirkt eine kompensatorische Hyperinsulinämie durch gesteigerte Insulinsekretion der pankreatischen β -Zellen über 1 – 2 Dekaden (Warram et al., 1990).

Die normale Glucosehomöostase wird durch drei Hauptgeschehnisse aufrecht erhalten: I – Insulinsekretion, II – Suppression der hepatischen Glucoseproduktion und III – Stimulation der Glucoseaufnahme durch Leber und Muskelgewebe (De Fronzo et al., 1992). Insulinresistenz ist die herabgesetzte Fähigkeit von peripheren Zielgeweben, v. a. der Muskulatur, angemessen auf physiologische zirkulierende Insulinkonzentrationen zu reagieren (Petersen und Shulman, 2002).

Der Insulin- und der IGF-1-Rezeptor sind strukturell und funktionell eng miteinander verwandt. Es sind beides Oberflächenrezeptoren mit intrinsischer Tyrosin-Kinase Aktivität, bestehend aus zwei α - und zwei β -

Ketten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Van Obberghen 1994, Kahn und White, 1988, Yarden und Ullrich, 1988).

Der Insulinrezeptor bindet Insulin, IGF-1 und IGF-2 (De Meyts et al., 1995).

Bis heute sind neun Insulinrezeptorsubstrate bekannt: 4 IRS-Proteine (IRS-1 bis IRS-4 (Sun et al., 1991, Sun et al., 1995, Lavan et al., 1997 (1), Lavan et al., 1997 (2)), 3 Src-Homology-Collagen (SHC) – Proteine (Pelicci et al., 1992), Gab-1 (Grb-2 associated binder – 1 (Holgado-Madruga et al., 1996) und p62^{dok} (Carpino et al., 1997). 2003 wurden zwei weitere Proteine identifiziert, IRS-5/DOK4 und IRS-6/DOK5, die ebenfalls dieser Gruppe zugeordnet werden können (Cai et al., 2003).

Die Insulinrezeptorsubstrate 1 bis 4 (bzw. 1 bis 6) weisen strukturelle Ähnlichkeiten auf. An ihrem NH₂-terminalen Ende besitzen sie eine PH-Domäne, gefolgt von einer PTB-Domäne. Die unterschiedlich langen C-terminalen Enden sind mit mehreren potentiellen Tyrosin-Phosphorylierungs-Motiven bestückt, die z.B. SH2-Domänen haltige Proteine wie PI3-Kinase, Grb-2 oder SHP-2 binden können (Van Obberghen et al., 2001). Die PH- und PTB-Domänen werden als Schlüsselemente in der Interaktion der Substrate mit dem Insulin- bzw. IGF-1 Rezeptor angesehen (Van Obberghen et al., 2001).

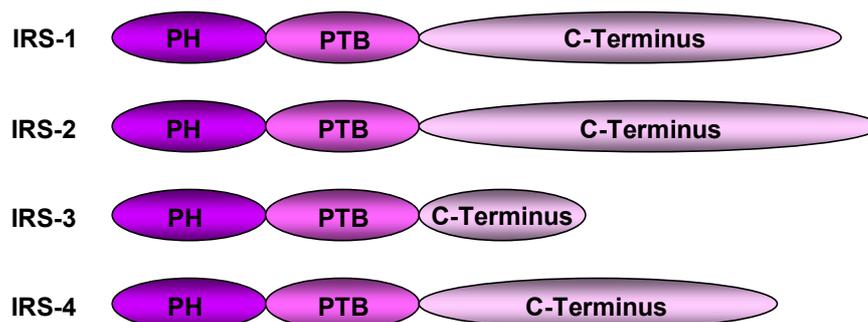


Abbildung 2: IRS – Isoformenstrukturvergleich von IRS-1 bis IRS-4

Die strukturell gleich aufgebauten Insulinrezeptorsubstrate weisen alle eine NH₂ – terminale Pleckstring – Homology (PH) Domäne, gefolgt von einer Phosphotyrosin Bindungsdomäne (PTB). Das COOH-terminale Ende ist unterschiedlich lang und beinhaltet mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen.

Modifiziert nach Van Obberghen, 2001.

IRS-1 wurde als erstes Insulinrezeptorsubstrat identifiziert (Sun et al., 1991). Es besitzt 21 mutmaßliche Tyrosin-Phosphorylierungsstellen, sowie mehr als 30 potentielle Serin/Threonin – Phosphorylierungsstellen (White, 1997, Sun et al., 1991).

Eine Serin / Threonin – Phosphorylierung von IRS-1 bewirkt eine Desensibilisierung gegenüber der Insulinaktion aufgrund drei verschiedener Mechanismen: I – es fungiert als schlechteres Substrat für den Insulinrezeptor (IR), II – es weist eine schlechtere Bindung an andere Proteine auf, III – die eigene Stabilität ist herabgesetzt (Hotamisligil et al., 1996, Ricort et al., 1996, Summers et al., 1999).

Eine erhöhte Serinkinase-Aktivität wurde in obesen, insulinresistenten Ratten nachgewiesen (Qiao et al., 1999). IRS-1 KO-Mäuse weisen eine reduzierte Körpergröße aufgrund schwerer embryonaler und postnataler Wachstumsretardierung und leichte Insulin- und IGF-Resistenz auf (Tamemoto et al., 1994, Araki et al., 1994). Ausserdem zeigen sich Defekte im insulinstimulierten Glucosetransport und der Muskelglycogensynthese (Previs et al., 2000, Yamauchi et al., 1996), Zeichen des Metabolischen Syndroms und starke Osteopenie aufgrund von Defekten in der Proliferation und Differenzierung von Geweben. IRS-1 spielt offensichtlich eine wichtige Rolle in der Vermittlung der anabolen Wirkung von Insulin und IGF-1 (Ogata et al., 2000).

IRS-2 besitzt 22 potentielle Tyrosin-Phosphorylierungsstellen (Sesti et al., 2001). Ausserdem besitzt es in der Mitte, zwischen den Aminosäuren 591 und 786, eine einzigartige zusätzliche Bindungsdomäne zur β -Untereinheit des Insulinrezeptor: KRLB (kinase regulatory loop binding domaine), die im IRS-1 nicht vorkommt, und keine Interaktion mit dem IGF-1 Rezeptor aufweist (Sawka-Verhelle et al., 1996). IRS-2 KO-Mäuse zeigen eine kombinierte Insulinresistenz in peripheren Geweben mit progredienter Hyperglycämie als Folge inadäquater Kompensation aufgrund eines Defektes der pankreatischen β -Zell-Entwicklung und entwickeln daraufhin einen Typ2 Diabetes (Withers et al., 1998, Kubota et al., 2000). Diese gestörte β -Zell-Entwicklung plus gesteigerter Apoptose ist zurückzuführen auf eine fehlerhafte IGF-1 – IRS-2 Signalweiterleitung (Withers et al., 1999).

Desweiteren zeigen sich eine gesteigerte hepatische Glucoseproduktion mit verminderter Glycogensynthese (Previs et al., 2000).

Die Ursache für die Insulinresistenz *in vivo* ist jedoch wahrscheinlich eher eine prolongierte Hyperglycämie aufgrund hepatischer Insulinresistenz und β -Zell-Versagen, als das Fehlen von IRS-2 in der Skelettmuskulatur (Kubota et al., 2000, Withers et al., 1998, Higaki et al., 1999).

Zusätzlich leiden IRS-2 KO-Weibchen unter Defekten in der Hypothalamus – Hypophysen – Ovarien – Achse, was zu Infertilität und Obesity führt (Burks et al., 2000). IRS-1/IRS-2 KO-Mäuse sterben noch vor der Implantation des Embryos. Es ist einer der letalsten Phänotypen, die bei Mäusen mit gezielter Genmutation beobachtet werden (Withers et al., 1999).

Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass IRS-1 eine Rolle im somatischen Zellwachstum spielt, und IRS-2 bei der Regulation des Kohlenhydrat-Metabolismus.

IRS-3 wurde in Ratten-Adipozyten entdeckt (Lavan und Lienhard, 1993), und konnte in einigen anderen Geweben nachgewiesen werden (Giovannone et al., 2000, Sciacchitano und Taylor, 1997). Es wird jedoch anscheinend in menschlichen Zellen nicht exprimiert (Sesti et al., 2001). Es besitzt 13 potentielle Tyrosin-Phosphorylierungsstellen.

Eine Überexpression in Ratten-Adipozyten bewirkt eine gesteigerte GLUT4 Translokation an die Zellmembran auch in Abwesenheit von Insulin (Zhou et al., 1999), und die Assoziation von p85 mit IRS-3 erfolgt schneller als mit IRS-1 oder -2 (Smith-Hall et al., 1997). Seine Funktion liegt somit auch in der Transduktion von metabolischen und mitogenen Signalen (Sesti et al., 2001). IRS-3 KO-Mäuse weisen keinen speziellen Phänotyp auf (Liu et al., 1999).

1997 wurde von B.E. Lavan und seinen Mitarbeitern ein 160-kDa Protein in Human Embryonic Kidney (HEK) 293 Zellen entdeckt, welches durch Insulinstimulus einer rapiden Tyrosin-Phosphorylierung unterliegt (Lavan et al., 1997 (1)). Weitere Charakterisierung ergab, dass es sich um ein 1257 Aminosäuren-Protein handelte, das an seinem N-terminalen Abschnitt eine PH-Domäne, eine PTB-Domäne, und, über das C-terminale Ende verteilt, über 12 potentielle Tyrosin-Phosphorylierungsmotive verfügt. Aufgrund dieses architektonischen Aufbaus wurde es als Insulinrezeptorsubstrat-4 (IRS-4) klassifiziert (Lavan et al., 1997 (1)).

In diesen Zellen konnte zudem eine Bindung zwischen IRS-4 und PI3-Kinase, Grb-2, jedoch nicht mit SHP-2 oder Phospholipase C χ nachgewiesen werden (Fantin et al., 1998). Es wird in HEK 293 Zellen weitaus stärker als IRS-1 und IRS-2 exprimiert (Lavan et al., 1997 (1), Fantin et al., 1998). Bis heute konnte jedoch ausser in diesen Zellen und in einigen humanen Brustkrebs-Zelllinien kein IRS-4 Protein nachgewiesen werden (Fantin et al., 1999 (2)), obwohl dessen mRNA in einer Vielzahl von humanen und tierischen Geweben detektiert wurde, zum Beispiel in der Skelettmuskulatur, Herz, Gehirn (hauptsächlich im amygdalohippocampalen Bereich und im Hypothalamus), Leber, Niere, Ovar, Placenta, Prostata und in einigen Tumorzellreihen (Fantin et al., 1998; Fantin, et al., 1999 (2); Numan und Russell, 1999; Giovannone et al., 2000; Sesti et al., 2001).

Die Funktion von IRS-4 ist noch nicht geklärt. In Ratten-Adipozyten führt eine Überexpression zu einem Anstieg der GLUT4 Translokation an die Zelloberfläche (Zhou et al., 1999), es hat einen positiven Effekt auf die Zellproliferation nach Insulin und IGF-1 Stimulus in verschiedenen Zelllinien (Fantin et al., 1999 (1); Qu et al., 1999), in 32D Zellen konnte aber ein Überleben der Zellen durch IRS-4, anders als bei IRS-1 und IRS-2, nicht vermittelt werden (Uchida et al., 2000). IRS-4 Knockout-Mäuse zeigen leicht reduziertes Gewicht, einen etwas niedrigeren Glucoselevel bei normalen Plasma-Insulinspiegeln, einen leicht erniedrigten oralen Glucose Toleranz Test (oGTT), aber normalen Insulin Toleranz Test (Fantin et al., 2000).

1.6. Ziel dieser Arbeit

In dieser Arbeit soll zunächst die Expression von IRS-4 auf Proteinebene, anders als bisher nur auf mRNA Ebene, nachgewiesen werden. Im Focus stehen hierzu verschiedene Muskelgewebetypen. Es werden drei verschiedene Skelettmuskeln, Quadriceps, Gastrocnemius und Soleus, ganze Herzen und Kardiomyozyten von der Ratte verwendet. Zusätzlich zu den Wistar Ratten wird die Expression auch bei WOK.W Ratten, einem Tiermodell mit Metabolischem Syndrom, untersucht. Desweiteren werden auch humane Skelettmuskelzellen vom M. rectus abdominis verwendet.

Es soll herausgefunden werden, ob IRS-4 in diesen Geweben, sofern vorhanden, durch verschiedene Stimuli aktiviert wird, wie es bei den HEK 293 Zellen der Fall ist, und so entsprechende Signale weiterleiten kann.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. MATERIAL

2.1.1. Tiere

Wistar Ratten

Typ Hannover

männlich, Gewichtsklasse 260g-320g

Harlan-Winkelmann, Borcheln

WOK.W Ratten

männlich, Alter 24-28 Wochen,

Gewichtsklasse 400g-450g

Dep. of Laboratory Animal

Science, Ernst-Moritz-Arndt

Universität Greifswald

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Fertig-Gele

Excel Gel SDS Homogenous
7,5%

Amersham Pharmacia, Freiburg

Pufferstreifen

Excel Pufferstreifen

Anode: 0,3 mol/l Tris/Acetat; 0,4%
SDS; pH 6,4

Kathode: 0,08 mol/l Tricin; 0,4%
SDS; pH 7,1

Amersham Pharmacia, Freiburg

PVDF Blotmembran

Immobilon P

Sigma, Deisenhofen

Watson Filterpapiere

Mukoll

2.1.3. Antiseren

| | |
|------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Anti-IRS-1 (1) | Polyklonales Kaninchen-Antiserum (Klon K6B), gerichtet gegen einen rekombinanten Proteinabschnitt (AS 581-857) des Ratten IRS-1 (Ouwens et al., 1994) Leiden University, Leiden, NL |
| Anti-IRS-1 (2) | Polyklonales Kaninchen-Antiserum, gerichtet gegen einen synthetischen, C-terminalen Proteinabschnitt des Ratten IRS-1 (Lamphere & Lienhard, 1992) Upstate Biotechnology, Lake Placid, USA |
| Anti-IRS-2 (1) | Polyklonales Kaninchen-Antiserum (Klon K4), gerichtet gegen einen rekombinanten Proteinabschnitt (AS 324-100 des Maus IRS-2 (Telting et al., 2001) Leiden University, Leiden, NL |
| Anti-IRS-2 (2) | Polyklonales Kaninchen-Antiserum, gerichtet gegen ein GST-Fusionsprotein (AS 976-1094) des Maus IRS-2 (Sun et al., 1995) Upstate Biotechnology, Lake Placid, USA |
| Anti-IRS-4 | Polyklonales Kaninchen-Antiserum, gerichtet gegen einen rekombinanten Proteinabschnitt (AS 1240-1257) des humanen IRS-4 (Fantin et al., 1998) Upstate Biotechnology, Lake Placid, USA |
| RC20 | Anti-P-Tyrosin IgG, gekoppelt an Meerrettich-Peroxidase (HRP), gerichtet gegen ein rekombinantes Peptid (Fixman et al., 1996) Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA |
| PY20 IgG _{2b} | sc-508 AC Agarose-Konjugat, Anti-P-Tyrosin, monoklonales Mäuse-Antiserum, gerichtet gegen |

Phosphotyrosine in Proteinen, speziesunabhängig,
(Hunter & Cooper, 1985)

Santa Cruz Biotechnology, USA

Anti-Rabbit IgG Polyklonales Ziege-Antiserum, gekoppelt an
Meerrettich-Peroxidase, gerichtet gegen die leichten
und schweren Ketten des Kaninchen IgG
Promega, Mannheim

Immunizing Peptide Blocking Peptid des Anti-IRS-4 AK.
Zur Blockierung des Anti-IRS-4 AK erfolgte eine
Preinkubierung von 1 µg/ml Antikörper mit 10 µg
immunizing peptide für 30 Minuten bei 4° C, gefolgt von
der Immunodetektion (siehe 2.2.8.).
Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA

2.1.4. Molekulargewichtsmarker

Broad Range Proteinmischung aus Referenzproteinen
Myosin aus Kaninchenmuskel, 212 kDa; MBP-β-
Galactosidase aus E.coli, 158 kDa; β-Galactosidase
aus E.coli, 116 kDa; Phosphorylase b aus
Kaninchenmuskel, 97 kDa; Rinderserumalbumin, 66
kDa; Glutamicdehydrogenase aus Rinderleber, 56 kDa;
New England Biolabs, Schwalbach

Prestained Broad Range Proteinmischung aus Referenzproteinen
MBP-β-Galactosidase aus E.coli, 175 kDa; MBP-
Paramyosin aus E.coli, 83 kDa;
Glutamicdehydrogenase aus Rinderleber, 62 kDa;
Aldolase aus Kaninchenmuskel, 48 kDa;...
New England Biolabs, Schwalbach

2.1.5. Zellsysteme

Humane (SkMC) aus menschlichem Skelettmuskelgewebe
Muskelzellen (M. rectus abdominis) im Myoblastenstadium,
Promo Cell, Heidelberg

Adulte Eigenpräparation, isoliert aus männlichen Wistar
Kardiomyozyten Ratten unter Verwendung einer retrograden *in situ*
Perfusion des Herzens mit Kollagenase-Puffer
(modifizierte Langendorffperfusion, Eckel et al., 1983;
Eckel, 1989), freundlicherweise bereitgestellt im
isolierten Zustand von Olaf Dransfeld, Deutsches
Diabetes Forschungsinstitut, Düsseldorf

HEK 293 Zellen LGC Promochem – ATCC, Wesel, Deutschland

2.1.6. Zellkulturmedien

für SkMC Basal Medium (modifiziertes MCDB 120) mit 28 mM
Hepes
+ Fetal Calf Serum 5%
+ Fetuin 50 µg/ml
+ Basic Fibroblast Factor 1 ng/ml
+ Epidermal Growth Factor 10 ng/ml
+ Insulin 10 ng/ml
+ Dexamethasone 0,4 µg/ml
+ Amphotericin B 50 ng/ml
+ Gentamicin 50 µg/ml

2.1.7. Kit-Systeme

Bio-Rad Protein Assay Bio-Rad, München
SuperSignal Chemiluminescent Substrate Pierce, Rockford, USA
Western Blot Recycling Kit Biotrend, Köln

2.1.8. Chemikalien

| | |
|-------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| Insulin (aus Schweinepankreas) | Fluka, Neu-Ulm |
| Insulin, human, Actrapid®, 100 I.E./ml | Novo Nordisc |
| Rinderserum Albumin (lyophilisiert, reinst) | Behring, Marburg |
| Rinderserum Albumin (fettsäurefrei, Fraktion V) | Boehringer, Mannheim |
| | |
| Narcoren® | Pentobarbital Merial, Hallbergmoos Deutschland |
| | |
| PBS Dulbecco´s, steril | Gibco, Berlin |
| Milchpulver, fettarm | Neuform, Fink GmbH, Herrenburg |
| | |
| Protein A Trisacryl (GF-2000) | Pierce, Oud Beijerland, NL |
| | |
| Protein G Agarose | Pierce, Oud Beijerland, NL |
| | |
| HEPES | Promo Cell, Heidelberg |
| DTT | Sigma, Deisenhofen |
| Complete Protease-Inhibitor | Boehringer, Mannheim |
| Ponceau S | |
| Tween 20 | |
| NP40 | |
| Na-Deoxycholat | |
| Tris | |
| EGTA | |
| SDS | |

Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien von den Firmen Merck (Darmstadt), Fluka (Neu-Ulm), Sigma (Deisenhofen), Roth (Karlsruhe) und Pharmacia (Freiburg) in *p.a.* Qualität bezogen.

2.1.9. Puffer

| | | |
|-------------|-------------|-----------------------------------------|
| TBS-Puffer | 10mmol/ l | Tris, pH 7,5 |
| | 0,1 mol/l | NaCl |
| PBS-Puffer | 167 mmol/l | NaCl |
| | 16 mmol/l | Na ₂ HPO ₄ |
| | 1,7 mmol/l | NaH ₂ PO ₄ |
| | pH | 7,4 |
| RIPA-Puffer | 50 mmol/l | Tris, pH 7,4 |
| | 1% (v/v) | NP40 |
| | 0,25% (v/v) | Na-Deoxycholat |
| | 150 mmol/l | NaCl |
| | 1 mmol/l | EGTA |
| | 1 mmol/l | Na ₃ VO ₄ |
| | 1 mmol/l | NaF |
| | | Complete Protease-Inhibitor |
| 2x Laemmli | 20% (v/v) | Glycerin |
| | 4% (w/v) | SDS |
| | 0,01% (w/v) | Bromphenolblau |
| | 5% (v/v) | β-Mercaptoethanol |
| | 125 mmol/l | Tris, pH 6,8 |
| 4x Laemmli | 40% (v/v) | Glycerin |
| | 8% (w/v) | SDS |
| | 0,02% (w/v) | Bromphenolblau |
| | 10% (v/v) | β-Mercaptoethanol |
| | 250 mmol/l | Tris, pH 6,8 |
| Waschpuffer | TBS-Puffer | |
| | | + 0,05% (v/v), bzw. 0,1% (v/v) Tween 20 |

| | | |
|----------------|----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| Blockierlösung | TBS-Puffer + 0,05% (v/v) Tween 20 + 10% (w/v) Magermilchpulver oder 1% (w/v) BSA | |
| Anode I | 300 mmol/ 20% (v/v) | Tris Methanol |
| Anode II | 25 mmol/l 20% (v/v) | Tris Methanol |
| Kathode | 40 mmol/l 0,01% (v/v) 20% (v/v) | 6-Aminohexansäure SDS Methanol |

2.1.10. Geräte

| | |
|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| Kleintierguillotine | Spezialanfertigung |
| Horizontal-Elektrophoresekammer | LKB 2117 Multiphor II Amersham Pharmacia, Freiburg |
| Semidry-Blot-Apparatur mit Graphitelektroden | NovaBlot, Amersham Pharmacia, Freiburg |
| Film-Remover LUMI Imager und Software | Amersham Pharmacia, Freiburg Boehringer, Mannheim |
| Turaxer | Jahnke Kunkel, Staufen |

2.2. METHODEN

2.2.1. Tier-OP und Gewebeentnahme

Zur Präparation wurden männliche Wistarratten in der Gewichtsklasse 260g – 320g (Harlan Winkelmann, Borcheln), und WOK.W Ratten (Univ. Greifswald), verwendet. Entnommen wurden drei verschiedene Skelettmuskeln - Quadriceps, Gastrocnemius und Soleus - sowie das ganze Herz. Hierzu wurde die Ratte zunächst durch eine intraperitoneale Injektion von Narcoren mit einer Dosis von 100 mg / kgKG narkotisiert. War die Narkose mit der Dosis nicht tief genug, musste nachinjiziert werden. Je nach Versuchszielsetzung wurde der Ratte dann 4U / kg Körpergewicht (KG) Insulin (Novo Nordisc) in die Schwanzvene injiziert und entsprechend lange gewartet (verschieden lange Stimulationszeiten wurden ausprobiert: 5 min, 10 min, 20 min). Das Tier wurde dann an den Füßen fixiert und der Bauchraum durch eine mediane Laparotomie eröffnet. Mittels einer Verlängerung der Schnittführung nach kranial wurde auch der Thorax eröffnet. Das Herz war nun sichtbar und konnte an den großen Gefäßen abgetrennt werden. Es wurde sofort im noch schlagendem Zustand mit einer Perfusorspritze mit 0,9%iger NaCl-Lösung durchspült, um die Bildung von Blutkoageln innerhalb des Herzens zu verhindern. Zu einer Tablette gepresst wurde es dann in flüssigem Stickstoff gefroren.

Danach wurde das Tier aus der Fixierung gelöst und die beiden Hinterbeine mit einer Kleintierguillotine abgetrennt. Es wurden jeweils Quadriceps, Gastrocnemius und Soleus auf Eis präpariert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Gewebe wurden, sofern nicht sofort weiterverarbeitet, bei minus 80°C gelagert.

2.2.2. Kultivierung humaner Skelettmuskelzellen

Die menschlichen Skelettmuskelzellen wurden in proliferierendem Zustand von der Firma Promo Cell geliefert. Die Zellen stammten von einem weiblichen, nicht diabetischen Patienten und wurden als Satellitenzellen isoliert.

Die Kultivierung dieser adhärent wachsenden Zellen erfolgte durch Aussäen von 10^6 Zellen in 10cm Petrischalen und anschließender Inkubation im

Brutschrank bei 37°C und Begasung von 5% CO₂. Das Kulturmedium wurde alle 2 – 3 Tage gewechselt. Nach ca. einer Woche waren die Myoblasten subkonfluent und konnten wie unter 2.2.3.2. beschrieben lysiert werden.

2.2.3. Herstellung von Lysaten

2.2.3.1. Lysis von Rattengewebe

Die wie in 2.2.1. beschrieben gewonnenen Gewebe wurden im gefrorenen Zustand mit 1 ml RIPA-Lysispuffer / 100 mg Gewebe (10 % w/v) versetzt und auf Eis 6 bis 8 mal mit dem Turaxer (Jahnke Kunkel, Staufen) homogenisiert. Dazwischen wurden Pausen von mind. 20 Sekunden eingehalten. Das Homogenat wurde in Eppendorf Gefäße überführt und 2 mal 30 min. bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert und entweder sofort weiterverarbeitet oder bei minus 80°C gelagert.

2.2.3.2. Stimulation und Lysis humaner Skelettmuskelzellen

Die menschlichen Skelettmuskelzellen wurden wie in 2.2.2. beschrieben kultiviert. Zur Weiterverarbeitung wurde zunächst das Medium abgesaugt, und die Zellen mit sterilem PBS gewaschen, um Reste von Wachstumsfaktoren zu entfernen, danach erfolgte eine 3-tägige Inkubation bei 37°C in je 10 ml FCS- und Insulinfreiem Medium. Schließlich wurde das Medium erneuert und zusätzlich mit 1% BSA versetzt, um die unspezifischen Bindungsanteile zu minimieren. Nach erneuter Inkubation von 2 h erfolgte eine eventuelle Stimulation mit Insulin. Hierzu wurden 10µl einer 10⁻⁴ M Stocklösung auf 10 ml Medium gegeben (final 10⁻⁷M) und für 2 min. im Brutschrank inkubiert. Die Stimulation wurde durch das Absaugen des Mediums unmittelbar gestoppt. Die Lysis der Zellen erfolgte auf Eis. Nach Absaugen des Mediums und Waschen mit eiskaltem PBS, um Insulinreste zu entfernen, wurden je 10 ml RIPA-Puffer auf die Schalen gegeben und 5 min. auf Eis stengelassen. Dann wurden die Zellen vollständig mit einem Zellschaber (Falcon, Essen) von der Oberfläche der Kulturschalen abgekratzt und in ein Eppendorf Gefäß überführt. Durch die nachfolgende zweistündige Inkubation der Zellsuspension bei 4°C in einem Überkopfschüttler wurden die Zellen durch die im RIPA-Puffer enthaltenen Detergentien solubilisiert.

Anschließend wurden die unlöslichen Zellbestandteile durch Zentrifugation bei 4°C und 14000 rpm über 20 min. abgetrennt. Der Überstand wurde auf den Proteingehalt getestet und sofort weiterverarbeitet.

2.2.4. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung der Zell- und Gewebelysate erfolgte mittels der Methode von Bradford (1976), mithilfe eines Bio-Rad-Proteinassays (Bio-Rad, München). Dem liegt eine Verschiebung der maximalen Extinktion von 465 nm auf 595 nm nach Proteinkomplexbildung des Coomassie Brilliant Blue G250-Farbstoffes zugrunde. Als Standardproteinlösung diente Rinderserumalbumin (1 mg/ml). Es wurden verschiedene Verdünnungsstufen sowohl von den Proben als auch von der Standardlösung angefertigt, die dann mit je 200 µl Farbstoffreagenz versetzt wurden. Nach ca. 10 min. Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 595 nm photometrisch gemessen, und die daraus resultierende Proteinkonzentration berechnet.

2.2.5. Immunopräzipitation

2.2.5.1. Immunopräzipitation von IRS-Proteinen

Nach der Lysis und der Messung des Proteingehaltes der humanen Skelettmuskelzellen erfolgte die Immunopräzipitation von IRS-1, IRS-2 und IRS-4. Hierzu wurden die Lysate mit RIPA-Puffer auf eine Proteinkonzentration von 1 mg/ml eingestellt und mit den entsprechenden Antiseren (10 µl Anti-IRS-1 und Anti-IRS-2, 5 µl Anti-IRS-4) versetzt. Als Trägerpartikel für diese Immunkomplexe wurden je 40 µl Protein A-Trisacryl Beads zugefügt, und alles bei 4°C über Nacht im Überkopfschüttler inkubiert. Die Immunopräzipitate wurden kurz bei 4°C und 14.000 rpm abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und aufbewahrt, und die Beads 3x kurz mit eiskaltem PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Immunopräzipitate, die Überstände und die Lysate entsprechend 2.2.6. vorbereitet und die Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt.

2.2.5.2. Immunopräzipitation von Phosphotyrosinen mit PY20

Die hier verwandten adulten Kardiomyozyten wurden in bereits lysiertem Zustand zur Verfügung gestellt (vgl. 2.1.5.). Die Lysate wurden auf eine Proteinkonzentration von 1,5 mg/ml mit steril filtriertem PBS eingestellt. Desweiteren wurden 40µl Complete Protease-Inhibitor zugesetzt (Boehringer, Mannheim). Es folgte eine Übernacht-Inkubation mit 10µl Agarose-konjugiertem PY20 sc-508 AC Anti-Phospho-Tyrosin Antikörper (Santa Cruz Biotechnology) bei 4°C im Überkopfschüttler. Das weitere Vorgehen erfolgte analog zu dem unter 2.2.5.1 und 2.2.6. beschriebenen Vorgehen. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden die Blot-Membranen über Nacht mit dem monoklonalen RC20 Antikörper inkubiert (vgl. 2.2.8.2.) und entsprechend auf Phosphotyrosine detektiert.

2.2.6. Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Die Auftrennung der Proteine erfolgte aufgrund ihrer Masse mittels SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS-Page) in einer Horizontal-Elektrophoresekammer (Amersham Pharmacia). Es wurden 0,5 mm dicke, foliengebundene Fertiggele (Excel Gel, Amersham Pharmacia) und Excel Pufferstreifen, Anode und Kathode (Amersham Pharmacia), eingesetzt. Die Lysate wurden auf eine einheitliche Proteinkonzentration eingestellt. Alle aufzutragenden Proben wurden mit modifiziertem 2x oder 4x Laemmli-Probenpuffer versetzt und 10 min. bei 95°C im Thermoblock unter ständigem Schütteln denaturiert. Nach kurzem Abkühlen auf Eis, Abzentrifugation und Auftragen auf das Gel, erfolgte die Elektrophorese bei 13,4°C mit einer Einlauf-Stromstärke von 30 mA, später bei konstanter Stromstärke von 50 mA und variabler Spannung bis maximal 600 V. Als Molekulargewichtsmarker wurden Proteinmischungen aus verschiedenen Referenzproteinen verwendet (Broad Range Marker; Prestained Broad Range Marker, New England Biolabs).

2.2.7. Proteintransfer auf Membranen

Nach dem Auftrennen der Proteine durch Gelelektrophorese wurden sie in einer Semidry-Blot-Apparatur mit Graphitelektroden auf eine PVDF-Membran

(Sigma, Deisenhofen) transferiert. Die Proteine wandern entlang der Feldlinien eines elektrischen Feldes, welches zwischen den beiden Elektrodenplatten angelegt wird, und werden so aus dem Gel auf die Membran transportiert. Hierzu wurden zunächst 18 Filterpapiere (Mukoll) auf Gelgröße zurechtgeschnitten, 6 davon in Anodenlösung I getränkt und auf die Anodenplatte gelegt. Das Gel wurde für 5 min. in Anodenlösung II äquilibriert, die Trägerfolie daraufhin mithilfe des Film-Removers vom Gel gelöst, jedoch noch nicht entfernt. Die PVDF-Blotmembran wurde zunächst in Methanol aktiviert und mit destilliertem Wasser abgespült, dann in Anodenlösung II äquilibriert und auf das Gel gelegt. 3 weitere in Anodenlösung II getränkte Filterpapiere wurden auf die Blotmembran gelegt, und das ganze Paket kopfüber auf die 6 bereits auf der Elektrodenplatte befindlichen Filterpapiere platziert. Die Trägerfolie wurde nun vom Gel entfernt, und 9 in Kathodenlösung getränkte Filterpapiere auf das Gel gelegt. Nach Entfernung von Luftblasen wurde das Paket mit der Kathoden-Graphitplatte abgedeckt. Der Proteintransfer erfolgte bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von etwa 50 min bei einer Stromstärke von $0,8 \text{ mA/cm}^2$ Gel, einer variablen Spannung bis maximal 20 V und einer variablen Leistung bis maximal 5 W.

2.2.8. Immunodetektion

2.2.8.1. Detektion mit verstärkter Chemilumineszenz (ECL)

Nach dem Western-Blot bzw. nach dem Strippen (vgl. 2.2.9.) wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur in 20 ml Blockierlösung (TBS + Tween (=TBST) + 10% (w/v) Milchpulver) auf dem Taumelmischer inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Es folgte eine Über-Nacht-Inkubation in gleicher Lösung mit 5% (w/v) Magermilchpulver und spezifischem Antiserum bei 4°C . Dann wurde die Membran 1 h unter ständigem Schütteln und mehrfachem Wechseln des Puffers bei Raumtemperatur mit TBST gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper (Anti-Rabbit, 1:10000) in TBST mit 3% (w/v) Milchpulver bei Raumtemperatur für 1,5 h auf dem Taumelmischer. Nach erneutem Waschen mit TBST über 1 h wurde die Membran schließlich für 10 min. in einer 1:1-Mischung aus ECL-Substrat- und Verstärkerlösung (Pierce,

USA) inkubiert und mithilfe des LUMI-Imagers und entsprechender Software (Boehringer, Mannheim) eingelesen, analysiert und quantifiziert.

2.2.8.2. Phospho-Tyrosinnachweis

Die Detektion der Tyrosin-Phosphorylierungen an Proteinen erfolgte mit dem rekombinanten, monoklonalen Antikörper RC20 (Transduction Laboratories, Lexington, USA). Hierbei ist der sekundäre Antikörper schon direkt an die Merrettich-Peroxidase gekoppelt, wodurch eine Inkubation mit einem Zweitantikörper entfällt. Nach dem Blotten wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur und unter ständigem Schütteln in Blockierlösung (TBST + 1% (w/v) BSA) inkubiert, und über Nacht mit dem in gleicher Lösung im Verhältnis 1:10000 gelösten RC20 bei 4°C auf dem Taumelmischer inkubiert. Das weitere Vorgehen, erneutes Waschen und ECL-Detektion, wurde wie unter 2.2.8.1. beschrieben durchgeführt.

2.2.9. Strippen der Blotmembran

Um Blotmembranen, die bereits in dem ECL-System inkubiert worden sind, erneut verwenden zu können, wurde das Western Blot Recycling Kit (Biotrend, Köln) angewendet. Diese spezielle Antikörper-strip-Lösung wurde 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt, und die Membran für 15 min. bei Raumtemperatur auf dem Rollenmischer darin inkubiert. Dabei wurde sowohl der primäre Antikörper, als auch das Enzym-Konjugat wieder von den Proteinen abgetrennt. Anschließend wurde die Membran erneut in Blockierlösung (TBST + 10% (w/v) Milchpulver) inkubiert und wie unter 2.2.8.1. und 2.2.8.2. beschrieben weiterbehandelt.

2.2.10. Ponceau S-Färbung

Nach Beendigung des Proteintransfers wurden die Membranabschnitte mit den Molekulargewichtsmarkern für ca. 15 min. bei Raumtemperatur auf dem Taumelmischer in Ponceau S Färbelösung inkubiert. Hierbei wurden unspezifisch alle Proteinbanden angefärbt. Die Membranen wurden dann mehrmals kurz mit destilliertem Wasser abgespült und an der Luft getrocknet. Diese Färbetechnik ist reversibel.

2.2.11. Auswertung der Daten und Statistik

Die Daten sind grundsätzlich als Mittelwerte und deren Standardabweichung (\pm SEM) dargestellt. Zur Berechnung der statistischen Signifikanzen wurde das Computerprogramm „t-ease“ (ISI, Philadelphia, USA) verwendet, welches auf dem t-test nach Student für gepaarte bzw. ungepaarte Daten beruht. Es wurde eine Signifikanzgrenze von $p < 0,05$ festgelegt.

3. ERGEBNISSE

3.1. IRS-4 Expression in Muskelgeweben der Ratte

3.1.1. Wistar

Für die folgenden Versuchsreihen wurden männliche Wistar Ratten, Typ Hannover, mit einem Gewicht von 260 bis 320 Gramm benutzt (Harlan-Winkelmann, Borcheln). Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Futter.

Das Insulinrezeptorsubstrat-4, IRS-4, sollte in verschiedenen Geweben der Wistar Ratte nachgewiesen werden. Dies ist auf mRNA Ebene bereits einigen Arbeitsgruppen gelungen. Nun sollte auch die Expression des Proteins untersucht werden, und zwar in verschiedenen Muskelgeweben der Ratte. Es wurden hierzu zunächst die Skelettmuskeln Quadriceps, Gastrocnemius und Soleus verwendet, und Lysate sowohl vom ganzen Herzen als auch von frisch präparierten adulten Kardiomyocyten.

Wie in 2.2.6. beschrieben sind die Proteine ihrer Grösse entsprechend aufgetrennt worden. Die einzelnen Proben sind doppelt aufgetragen worden, wobei die Western-Blots einer Versuchsreihe mit dem Anti-IRS-4 Antikörper inkubiert wurden, die andere Reihe mit dem selben Antikörper, welcher jedoch vorher durch ein Blocking Peptide inaktiviert wurde, so dass dieser nicht mehr an das IRS-4 binden konnte. So war es möglich, eindeutig eine Bande dem IRS-4 zuzuordnen.

Abbildung 3 zeigt die Expression von IRS-4 im Immunoblot in Soleus-, Herz-, Quadriceps- und Gastrocnemius - Lysaten aus Wistar Ratten, je 4 n, detektiert jeweils mit aktivem und blockiertem primären Antikörper. Hier konnte gezeigt werden, dass IRS-4 im Soleus und im Herzen in gut detektierbaren Mengen exprimiert wird. Im Gastrocnemius und im Quadriceps konnte keine der Banden dem IRS-4 zugeordnet werden. Es wird in diesen Muskeln also nicht exprimiert, bzw. die Expression ist so schwach, dass das Protein mit Hilfe dieser Methode nicht nachgewiesen werden kann. Zusätzlich zum ganzen Herzen wurden auch frisch präparierte adulte

Kardiomyocyten auf ihre IRS-4 Expression untersucht. Wie Abbildung 4 zu entnehmen ist, wird es auch hier stark exprimiert.

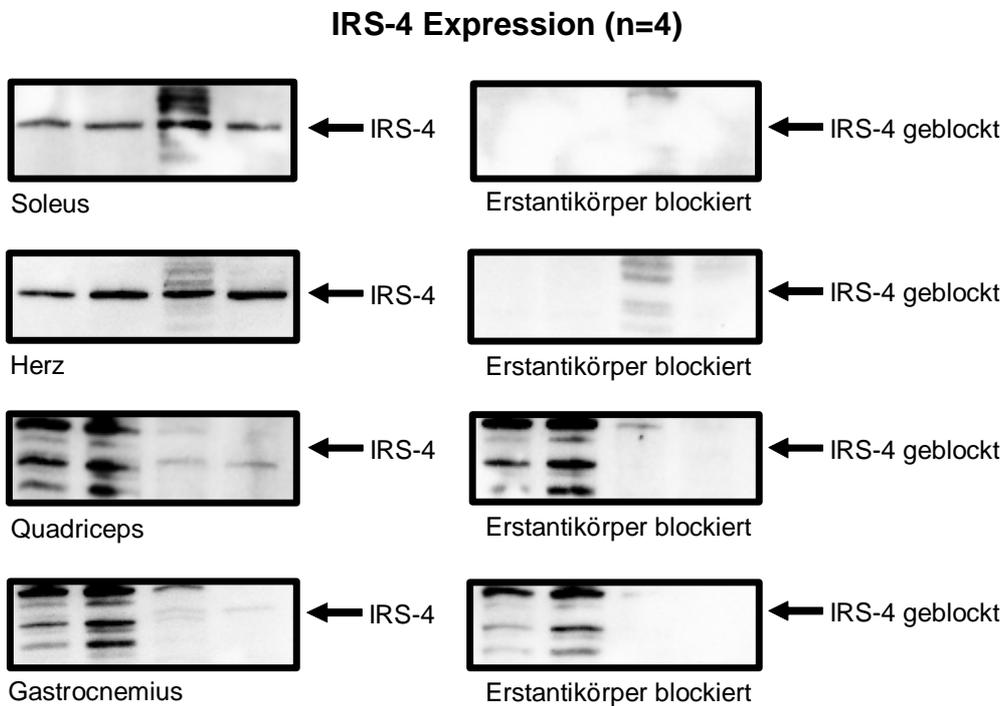


Abbildung 3: IRS-4 Expression in verschiedenen Muskelgeweben der Wistar Ratte

IRS-4-Expression in Soleus, Herz, Quadriceps und Gastrocnemius von Wistar Ratten. Es wurden je 4n mit jeweils 20 μ g Gesamtprotein bei Soleus und Herz, und je 5 μ g Gesamtprotein bei Quadriceps und Gastrocnemius aufgetragen. Detektion mit Anti-IRS-4 AK (linke Spalte) und blockiertem Antiserum (rechte Spalte). Nachweis von IRS-4 in Soleus und Herzmuskelgewebe, kein Nachweis in Quadriceps und Gastrocnemius.

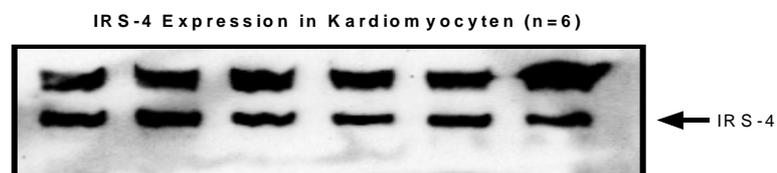


Abbildung 4: IRS-4 Expression in isolierten Kardiomyocyten der Wistar Ratte

Nachweis der IRS-4 Expression in isolierten adulten Kardiomyocyten von Wistar Ratten. Aufgetragen wurden 6n mit je 20 μ g Gesamtprotein, Detektion mit Anti-IRS-4 AK.

Ein quantitativer Vergleich der Expression von IRS-4 zwischen Soleus und Herz Lysaten zeigte nahezu eine 2.5fach höhere Expression im Herzen als im Soleus (siehe Abb. 5).

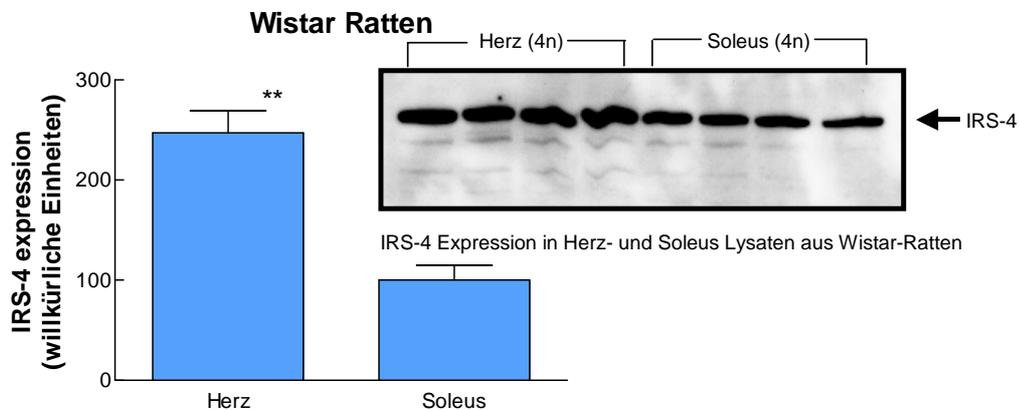


Abbildung 5: Vergleich der IRS-4 Expression in Herz und Soleus der Wistar Ratte

Quantitativer Vergleich der IRS-4 Expression in Herz und Soleus von Wistar Ratten. Aufgetragen wurden je 4n mit jeweils 20µg Gesamtprotein. Detektion mit Anti-IRS-4 AK. Es besteht eine 2.47fach höhere Expression von IRS-4 im Herzmuskelgewebe, signifikant unterschiedlich zum M. soleus mit $p=0,0015$.

3.1.2. WOK.W

Die Wistar Ottawa Karlsburg W Ratten stellen ein Tiermodell dar, die ein vollständiges metabolisches Synrom aufweisen. Dieses ist charakterisiert durch Hypertension, definiert als erhöhter systolischer Blutdruck, Dyslipidämie, definiert als erhöhte Plasma-Triglyceride und/oder niedriges HDL-Cholesterin, Obesity, definiert als erhöhter BMI, und Mikroalbuminurie (Alberti und Zimmet, 1998). Der Entwicklung dieses Tiermodells geht die Erkenntnis voraus, dass die BioBreeding Ratten (BB) homozygot für den RT1^u Haplotyp sind. Dies ist ein prädisponierender Faktor für die Entwicklung eines Diabetes in diesen Tieren. Der Wistar Outbred Stock hingegen ist heterozygot für die Haplotypen RT1^a und RT1^u. Aus diesen Tieren wurden zwei neue Linien gezüchtet: eine, die den Haplotyp RT1^a trägt, WOK.1A (Diabetes-resistent), und eine, die den Haplotyp RT1^u trägt, WOK.1W (Kovács et al., 1997). Diese Tiere fielen durch einen polygenetisch bedingten Phänotyp auf, sie entwickelten Hypertonie, Dyslipidämie (erhöhte Serum-Triglyceride und Gesamt-Cholesterin), Obesity, erhöhte Serum-Leptinspiegel,

herabgesetzte Glukosetoleranz, Insulinresistenz, Proteinurie und verminderte Creatinin-Clearance, jedoch keinen Diabetes (van den Brandt et al., 2002).

Mit den Geweben dieses Tiermodells wurde genauso verfahren wie mit denen der Wistar Ratten. Soleus, Gastrocnemius, Quadriceps und das Herz wurden entnommen und die Lysate mittels Gelelektrophorese und Immunoblot auf IRS-4 Expression untersucht. Die Ergebnisse zeigten genau dasselbe Verteilungsmuster wie auch schon bei Wistar Ratten. Das IRS-4 wird sowohl im Herzen als auch im Soleus exprimiert, jedoch nicht in Gastrocnemius und Quadriceps (siehe Abb. 6).

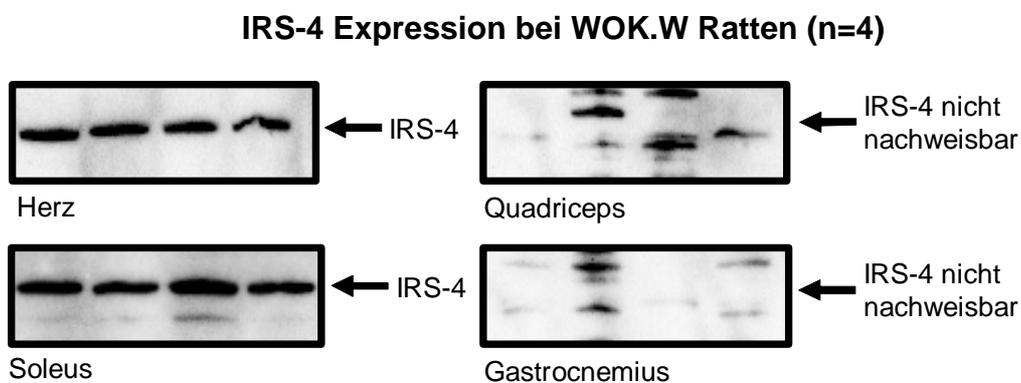


Abbildung 6: IRS-4-Expression in verschiedenen Muskelgeweben der WOK.W Ratte

IRS-4-Expression in Soleus, Herz, Quadriceps und Gastrocnemius von WOK.W Ratten. Es wurden je 4n mit jeweils 20 μ g Gesamtprotein bei Soleus und Herz, und je 5 μ g Gesamtprotein bei Quadriceps und Gastrocnemius aufgetragen. Detektion mit Anti-IRS-4 AK. Nachweis von IRS-4 in Soleus und Herzmuskelgewebe, kein Nachweis in Quadriceps und Gastrocnemius.

3.1.3. Vergleich der Expression zwischen Wistar und WOK.W

Wistar und WOK.W Ratten exprimieren IRS-4 in denselben Geweben. Jedoch unterscheiden sich die beiden Tiermodelle stark in ihren metabolischen Funktionen. Die WOK.W Ratten weisen zum Beispiel unter anderem eine Insulinresistenz auf. Um herauszufinden, ob sich dies auch auf die Expression von IRS-4 in der Muskulatur, dem wichtigsten Gewebe im Glucose-Metabolismus, auswirkt, wurde die IRS-4 Expression in den beiden Muskeltypen, Soleus und Herz, von Wistar und WOK.W Ratten quantitativ verglichen. Abb. 7 zeigt, dass dies in der Tat der Fall ist. In der selben Menge Gesamtprotein ist bei WOK.W Ratten verglichen mit Wistar Ratten

nur etwa halb so viel IRS-4 im Herzen, und ca. 5 mal weniger IRS-4 im Soleus nachgewiesen worden.

Abbildung 7A



Abbildung 7: Vergleich der IRS-4 Expression zwischen Wistar und WOK.W Ratten

Abb. 7A: Quantitativer Vergleich der IRS-4 Expression in Herz-Lysaten von Wistar und WOK.W Ratten. Aufgetragen wurden je 4n mit jeweils 20µg Gesamtprotein. Detektion mit Anti-IRS-4 AK. Es besteht eine 2.06fach höhere Expression von IRS-4 im Herzmuskelgewebe von Wistar Ratten als bei WOK.W Ratten. Signifikant unterschiedlich mit $p=0.0197$.

Abbildung 7B

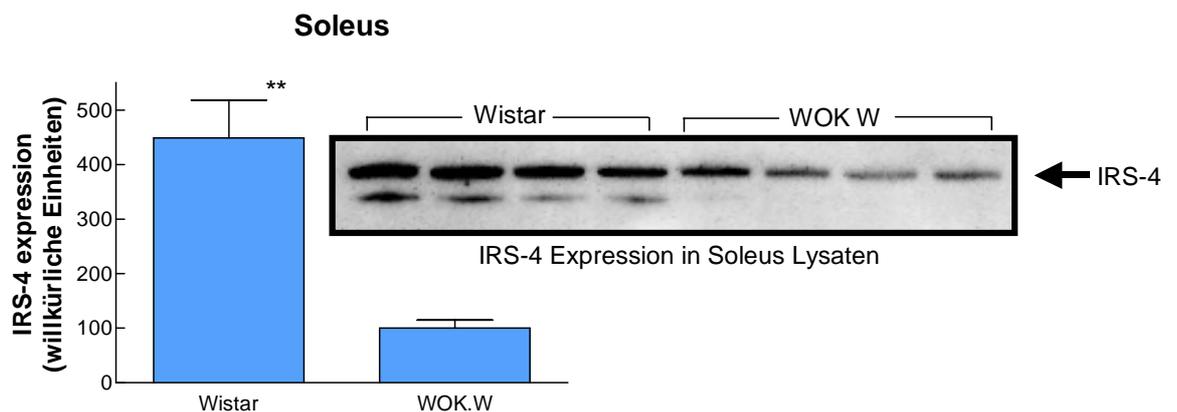


Abb. 7B: Quantitativer Vergleich der IRS-4 Expression in Soleus-Lysaten von Wistar und WOK.W Ratten. Aufgetragen wurden je 4n mit jeweils 20µg Gesamtprotein. Detektion mit Anti-IRS-4 AK. Es besteht eine 4.49fach höhere Expression von IRS-4 im Soleusmuskelgewebe von Wistar Ratten als bei WOK.W Ratten. Signifikant unterschiedlich mit $p=0.0026$.

Um zu zeigen, dass die Downregulation von IRS-4 im Muskelgewebe der WOK.W Ratten Protein-spezifisch ist, wurde in den selben Geweben die

Expression von IRS-1 und IRS-2 in Wistar und WOK.W Ratten quantitativ verglichen. Die Abbildungen 8 und 9 zeigen, dass die IRS-1 Expression im Herzmuskelgewebe beider Rattentypen gleich ist, im Soleus ist sie bei WOK.W Ratten auf ca. 1/3 erniedrigt. Die IRS-2 Expression ist sowohl im Herzmuskelgewebe als auch im Soleus bei Wistar und WOK.W Ratten gleich.

Abbildung 8A

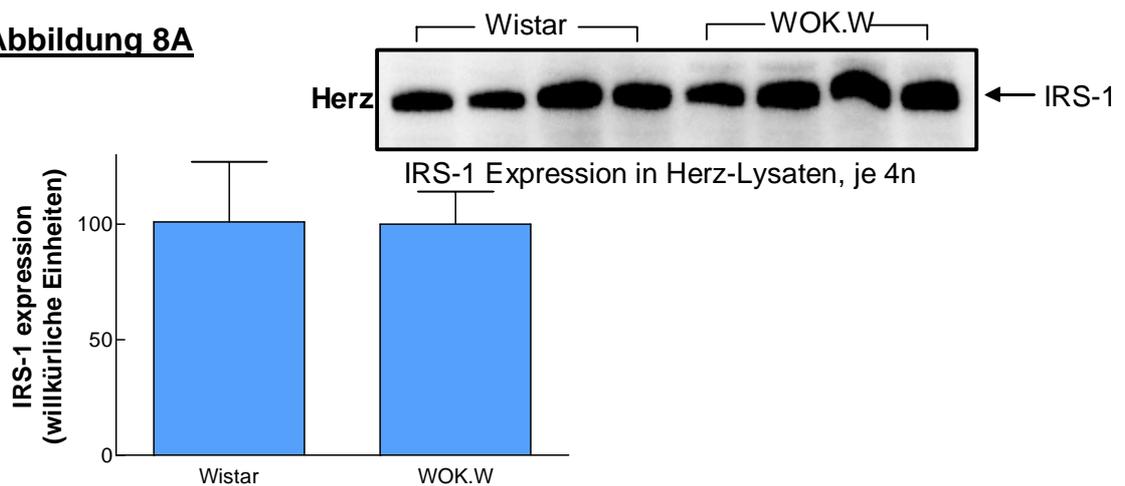


Abbildung 8: Vergleich der IRS-1 Expression zwischen Wistar und WOK.W Ratten

Abb. 8A: Quantitativer Vergleich der IRS-1 Expression in Herz-Lysaten von Wistar und WOK.W Ratten. Aufgetragen wurden je 4n mit jeweils 20µg Gesamtprotein. Detektion mit Anti-IRS-1 AK. Es besteht keine signifikant höhere Expression von IRS-1 im Herzmuskelgewebe von Wistar Ratten als bei WOK.W Ratten. Der p-Wert beträgt 0.9754.

Abbildung 8B

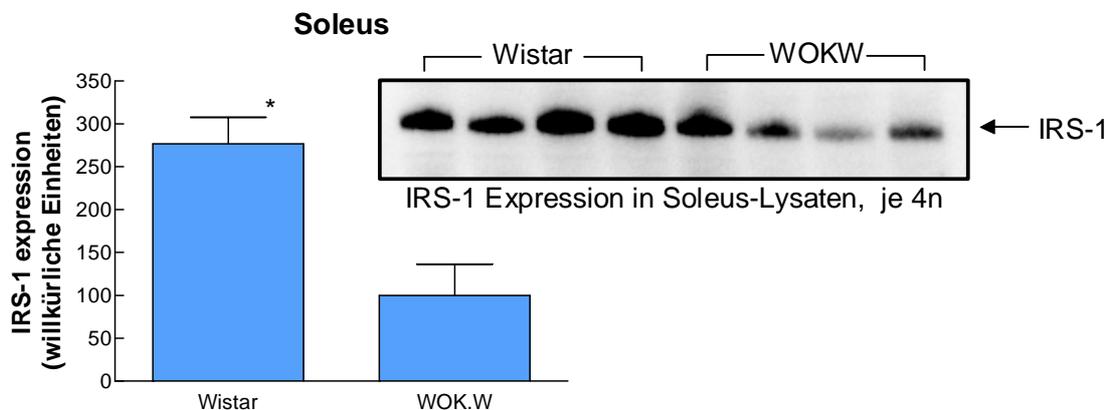


Abb. 8B: Quantitativer Vergleich der IRS-1 Expression in Soleus-Lysaten von Wistar und WOK.W Ratten. Aufgetragen wurden je 4n mit jeweils 20µg Gesamtprotein. Detektion mit Anti-IRS-1 AK. Es besteht eine 2.77fach höhere Expression von IRS-1 im Soleusmuskelgewebe von Wistar Ratten als bei WOK.W Ratten. Signifikant unterschiedlich mit p= 0.0188.

Abbildung 9A

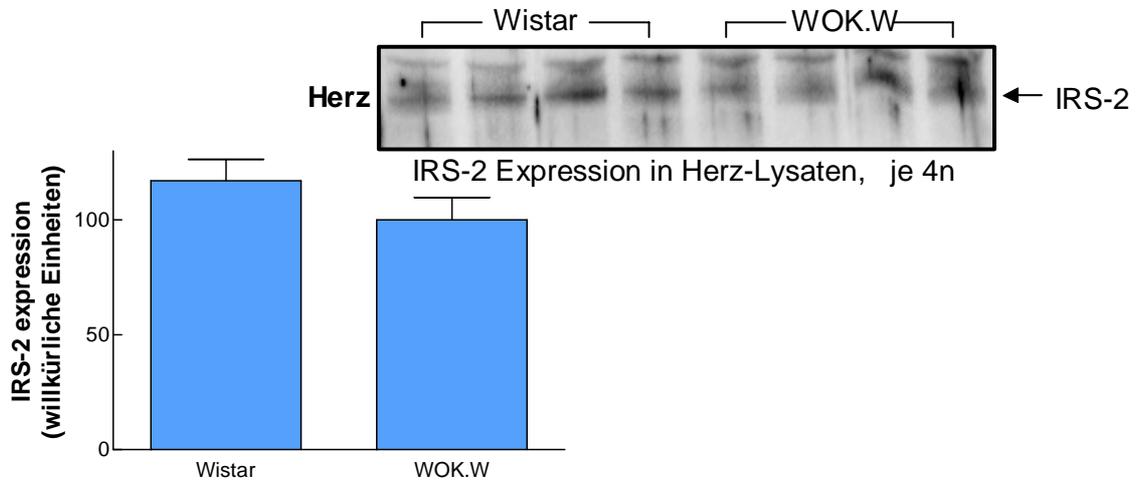


Abbildung 9: Vergleich der IRS-2 Expression zwischen Wistar und WOK.W Ratten

Abb. 9A: Quantitativer Vergleich der IRS-2 Expression in Herz-Lysaten von Wistar und WOK.W Ratten. Aufgetragen wurden je 4n mit jeweils 20µg Gesamtprotein. Detektion mit Anti-IRS-2 AK. Es besteht keine signifikant höhere Expression von IRS-2 im Herzmuskelgewebe von Wistar Ratten als bei WOK.W Ratten. Der p-Wert beträgt 0.2528.

Abbildung 9B

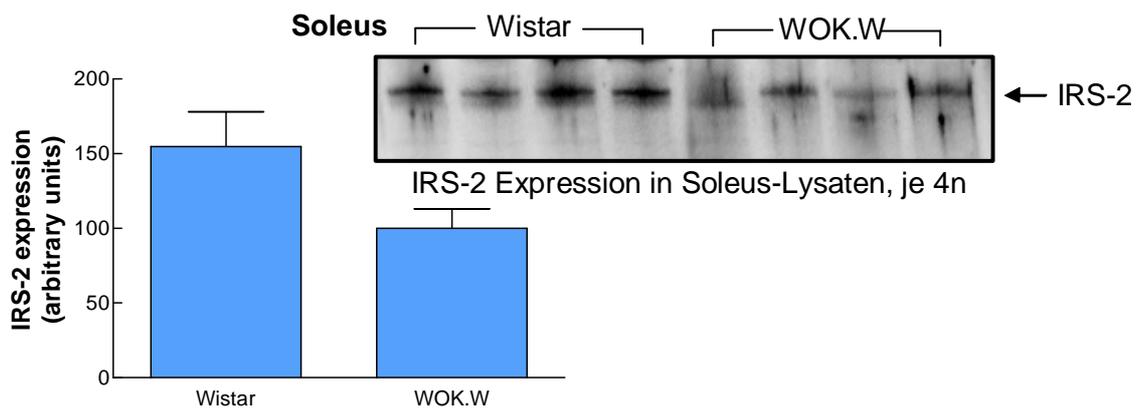


Abb.9B: Quantitativer Vergleich der IRS-2 Expression in Soleus-Lysaten von Wistar und WOK.W Ratten. Aufgetragen wurden je 4n mit jeweils 20µg Gesamtprotein. Detektion mit Anti-IRS-2 AK. Es besteht keine signifikant höhere Expression von IRS-2 im Soleusmuskelgewebe von Wistar Ratten als bei WOK.W Ratten. Der p-Wert beträgt 0.0862.

3.1.4. Tyrosin-Phosphorylierung von IRS-4 nach Insulinstimulus

In HEK 293 Zellen (Humane Embryonale Kidney Zellen), wo das IRS-4 ursprünglich entdeckt wurde, unterliegt es nach Insulin-Stimulus einer rapiden Tyrosin-Phosphorylierung. Dieser Effekt sollte nun ebenfalls an den entsprechenden IRS-4 exprimierenden Muskelgeweben untersucht werden. Die Wistar Ratten wurden *in vivo* mit Insulin stimuliert, indem sie unter Narkose 4 U pro kg Körpergewicht (KG) in die Schwanzvene injiziert bekamen. Um eine Phosphorylierung nachzuweisen, wurden aus den Lysaten wie in 2.2.5. beschrieben Immunopräzipitate angefertigt. Zunächst sollten IRS-4 Präzipitate, die dann im zweiten Schritt auf Phospho-Tyrosine untersucht werden sollten, hergestellt werden. Dies gelang trotz mehrfacher Versuchswiederholung und Modifikationen in der Methodik nicht. Abbildung 10 zeigt einen solchen Versuch.

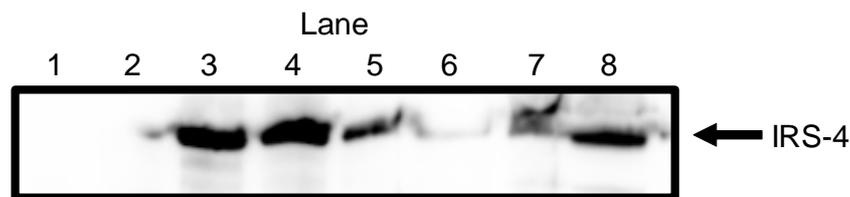


Abbildung 10: IRS-4-Immunopräzipitate aus Herz-Lysaten und HEK 293-Zellen

Immunopräzipitate mit Anti-IRS-4 AK aus Herz-Lysaten von Wistar Ratten und HEK 293 Zellen (HEK-Zellen – Humane Embryonale Knidney Zellen). Detektion mit Anti-IRS-4 AK.
 Lane 1 und 2: IP's aus Herz-Lysaten von Wistar Ratten
 Lane 3 und 4: IP's aus HEK 293-Zellen
 Lane 5 und 6: Überstände von 1 und 2
 Lane 7 und 8: Überstände von 3 und 4

In dieser Versuchsanordnung wurden Immunopräzipitate aus Herz Lysaten von Wistar Ratten hergestellt. Als Kontrolle dienten HEK 293 Zellen. Der IRS-4 Antikörper band sehr gut an das IRS-4 in den Lysaten der HEK Zellen, jedoch gar nicht in denen der Rattenherzen. Wiederholte Versuche IRS-4 Immunopräzipitate aus Ratten Geweben herzustellen schlugen fehl, letztendlich stellte sich heraus, dass der IRS-4 Antikörper nicht geeignet ist, Ratten-IRS-4 in der IP zu erkennen und zu binden.

Daraufhin wurde versucht zunächst die Phospho-Tyrosine zu präzipitieren, und erst sekundär auf IRS-4 zu detektieren. Jedoch war auch so kein Tyrosin-phosphoryliertes IRS-4 nachweisbar.

Die Abbildung 11 zeigt am Beispiel von frisch präparierten Kardiomyocyten von Wistar Ratten, dass der Antikörper zwar Phospho-Tyrosine präzipitiert hat, die Detektion auf IRS-4 wies jedoch kein IRS-4 in der IP nach, weder im basalen, noch im stimulierten Zustand.



Abbildung 11: Phospho-Tyrosin-Immunopräzipitate aus frischen Kardiomyocyten

Immunopräzipitate aus adulten, isolierten Kardiomyocyten aus Wistar Ratten mit Anti-Phospho-Tyrosin AK PY20. Aufgetragen wurde jeweils im basalen und im Insulin-stimulierten Zustand die Lysate, die IP's und deren Überstände. Detektion mit Anti-IRS-4 AK und Anti-Phospho-Tyrosin AK. Kein Nachweis von phosphotyliertem IRS-4.

3.2. IRS-4 Expression in humanen Skelettmuskelzellen

Die Skelettmuskelzellen wurden im proliferierenden Myoblastenstadium von der Firma Promo Cell geliefert. Sie stammten vom M. rectus abdominis eines 10-jährigen Mädchens kaukasischer Rasse. Chronische Erkrankungen, darunter auch Diabetes mellitus, und eine positive Diabetes – Familienanamnese wurden ausgeschlossen. Diese Zellen wurden bis zur Konfluenz weiter kultiviert, trypsinisiert und wieder ausgesät. Nach 2 Passagen wurden die Zellen geerntet und bis zum weiteren Gebrauch als gefrorene Aliquots mit 2×10^6 Myoblasten gelagert. (Dietze et al., 2002). Dieses Zellsystem wurde ebenfalls auf dessen Expression von IRS-4 untersucht. In Vorversuchen sind sowohl ausdifferenzierte Myotuben, als auch Myoblasten, also nicht differenzierte Myozyten, getestet worden. Hier zeigte sich, dass beide Differenzierungsstufen IRS-4 exprimieren, das Signal war in den Myotuben jedoch sehr schwach, weshalb für die weiteren Versuche die Skelettmuskelzellen nur noch im Blastenstadium verwendet wurden.

3.2.1. Tyrosin-Phosphorylierung von IRS-4 nach Insulinstimulus - Insulin-Zeitreihe an IRS-4 Immunopräzipitaten aus humanen Skelettmuskelzellen

Nachdem in den Muskelgeweben der Ratte keine Phosphorylierung von IRS-4 nachgewiesen werden konnte, und in HEK 293 Zellen IRS-4 einer rapiden Tyrosin-Phosphorylierung nach Insulinstimulus unterliegt, war es von grossem Interesse, ob dies auch in menschlichem Skelettmuskelgewebe der Fall ist. Um das zu testen, wurden die Myoblasten wie in 2.2.2. und 2.2.3.2. beschrieben vorbehandelt und mit Insulin stimuliert. Abbildung 12 zeigt das Ergebnis eines solchen Versuchsaufbaus.

Die Zellen sind unterschiedlich lange stimuliert worden. Es wurden die Zeiten 2.5 Minuten, 5 Minuten, 10 Minuten und 30 Minuten gewählt. Der Basalwert diente zur Kontrolle, diese Zellen wurden nicht stimuliert. Anschliessend wurden Immunopräzipitate mit dem IRS-4 Antikörper hergestellt. Hier, am humanen Material, funktionierte das sehr gut, doch phosphoryliertes IRS-4 konnte nach keiner der Stimulierungen nachgewiesen werden.

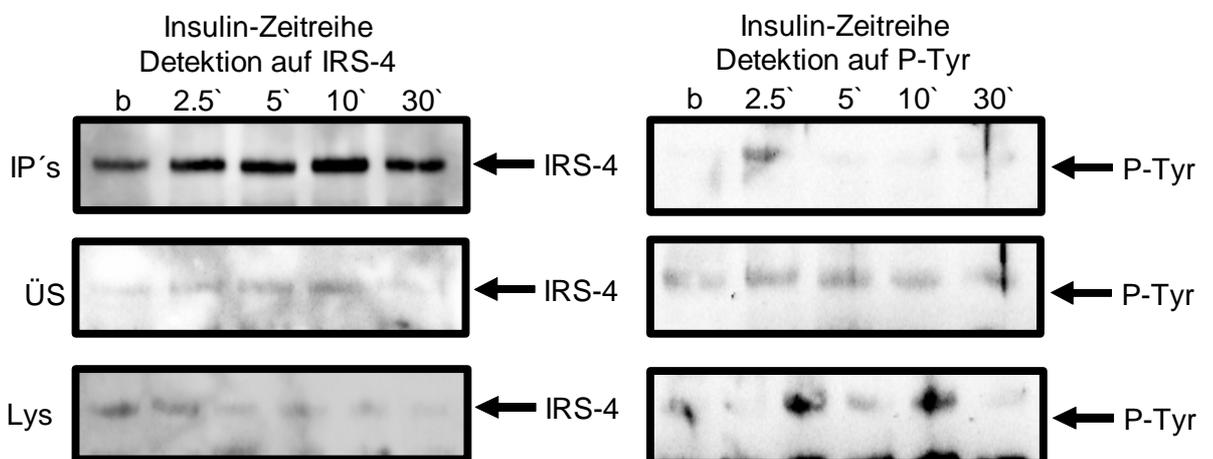


Abbildung 12: IRS-4 Immunopräzipitate aus humanen Skelettmuskelzellen

Immunopräzipitate aus humanen Skelettmuskelzellen im Blastenstadium mit Anti-IRS-4 Ak. Die Zellen wurden in einer Zeitreihe (basal, 2.5 Min., 5 Min., 10 Min., 30 Min.) mit Insulin stimuliert. Aufgetragen sind jeweils die IP's, deren Überstände (ÜS) und die Lysate (Lys). Detektion mit Anti-IRS-4 AK (linke Spalte) und Anti-Phospho-Tyrosin AK (rechte Spalte). Kein Nachweis von phosphoryliertem IRS-4.

3.2.2. IRS-4 und IRS-2 Tyrosin-Phosphorylierung

Vorangegangene Studien unserer Arbeitsgruppe an diesem Zelltyp zeigten bereits, dass die Myoblasten humaner Skelettmuskelzellen die Proteine IRS-1 und IRS-2 stark exprimieren (Rakatzki et al., 2003), und diese auch nach Insulinstimulus phosphoryliert werden. Die folgende Abbildung (Abb. 13) zeigt erneut Immunopräzipitate aus Myoblasten. Zum einen wurde IRS-4 präzipitiert, zum anderen IRS-2, beide jeweils aus basalen und insulinstimulierten Zellen (2 Minuten). Beide Proteine wurden einwandfrei präzipitiert. Die Zunahme des Phospho-Tyrosin-Signals der IRS-2-Bande beweist, dass die Stimulation der Zellen adäquat funktionierte. Eine IRS-4 Tyrosin-Phosphorylierung fand nicht statt.

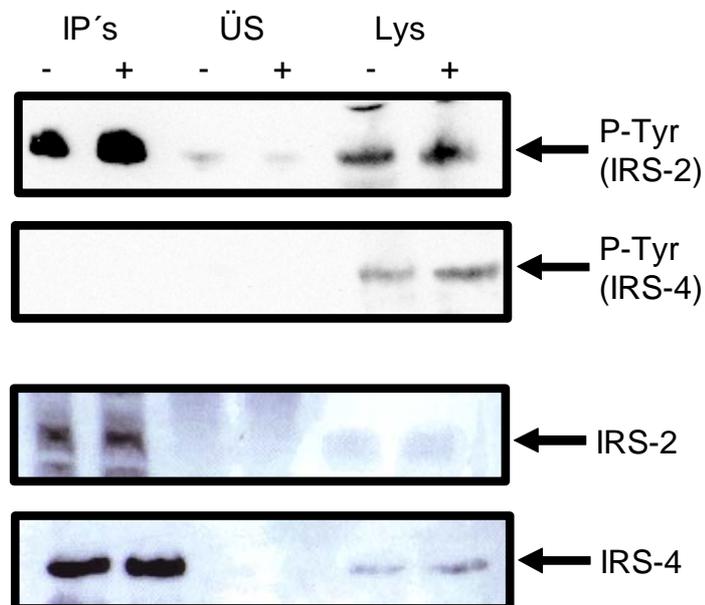


Abbildung 13: Immunopräzipitate aus humanen Skelettmuskelzellen mit Anti-IRS-2 und Anti-IRS-4 Antikörper

Immunopräzipitate aus humanen Skelettmuskelzellen im Blastenstadium mit Anti-IRS-2 und Anti-IRS-4 AK. Die Zellen wurden je basal und 2 Minuten insulinstimuliert aufgetragen. Dargestellt sind jeweils die IP's, deren Überstände und die Lysate. Detektion mit Anti-Phospho-Tyrosin AK (oben) und Anti-IRS-2 und Anti-IRS-4 AK (unten). Nachweis der Phosphorylierung von IRS-2, kein Nachweis von phosphoryliertem IRS-4.

3.2.3. Tyrosin-Phosphorylierung von IRS-4 nach Stimulierung der humanen Skelettmuskelzellen mit Insulin, IGF-1 und hyperosmolarem Stress

In vergangenen Studien wurde bereits beschrieben, dass die IGF-1 Signalweiterleitung eine Rolle bei der Tyrosin-Phosphorylierung des IRS-4 spielt (Qu et al., 1999).

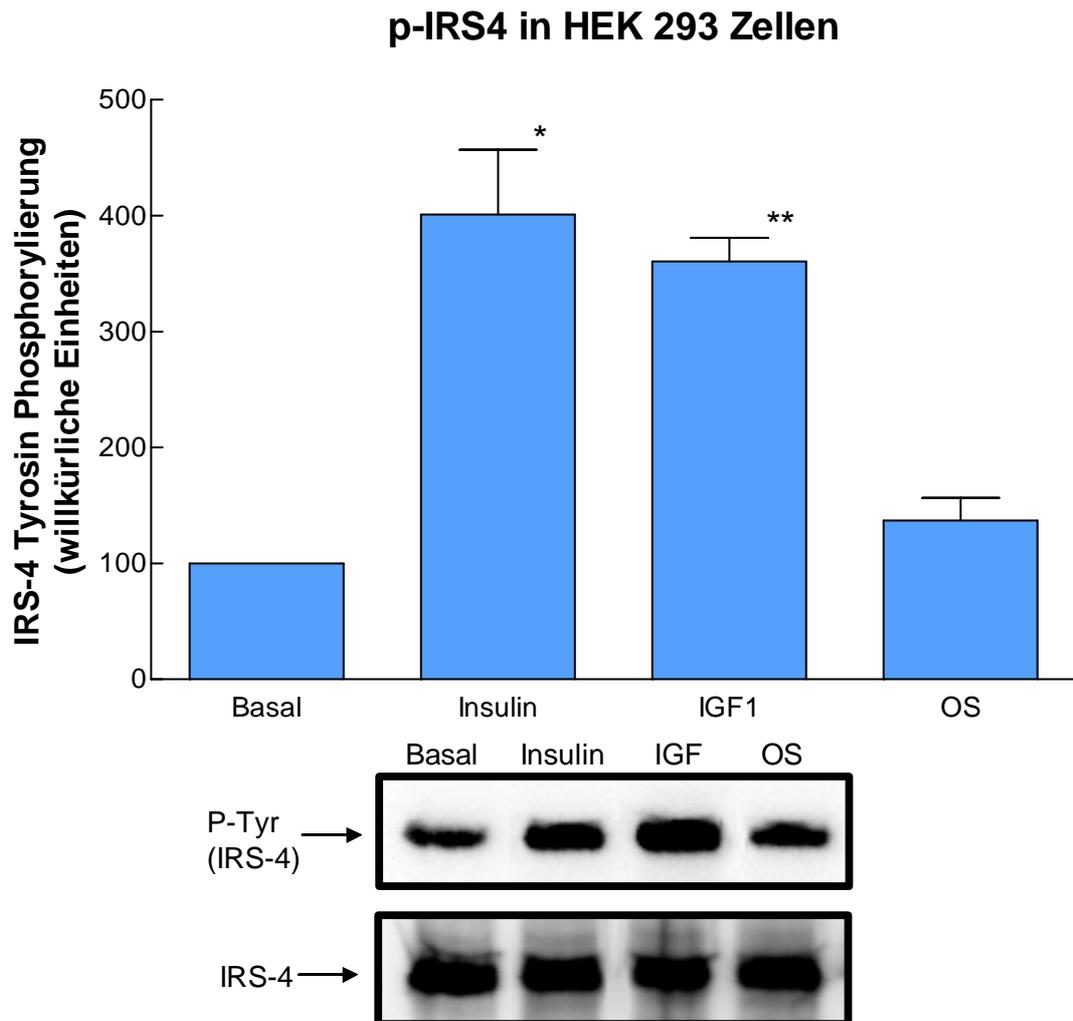


Abbildung 14: IRS-4 Tyrosin-Phosphorylierung nach verschiedenen Stimuli in HEK 293 Zellen

Immunopräzipitate aus HEK 293 Zellen mit Anti-IRS-4 AK. Die Zellen wurden verschiedenen Stimuli ausgesetzt: basal, insulinstimuliert (10^{-7} M), IGF-1-stimuliert (100 nM), und Osmotic Shock (Mannitol, 500 mM). Detektiert wurde mit Anti-Phospho-Tyrosin AK (oberer Teil der Blots) und mit Anti-IRS-4 AK (unterer Teil der Blots).

Es besteht eine 4.01fache, signifikante Erhöhung des Phospho-IRS-4-Anteils nach Insulinstimulus gegenüber dem Basalwert (der p-Wert beträgt 0.0057).

Es besteht eine 3.6fache, signifikante Erhöhung des Phospho-IRS-4-Anteils nach IGF-1 Stimulus gegenüber dem Basalwert (der p-Wert beträgt 0.0031).

Es besteht keine signifikante Erhöhung des Phospho-IRS-4-Anteils nach Osmotic Shock.

Um diesen Effekt auch an menschlichen Skelettmuskeln zu untersuchen, wurden diese im Blastenstadium mit IGF-1 und Insulin stimuliert (Abb. 15). Parallel dazu wurde der selbe Versuch mit HEK 293 Zellen durchgeführt (Abb. 14). Hier zeigten die Ergebnisse wie erwartet eine starke Zunahme an Phospho-IRS-4 (jeweils 3-4-fach) nach Insulin und IGF-1 Stimulierung in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Lienhard et al. (Fantin et al., 1998).

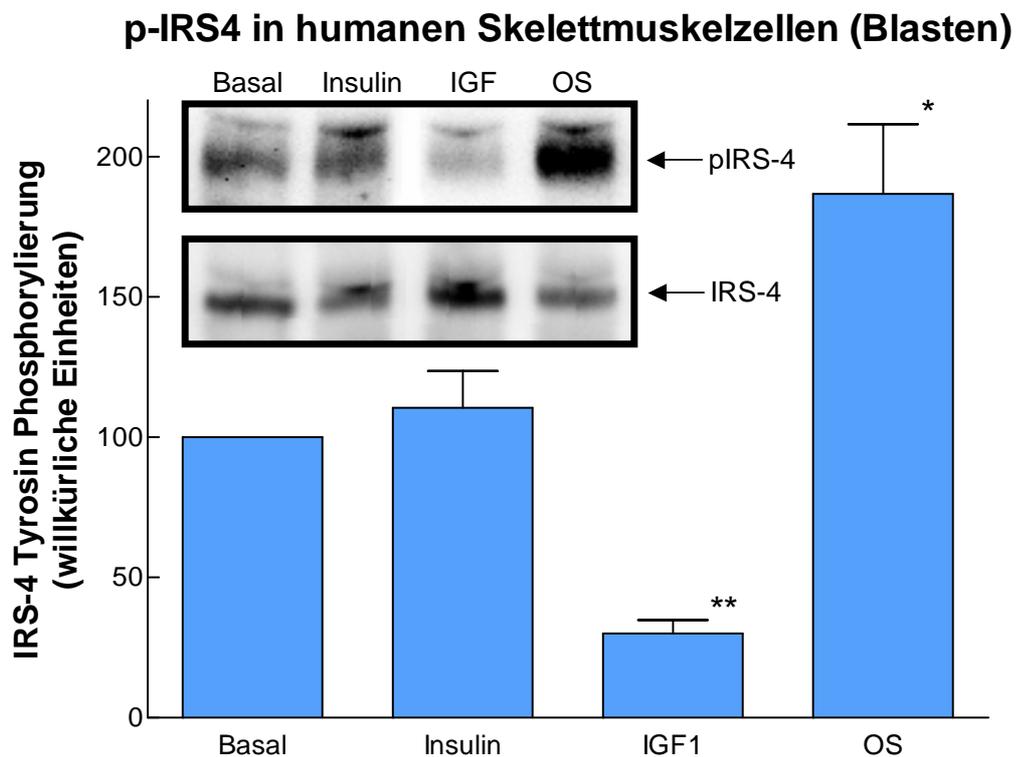


Abbildung 15: IRS-4 Tyrosin-Phosphorylierung nach verschiedenen Stimuli in humanen Skelettmuskelzellen

Immunopräzipitate aus humanen Skelettmuskelzellen im Blastenstadium mit Anti-IRS-4 AK. Die Zellen wurden verschiedenen Stimuli ausgesetzt: basal, insulinstimuliert (10^{-7} M), IGF-1-stimuliert (100 nM), und Osmotic Shock (Mannitol, 500 mM). Detektiert wurde mit Anti-Phospho-Tyrosin AK (oberer Teil der Blots) und mit Anti-IRS-4 AK (unterer Teil der Blots). Es besteht keine signifikante Erhöhung des Phospho-IRS-4-Anteils nach Insulin Stimulus gegenüber dem Basalwert. Es besteht eine signifikante Erniedrigung des Phospho-IRS-4-Anteils nach IGF-1 Stimulus auf 30% gegenüber dem Basalwert (der p-Wert beträgt 0.0023). Es besteht eine 1.87fache, signifikante Erhöhung des Phospho-IRS-4-Anteils nach Osmotic Shock gegenüber dem Basalwert (der p-Wert beträgt 0.0363).

Bei den humanen Skelettmuskelzellen zeigte sich analog zu den vorangegangenen Ergebnissen kein Effekt nach Insulinstimulus. IGF-1 bewirkte jedoch anders als bei HEK 293 Zellen eine Dephosphorylierung mit einer Erniedrigung des Phospho-IRS-4 Anteils auf ca. 30% (Abb. 15).

Desweiteren wurden die Zellen durch Osmotic Shock gestresst, um so die Möglichkeit der Tyrosin-Phosphorylierung des IRS-4 durch andere Tyrosinkinase als dem Insulin- und IGF-1 Rezeptor zu testen. Dies bewirkte eine Verdopplung der IRS-4 Tyrosin-Phosphorylierung in den humanen Skelettmuskelzellen ohne einen Effekt in HEK 293 Zellen zu zeigen (Abb. 14 und 15).

4. DISKUSSION

4.1. Expression und Funktion des Insulinrezeptorsubstrat-4

IRS-4 konnte in dieser Arbeit erstmals auf Proteinebene sowohl in der Skelett- und Herzmuskulatur der Ratte, als auch in humanen Skelettmuskelzellen nachgewiesen werden. Dies wurde mit Hilfe eines Antiserums gegen das carboxyterminale Ende des humanen IRS-4 erreicht. Die Eindeutigkeit der Spezifität gegen IRS-4 stützt sich auf drei Säulen: 1. eine Kreuzreaktivität gegen IRS-1 und IRS-2 konnte ausgeschlossen werden, 2. eine einzelne Proteinbande dieser Grösse wurde bereits in HEK 293 Zellen identifiziert und 3. durch Anwendung des blockierten Antiserums wurden entsprechende Banden in Soleus und Herzmuskel vollständig entfernt (siehe Abb. 3).

In Geweben der Ratte konnte IRS-4 im ganzen Herzen als auch in isolierten adulten Kardiomyozyten nachgewiesen werden. Im Skelettmuskelgewebe konnte es nur im Soleus, nicht jedoch in Gastrocnemius und Quadriceps gefunden werden. Diese Ergebnisse korrelieren mit denen von Lienhard und Mitarbeitern, die ebenfalls kein IRS-4 im Quadriceps von Mäusen finden konnten (Fantin et al., 1999 (2)). Im Gegensatz zu den hier gezeigten Ergebnissen, konnten sie allerdings auch kein IRS-4 im Herzen nachweisen (Fantin et al., 1999 (2)), was eventuell an den verschiedenen verwendeten Antiseren und/oder den Unterschieden zwischen Ratte und Maus liegen könnte.

Diese Arbeit zeigt eine bevorzugte IRS-4 Expression in oxidativen Muskeln mit dem höchsten Gehalt in der Herzmuskulatur. Oxidative rote Muskeln sind reich an Typ1 Fasern, besitzen mehr GLUT4 (Henriksen et al., 1990) und weisen eine stärkere Sensitivität gegenüber Insulin auf (James et al., 1985). Zu diesem Muskelfasertyp gehören unter anderem sowohl der M. soleus als auch der M. rectus abdominis, von dem die humanen Skelettmuskelzellen in dieser Arbeit stammen. IRS-1 und IRS-2 werden in vielen verschiedenen Geweben exprimiert (Giovannone et al., 2000), darunter sowohl im weissen als auch im roten Muskel (Patti et al., 1995, Zhou und Dohm, 1997). Die

spezifische Expression von IRS-4 im roten Muskel – Soleus, Rectus abdominis und Herz – legt die Vermutung nahe, dass es hier eine potentielle Rolle in der Regulation der GLUT4 Translokation spielt, was auch schon von Zhou (Zhou et al., 1999) beschrieben wurde: Die Überexpression von IRS-4 in Ratten-Adipozyten bewirkt eine Steigerung der GLUT4 Translokation an die Zelloberfläche.

Eine Studie an GK (Goto-Kakizaki)-Ratten, einem Tiermodell mit spontanem Typ2 Diabetes, zeigte die Auswirkungen des Diabetes am Herzmuskel. Hier wurden beeinträchtigt Insulin-stimulierter Glucosetransport, sowie verminderte IR- β -, IRS-1 und GLUT4 Level nachgewiesen. Die verminderte Expression von IR- β und IRS-1 ist mit einer geringeren Aktivierung der Signalweiterleitung nach Insulinstimulus verbunden, und auch der Verlust an GLUT4 beeinträchtigt die insulinabhängige Glucoseaufnahme. Proteinlevel sowie Phosphorylierung von PKB waren normal, was zeigt, dass PKB kein kontrollierender Faktor in diesem Modell der kardialen Insulinresistenz ist. Defekte in der myokardialen Insulinreaktion haben evtl. schädliche Effekte auf die Glucoseutilisation und unterliegen möglicherweise den metabolischen Störungen, wie sie in Typ2 diabetischen Herzen nachgewiesen wurden (Desrois et al., 2004).

IRS-4 wird bei WOK.W Ratten in den gleichen Geweben exprimiert wie bei Wistar Ratten – in dem Skelettmuskel Soleus, sowie in der Herzmuskulatur. Interessanterweise konnte in der vorliegenden Arbeit eine Downregulierung von IRS-4 in Soleus und Herzmuskel bei WOK.W Ratten beobachtet werden. Es handelt sich hierbei um ein Tiermodell mit einem vollständigen Metabolischen Syndrom. Sie weisen einen polygenetisch bedingten Phänotyp auf mit Hypertonie, Dyslipidämie (erhöhte Serum-Triglyceride und Gesamt-Cholesterin), Obesity, erhöhte Serum-Leptinspiegel, herabgesetzte Glucosetoleranz, Insulinresistenz, Proteinurie und verminderte Creatinin-Clearance, jedoch keinen manifesten Diabetes mellitus (van den Brandt et al., 2002). Die Expression von IRS-2 verglichen mit gesunden Wistar Ratten ist hier unverändert, und IRS-1 ist nur im Skelettmuskel (Soleus) in seiner Expression vermindert. Dies zeigt, dass die metabolische Regulation der verschiedenen IRS-Proteine hoch spezifisch ist.

Die verschiedenen Faktoren des Metabolischen Syndroms beeinflussen sich gegenseitig auf komplexe Weise. So aktiviert z.B. nach der Aufnahme von Fettsäuren in die Zelle ein Produkt der Fettsäuren, z.B. fatty-Acyl-CoA oder Diacylglycerol, die PKC θ , welche wiederum die Aktivierung von Serin / Threonin Phosphorylierungskaskaden von IRS-1, evtl. auch IRS-2, bewirkt. Dies hat eine verminderte IRS-1 Tyrosin – Phosphorylierung zur Folge, eine herabgesetzte PI3-Kinase Aktivität und somit eine eingeschränkte GLUT4 Aktivität (Shulman, 2000, Yu et al., 2002). Auch in unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Sekretion von Fettzellfaktoren eine Insulinresistenz an menschlichen Skelettmuskelzellen induziert (Dietze et al., 2004).

Die Dyslipidämie ist wahrscheinlich Folge der Insulinresistenz von Fettzellen. Die Unfähigkeit dieser Zellen Triglyceride zu speichern führt zur Hydrolyse von Triglyceriden und Freisetzung von Fettsäuren. Aufgrund der hohen Verfügbarkeit von freien Fettsäuren für die Leber erfolgt eine Steigerung der hepatischen Synthese von Triglyceriden und VLDL-Cholesterin mit Apolipoprotein B. Es findet also ein Austausch statt, von HDL und LDL zu VLDL, welches die Verfügbarkeit von HDL herabsetzt, Cholesterin aus peripheren Zellen abzutransportieren. Ausserdem formen sich Triglycerid – angereicherte LDL in „small, dense LDL“ um, welche ein höheres artherogenes Potential besitzen. Sie werden schneller oxidiert und sind somit toxisch für Endothelzellen, da sie die NO-Freisetzung hemmen und die Exprimierung von Cytokinen und Adhäsionsmolekülen fördern. Es kommt zur vaskulären Inflammation mit den typischen Folgen wie KHK (Reusch, 2002). Unter normalen Umständen wirkt Insulin in Gefäßen anti-inflammatorisch und vasodilatatorisch (Dandona et al., 2001, Garg et al., 2000). Diese Effekte sind bei Insulinresistenz aufgehoben, oder sogar umgekehrt (Reusch, 2002). Bei Insulinresistenz bzw. Typ2 Diabetes sind die Effekte des PI3-Kinase Pfades vermindert, bei jedoch erhaltener Aktivierung des MAP Kinase Weges. Dies bedeutet eine relative Steigerung der mitogenen Effekte wie Zellwachstum, Proliferatin und Bildung von PAI-1 (Cusi et al., 2000). Es besteht ein Überwiegen von thrombembolischen Faktoren (Ginsberg, 2000, Meigs et al., 2000). Dass IRS-4 auch bei diesen Effekten eine Rolle spielen könnte wird deutlich, wenn man beachtet, dass in 32D hämatopoetischen

Zellen oder in NIH-3T3-Maus-Fibroblasten durch IRS-4 Überexpression eine vermehrte Insulin- und IGF-1 stimulierte Zellproliferation beobachtet werden konnte (Fantin et al., 1999 (1), Qu et al., 1999).

Leider konnten keine weiteren Daten zur IRS-4 spezifischen Insulin-Signalweiterleitung in Ratten-Gewebe erhoben werden, um dessen physiologische, bzw. pathophysiologische Rolle weiter zu erforschen. Wiederholte Versuche, IRS-4 Immunopräzipitate aus den Lysaten der Ratten Gewebe herzustellen schlugen fehl, womit es auch nicht möglich war, eine Tyrosin-Phosphorylierung des IRS-4 nach Insulin-Stimulus nachzuweisen. Laut Herstellerangaben ist der Anti-IRS-4 Antikörper spezifisch gegen einen rekombinanten Proteinabschnitt, den Aminosäuren 1240 bis 1257, des humanen IRS-4 gerichtet. Es wird lediglich eine Kreuzreaktivität mit Ratten-IRS-4 angegeben. Im Immunoblot stellte dies keine Probleme dar, jedoch schien sich die Struktur des Proteins aus Rattengewebe im nicht degenerierten Zustand zu stark von der aus humanen Zellen oder Geweben zu unterscheiden. Die Aminosäuresequenz des Ratten-IRS-4 war zum Zeitpunkt dieser Versuchsreihe noch nicht bekannt, jedoch die der Maus. Mittlerweile wurde auch eine Sequenzierung des IRS-4 der Ratte (*Rattus norvegicus*) durchgeführt (PubMed Protein). Es ist kürzer als das humane, es besteht nur aus 1185 Aminosäuren. Die Sequenz am C-Terminus, also der Angriffsstelle des Antikörpers, weist ebenfalls Unterschiede auf.

| | | |
|--------|-------------------------|----------------|
| Human: | RMD FAR RDN QFD SPK RGR | AS 1240 - 1257 |
| Maus: | RMD FAR RDY RK | AS 1206 - 1216 |
| Ratte: | RMD FAR RDY KK | AS 1168 - 1185 |

Aufgrund dieser Unterschiede ist anzunehmen, dass sich die Tertiärstruktur des Ratten-IRS-4 zu sehr von der des humanen IRS-4 unterscheidet, so dass der Antikörper das Protein in der IP nicht mehr erkennt.

4.2. Interaktionen d. verschiedenen Insulinrezeptorsubstrate

Neben Rattengeweben konnte IRS-4 Protein in dieser Arbeit auch in humanen Skelettmuskelzellen nachgewiesen werden, und auch hier war kein Insulin-Effekt zu erkennen. Die Erkenntnis deckt sich mit der Tatsache, dass IRS-4-Null Mäuse keine Insulinresistenz aufweisen (Fantin et al., 2000). Eine Erklärung für dieses Verhalten könnte die relative Überexpression von anderen IRS-Proteinen, vor allem IRS-1 und IRS-2 zu IRS-4 in Muskelgeweben sein. So ist der Insulin-Rezeptor evtl. mit IRS-1 und/oder IRS-2 abgesättigt, ohne dass IRS-4 als Substrat der Insulinrezeptor-Kinase bei diesem Vorgang teilnimmt. Die umgekehrte Situation ist bei HEK 293 Zellen beschrieben, wo IRS-4 etwa 20-30fach stärker als IRS-1 und IRS-2 exprimiert wird (Fantin et al., 1998). Es konnte hier nochmals bestätigt werden, dass in HEK 293 Zellen IRS-4 das Hauptsubstrat für die Insulinrezeptorkinase darstellt und stark durch Insulinstimulus tyrosinphosphoryliert wird, wohingegen IRS-1 und IRS-2 in diesen Zellen nicht am Insulin-Signaling beteiligt sind (Fantin et al., 1998). Man kann daraus schliessen, dass IRS-4 unter physiologischen Bedingungen in Muskelgewebe kein Substrat der Insulinrezeptor-Kinase darstellt.

Eine ähnliche Interaktion zwischen IRS-1 und IRS-4 stellten auch Tseng und Mitarbeiter 2004 an Adipocysten fest. An entsprechenden IRS KO-Zellen untersuchten sie deren Fähigkeit zur Differenzierung. Hier stellte sich heraus, dass IRS-1 und IRS-3 anscheinend die wichtigsten Rollen dabei spielen. IRS-4 KO-Zellen differenzieren sich trotzdem in mature Zellen aus. Jedoch erlangen IRS-1 KO-Zellen ihre Fähigkeit zur Differenzierung durch Substitution des IRS-1 durch IRS-4 wieder zurück, nicht jedoch durch Rekonstitution durch IRS-2 oder IRS-3. In den IRS-1 KO-Zellen fiel eine dramatische Steigerung der Wnt 10a – Expression auf, einem Inhibitor der Adipogenese, welche sowohl durch Überexpression von IRS-1, als auch von IRS-4 wieder reduziert werden konnte. Es zeigt sich also, dass IRS-4, auch wenn es für diesen Prozess nicht essentiell ist, durch Überexpression das Defizit der Differenzierungsfähigkeit von IRS-1 KO-Zellen kompensieren kann (Tseng et al., 2004).

Im Jahr 2002 untersuchte dieselbe Arbeitsgruppe die Rollen der Insulinrezeptorsubstrate an braunen Präadipozyten von Mäusen in der antiapoptotischen Funktion von IGF-1 und Insulin. Hier stellte sich heraus, dass IRS-1 eine entscheidende Rolle spielt, und IRS-1, IRS-2, und IRS-3 teilweise austauschbar, bzw. fähig sind, sich gegenseitig zu ersetzen oder zu kompensieren, was die antiapoptotischen Effekte von IGF-1 betrifft. IRS-4 hingegen wirkt als negativer Regulator, da eine Überexpression zu einer Hemmung der IGF-1 vermittelten Antiapoptose führt (Tseng et al., 2002). Erklärend hierfür kann angebracht werden, dass schon Tsuruzoe et al. (2001) herausgefunden haben, dass IRS-4 die IRS-2 Signalweiterleitung behindern kann. Wahrscheinlich vermindert es die IGF-1 abhängige IRS-2-Tyrosin-Phosphorylierung, indem es um Rezeptorinteraktionen kompetiert. Es muss jedoch bedacht werden, dass verschiedene Signalwege an der Vermittlung von antiapoptotischen Effekten beteiligt sein müssen (Tseng et al., 2002). Auch andere Wachstumsfaktoren als IGF-1, wie EGF (Epidermal Growth Factor) oder PDGF (Platelet Derived Growth Factor), sowie auch beta-adrenerge Stimulation (Ma und Huang, 2002), spielen eine Rolle beim IRS-unabhängigen Signaling (Chaudhary und Hruska, 2001).

Auch nach partieller Leberresektion zeigte sich die Bedeutung von IRS-4 in diesem Zusammenhang. Escribano und Mitarbeiter zeigten, dass ein Tag nach partieller Hepatektomie die IRS-1 Expression stark anstieg, und nach 7 Tagen wieder abfiel. Zur gleichen Zeit fanden eine Steigerung der IRS-2 und IRS-4 Expression und deren Phosphorylierung statt. Desweiteren konnte nach 7 Tagen ein IRS-4-p85 α -Komplex nachgewiesen werden. Das IRS-4 scheint eine wichtige Rolle vor allem in der letzten Phase der Leberregeneration zu spielen. Vermutlich ist IRS-4 wie IRS-1 in einen inhibitorischen Rückkopplungsmechanismus über PI3-Kinase, PKC ζ und Phosphorylierung von IRS-Proteinen involviert (Escribano et al., 2003). Diese Rolle bei der Zelldifferenzierung zeigten auch Giovannone et al. (2000), da sich bei der Differenzierung von L6-Myoblasten in Myotuben ein starker Anstieg der IRS-4 mRNA Expression zeigte, während die Expression der anderen IRS-Proteine sich nicht änderte.

Es fällt auf, dass, gewebeunabhängig, und worin seine physiologische Bedeutung auch liege, ein Zusammenhang zwischen der Expression und der Funktion von IRS-4 und IRS-1 und IRS-2 besteht. Dies bestätigen auch Ergebnisse von Tsuruzoe (2001). IRS-3 und IRS-4 agieren als negative Regulatoren im Insulin- und IGF-1 Signaling durch Supprimierung der Funktion von IRS-1 und IRS-2 an mehreren Schritten: Die Expression von IRS-2, sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene wird vermindert. Die Phosphorylierung von IRS-1 und -2 nach IGF-1 Stimulus sinkt, genauso wie deren Bindung an die p85-Untereinheit der PI3-Kinase. Dies deutet darauf hin, dass die Reaktionen auf IGF-1 Stimulus in bestimmten Zellen bzw. Geweben durch die Kombination aller vier IRS-Proteine reguliert werden (Tsuruzoe et al., 2001).

In pankreatischen β -Zellen bewirkt eine Überexpression von IRS-2 eine Protektion gegenüber durch freie Fettsäuren induzierte Apoptose, über Aktivierung von PI3-Kinase und PKB, sowie Hemmung von Caspase-9. Durch Verminderung der IRS-2 Expression steigert sich die Apoptoserate, was durch IRS-4 Expression kompensiert werden kann. IRS-4 kompensiert sogar den kompletten IRS-2 Verlust und reduziert die Apoptoserate in den Zellen über denselben Signalweg wie IRS-2 auf normale Level (Lingohr et al., 2003). Auch im cerebralen Kortex von IRS-1 KO-Mäusen wird der Verlust des IRS-1 durch Induktion der IRS-2 und IRS-4 Expression kompensiert (Ye et al., 2002).

4.3. IRS-4 Signaling nach Stimulation alternativer Signalwege

Eine interessante Alternative zum Insulin-Rezeptor hinsichtlich der IRS-4 Signalkaskade stellt auch der IGF-1-Rezeptor dar. So fanden bereits LeRoith und Mitarbeiter (1999) heraus, dass in IRS-4- und IGF-1-Rezeptor überexpressierenden Zelllinien IRS-4 fördernd auf die Zellproliferation wirkt (Qu et al., 1999). Desweiteren zeigen IRS-4 Knockout-Mäuse eine, wenn auch geringe, Beeinträchtigung des Wachstums (Fantin et al., 2000). Im Gegensatz zu HEK 293 Zellen, wo Stimulation durch IGF-1 eine starke Aktivierung des IRS-4 zu Folge hat, konnte an humanen Myoblasten ein

solcher Effekt nicht nachgewiesen werden, es findet sogar eine Dephosphorylierung statt.

In dieser Studie wurde zusätzlich zur Insulin- und IGF-1 Stimulation auch eine Stimulierung der humanen Skelettmuskelzellen durch hyperosmotischen Stress durchgeführt. Hyperosmotischer Stress bewirkt an Muskelzellen sowohl eine Induktion der GLUT4 Translokation an die Zellmembran, als auch eine Induktion von zellulärer Insulinresistenz (Abb. 16).

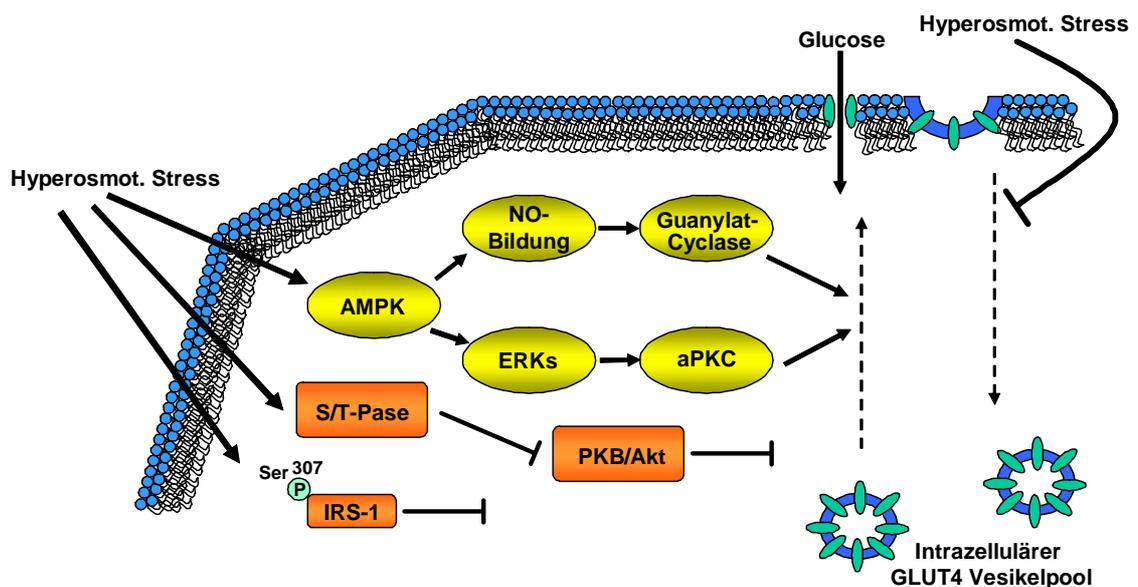


Abbildung 16: Hyperosmotischer Stress an Muskelzellen

Hyperosmotischer Stress aktiviert AMPK, welches zwei verschiedene Signalkaskaden aktiviert, an dessen Ende jeweils die Translokation von GLUT4 Vesikeln an die Zellmembran steht. Zusätzlich wird die GLUT4 Endozytose gehemmt.

Zelluläre Insulinresistenz wird einerseits durch Serin-Phosphorylierung des IRS-1, andererseits durch Aktivierung einer PKB-Phosphatase (S/T-Pase) erreicht, welche PKB in einem inaktiven Zustand hält.

Modifiziert nach Gual P. et al., 2003.

Der osmotische Stress bewirkt eine Aktivierung der AMPK (Fryer et al., 2000, Hayashi et al., 2000), was zu einer vermehrten Produktion von NO führt. Dies wiederum aktiviert eine Guanylat-Cyclase (Fryer et al., 2000), was eine GLUT4 Translokation an die Zellmembran zur Folge hat. Unabhängig davon wird über Aktivierung von ERKs (MAPK) und Stimulierung von atypischen PKCs ebenfalls die GLUT4 Translokation gesteigert (Chen et al., 2002, Sajan

et al., 2002, Farese 2002), und gleichzeitig deren Endozytose gehemmt (Li et al., 2001).

Die Induktion der zellulären Insulinresistenz erfolgt durch Ser³⁰⁷-Phosphorylierung von IRS-1, wodurch es in seiner Funktion beeinträchtigt wird (Gual et al., 2003). Desweiteren wird eine PKB-Phosphatase (eine S/T-Pase) aktiviert, wodurch PKB im inaktiven Zustand gehalten wird, was eine weitere Hemmung der GLUT4 Translokation bedeutet (Chen et al., 1999). Prolongierter hyperosmotischer Stress führt darüber hinaus zu verstärkter Degradierung von IRS-1 und IRS-2 (Gual et al., 2003).

An HEK 293 Zellen wurde ähnliches beobachtet. Hyperosmolarer Stress bewirkt sowohl eine Hemmung der basalen PKB-Aktivität, als auch eine Reduktion der PKB-Aktivierbarkeit, z.B. durch PDGF (Platelet Derived Growth Factor). Dies wird erreicht durch Inhibierung der Phosphorylierung durch Upstream-Kinasen und durch rapide Dephosphorylierung durch PP2A (Protein Phosphatase 2A)(Meier et al., 1998).

Anders als bei Insulin und IGF-1 wird in dieser Studie durch hyperosmolaren Stress eine Tyrosin-Phosphorylierung des IRS-4 an humanen Skelettmuskelzellen beobachtet. Es ist mittlerweile etabliert, dass Protein-Tyrosin-Kinasen eine Rolle im durch hyperosmolaren Stress ausgelösten Signaling spielen (Krump et al., 1997, Junger et al., 1998, Kapus et al., 1999). Hierbei sind sowohl Mitglieder der Src-Kinasen-Familie als auch andere Tyrosin-Kinasen beteiligt (Kapus et al., 1999). Es liegt daher nahe, dass IRS-4 wahrscheinlich durch nicht-Rezeptor Tyrosin-Kinasen aktiviert wird und bei Stress-induziertem Signaling in humaner Skelettmuskulatur beteiligt ist. Welche Kinasen das genau sind, muss noch untersucht werden, es wurde jedoch schon insulinmimetisches Signaling bis hin zum Glucosetransport über Tyrosin-Phosphorylierungen von IRS-1 und IRS-2 durch nicht-Rezeptor Kinasen wie pp59 (Lyn) beschrieben (Muller et al., 2001). Es ist nicht auszuschliessen, dass an einem solchen Weg auch IRS-4 beteiligt ist, was eine neue Studie nun zeigte. Sie wies die Assoziation von IRS-4 und Brk (breast tumor kinase), einer nicht-Rezeptor Tyrosin-Kinase nach. Demnach zeigte sich diese Assoziation in basalen und IGF-1 stimulierten HEK 293 Zellen unter Einbeziehung der SH2- und SH3 Domänen der Brk (Qiu et al., 2005).

Die IRS-Aktionen können durch verschiedene Mechanismen moduliert werden. $\text{TNF}\alpha$ und Hyperinsulinämie zum Beispiel induzieren Serin / Threonin – Phosphorylierungen von IRS-Proteinen, was deren Funktionen negativ beeinflusst (Johnston et al., 2003). Auch SOCS (Supressor of cytokine signaling) haben negativ-modulatorische Eigenschaften. SOCS-1 hemmt durch Assoziation mit dem Insulinrezeptor dessen Bindung an IRS-Proteine (Emanuelli et al., 2000), SOCS-1 und SOCS-3 fördern den Abbau von IRS-1 und IRS-2 (Rui et al., 2002), und SOCS-6 weist eine Bindungsaffinität zu IRS-2 und IRS-4 auf (Krebs et al., 2002). Ektopisch exprimiertes SOCS-6 bindet ebenfalls an den Insulinrezeptor und hemmt so die Signaltransduktion *in vivo* (Mooney et al., 2001).

Auch Cytokine spielen eine Rolle in der Insulinresistenz des Typ2 Diabetes und induzieren ihrerseits eine IGF Resistenz (Wellen und Hotamisligil, 2003). Dass die IRS Proteine auch in Cytokin-Rezeptor Signalkaskaden involviert sind wurde bereits 1998 gezeigt (White, 1998). Die zwei wichtigsten proinflammatorischen Cytokine sind $\text{IL-1}\beta$ und $\text{TNF}\alpha$ (Figarella-Branger et al., 2003). $\text{TNF}\alpha$ induziert Insulinresistenz, indem es u.a. durch Steigerung der Lipolyse eine Erhöhung der freien Fettsäuren im Plasma bewirkt, die GLUT4 Translokation an die Plasmamembran hemmt, und auch die Aktivierung von IRS-1 und IRS-2 hemmt (Liu et al., 1998; Brekke et al., 1997; Hirosumi et al., 2002). Auf IRS-4 hat es eine ähnliche Wirkung. In HEK 293 Zellen bewirkt die Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ eine Verkürzung der IRS-4 Lebenszeit durch Induktion von PP4 (Protein Phosphatase 4), einer PP2A-verwandten Serin/Threonin Phosphatase (Mihindukulasuriya et al., 2004). In pankreatischen β -Zellen agiert IGF-1 als Überlebens-Faktor (Gallaher et al., 2001), wohingegen $\text{IL-1}\beta$ Apoptose induziert (Nikulina et al., 2003). Auf murine Myoblasten hat $\text{IL-1}\beta$ alleine, ohne die Anwesenheit von IGF-1, keinen proapoptotischen Effekt. Es ist daher unwahrscheinlich, dass zytotoxische Mechanismen für die Hemmung der anabolen Aktionen des IGF-1 verantwortlich sind. $\text{IL-1}\beta$ induziert einen Zustand von IGF-1 Resistenz, indem es die Aktivierung von IRS-1 und IRS-2 hemmt, jedoch ohne Effekt auf die Tyrosin-Phosphorylierung des IGF-1 Rezeptors, $\text{IL-1}\beta$ scheint die IRS-Proteine direkt anzugreifen (Broussard et al., 2004).

IL-9 und IL-4 hingegen stimulieren die Tyrosin-Phosphorylierung von IRS-Proteinen (Yin et al., 1995). In 32D^{IR}-Zellen (Myeloid Progenitor Zellen, die den humanen Insulinrezeptor überexprimieren) mit entsprechender Überexprimierung von IRS-Proteinen induzieren IRS-1 und IRS-2 die Zellproliferation nach IL-9 Stimulus, wohingegen IRS-4 Überexprimierung diesen Effekt nicht besitzt. Es kann daraus geschlossen werden, dass die einzelnen IRS-Proteine unterschiedliche Funktionen in der Cytokin-Signalkaskade haben (Xiao et al., 2002).

An den gleichen Zellen konnte schon 1999 gezeigt werden, dass nach Insulinstimulus Grb-2 eine starke Assoziation mit IRS-1 und IRS-4 eingeht, eine etwas schwächere mit IRS-2, und eine Aktivierung des MAP-Kinase Signalweges stattfindet. Insulin wirkt auf IRS-1 oder IRS-2 exprimierende Zellen unter IL-3 Entzug antiapoptotisch, jedoch nicht auf IRS-4 exprimierende Zellen, IRS-4 hat sogar einen proapoptotischen Effekt (Uchida et al., 2000).

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass IRS-4 Protein sowohl in Soleus und kardialen Muskelgewebe der Ratte, als auch in primären humanen Skelettmuskelzellen exprimiert wird. In diesen Geweben stellt es jedoch kein Substrat für den Insulin- und den IGF-1 Rezeptor dar, was wahrscheinlich auf eine Konkurrenz mit IRS-1 und IRS-2 zurückzuführen ist. Es wird angenommen, dass IRS-4 unter potentiell Einbezug von nicht-Rezeptor Tyrosinkinase eine physiologische Funktion in Skelett- und Herzmuskulatur ausübt.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Insulinrezeptorsubstrate (IRS) representieren Schlüsselemente der Insulin – Signalkaskade. Das IRS-4 ist das zuletzt eindeutig charakterisierte Mitglied der IRS – Familie. Zwei weitere, IRS-5/DOK4 und IRS-6/DOK5, wurden 2003 beschrieben (Cai et al., 2003). Die *in vivo* Funktion des IRS-4 ist bisher noch nicht eindeutig geklärt. Im Gegensatz zu IRS-1 und IRS-2, weist IRS-4 eine eingeschränkte Gewebeexpression auf, und war bisher auf Proteinebene in noch keinem Gewebe nachgewiesen worden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Expression von IRS-4 in Muskelgeweben der Ratte und in humanen Skelettmuskelzellen zu analysieren, und dessen Beteiligung im Insulin – Signaling zu untersuchen.

Mittels Immunoblot und Immunopräzipitation konnte eine spezifische Expression von IRS-4 im Soleus, und im Herzmuskelgewebe der Ratte nachgewiesen werden, sowie in menschlichen Skelettmuskelzellen. In Gastrocnemius und Quadriceps von Wistar und WOK.W Ratten war es jedoch nicht signifikant nachweisbar. Eine starke Down – Regulation von IRS-4 wurde in Soleus- und Herzmuskelgewebe von WOK.W Ratten beobachtet, einem Tiermodell mit nahezu vollständigem Metabolischen Syndrom.

In humanen Skelettmuskelzellen unterliegen sowohl IRS-1 als auch IRS-2 nach Insulinstimulus einer rapiden Tyrosin-Phosphorylierung, wohingegen IRS-4 weder nach Insulin-, noch nach IGF-1 Stimulierung Tyrosin-phosphoryliert wird. Jedoch konnte eine 2-fache Erhöhung der IRS-4 Tyrosin-Phosphorylierung in Myozyten nachgewiesen werden, die hyperosmotischem Stress ausgesetzt waren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das IRS-4 im Herz- und im Skelettmuskel fasertypspezifisch exprimiert wird.

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass IRS-4 in primären Muskelzellen nicht als Substrat des Insulin- oder des IGF-1 Rezeptors dient, wahrscheinlich ist es jedoch am nicht-Rezeptor Tyrosinkinase – Signaling beteiligt.

6. LITERATURVERZEICHNIS

American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care.* 28(suppl 1):S37-S42, **2005**

Accili D, Drago J, Lee EJ, Johnson MD, Cool MH, Salvatore P, Asico LD, Jose PA, Taylor SI, Westphal H. Early neonatal death in mice homozygous for a null allele of the insulin receptor gene. *Nat Genet.* 12:106-9, **1996**

Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med.* 15:539-53, **1998**

Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, Cohen P. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol.* 7:261-9, **1997**

Andreasson K, Galuska D, Thorne A, Sonnenfeld T, Wallberg-Henriksson H. Decreased insulin-stimulated 3-O-methylglucose transport in in vitro incubated muscle strips from type II diabetic subjects. *Acta Physiol Scand.* 142:255-60, **1991**

Araki E, Lipes MA, Patti ME, Bruning JC, Haag B 3rd, Johnson RS, Kahn CR. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature.* 372:186-90, **1994**

Arner P, Pollare T, Lithell H, Livingston JN. Defective insulin receptor tyrosine kinase in human skeletal muscle in obesity and type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia.* 30:437-40, **1987**

Bjornholm M, Kawano Y, Lehtihet M, Zierath JR. Insulin receptor substrate-1 phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase activity in skeletal muscle from NIDDM subjects after in vivo insulin stimulation. *Diabetes.* 46:524-7, **1997**

Brekke OL, Sagen E, Bjerve KS. Tumor necrosis factor-induced release of endogenous fatty acids analyzed by a highly sensitive high-performance liquid chromatography method. *J Lipid Res.* 38:1913-22, **1997**

Broussard SR, McCusker RH, Novakofski JE, Strle K, Shen WH, Johnson RW, Dantzer R, Kelley KW. IL-1beta impairs insulin-like growth factor i-induced differentiation and downstream activation signals of the insulin-like growth factor i receptor in myoblasts. *J Immunol.* 172:7713-20, **2004**

Burks DJ, de Mora JF, Schubert M, Withers DJ, Myers MG, Towery HH, Altamuro SL, Flint CL, White MF. IRS-2 pathways integrate female reproduction and energy homeostasis. *Nature*. 407:377-82, **2000**

Cai D, Dhe-Paganon S, Melendez PA, Lee J, Shoelson SE. Two new substrates in insulin signaling, IRS5/DOK4 and IRS6/DOK5. *J Biol Chem*. 278:25323-30, **2003**

Caro JF, Sinha MK, Raju SM, Ittoop O, Pories WJ, Flickinger EG, Meelheim D, Dohm GL. Insulin receptor kinase in human skeletal muscle from obese subjects with and without noninsulin dependent diabetes. *J Clin Invest*. 79:1330-7, **1987**

Carpino N, Wisniewski D, Strife A, Marshak D, Kobayashi R, Stillman B, Clarkson B. p62(dok): a constitutively tyrosine-phosphorylated, GAP-associated protein in chronic myelogenous leukemia progenitor cells. *Cell*. 88:197-204, **1997**

Chaudhary LR, Hruska KA. The cell survival signal Akt is differentially activated by PDGF-BB, EGF, and FGF-2 in osteoblastic cells. *J Cell Biochem*. 81:304-11, **2001**

Cheatham B, Kahn CR. Insulin action and the insulin signaling network. *Review. Endocr Rev*. 16:117-42, **1995**

Chen D, Fucini RV, Olson AL, Hemmings BA, Pessin JE. Osmotic shock inhibits insulin signaling by maintaining Akt/protein kinase B in an inactive dephosphorylated state. *Mol Cell Biol*. 19:4684-94, **1999**

Chen HC, Bandyopadhyay G, Sajan MP, Kanoh Y, Standaert M, Farese RV Jr, Farese RV. Activation of the ERK pathway and atypical protein kinase C isoforms in exercise- and aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribose (AICAR)-stimulated glucose transport. *J Biol Chem*. 277:23554-62, **2002**

Chen Z, Gibson TB, Robinson F, Silvestro L, Pearson G, Xu B, Wright A, Vanderbilt C, Cobb MH. MAP kinases. *Review. Chem Rev*. 101:2449-76, **2001**

Cusi K, Maezono K, Osman A, Pendergrass M, Patti ME, Pratipanawatr T, DeFronzo RA, Kahn CR, Mandarino LJ. Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *J Clin Invest*. 105:311-20, **2000**

Dandona P, Aljada A, Mohanty P, Ghanim H, Hamouda W, Assian E, Ahmad S. Insulin inhibits intranuclear nuclear factor kappaB and stimulates I kappaB in mononuclear cells in obese subjects: evidence for an anti-inflammatory effect? *J Clin Endocrinol Metab*. 86:3257-65, **2001**

De Meyts P, Urso B, Christoffersen CT, Shymko RM. Mechanism of insulin and IGF-I receptor activation and signal transduction specificity. Receptor dimer cross-linking, bell-shaped curves, and sustained versus transient signaling. Review. *Ann N Y Acad Sci.* 766:388-401, **1995**

DeFronzo RA, Bonadonna RC, Ferrannini E. Pathogenesis of NIDDM. A balanced overview. *Diabetes Care.* 15:318-68, **1992**

Desrois M, Sidell RJ, Gauguier D, King LM, Radda GK, Clarke K. Initial steps of insulin signaling and glucose transport are defective in the type 2 diabetic rat heart. *Cardiovasc Res.* 61:288-96, **2004**

Dietze D, Koenen M, Rohrig K, Horikoshi H, Hauner H, Eckel J. Impairment of insulin signaling in human skeletal muscle cells by co-culture with human adipocytes. *Diabetes.* 51:2369-76, **2002**

Dietze D, Ramrath S, Ritzeler O, Tennagels N, Hauner H, Eckel J. Inhibitor kappaB kinase is involved in the paracrine crosstalk between human fat and muscle cells. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 28:985-92, **2004**

Doenst T, Taegtmeyer H. alpha-adrenergic stimulation mediates glucose uptake through phosphatidylinositol 3-kinase in rat heart. *Circ Res.* 84:467-74, **1999**

Dohm GL, Elton CW, Friedman JE, Pilch PF, Pories WJ, Atkinson SM Jr, Caro JF. Decreased expression of glucose transporter in muscle from insulin-resistant patients. *Am J Physiol.* 260:E459-63, **1991**

Dresner A, Laurent D, Marcucci M, Griffin ME, Dufour S, Cline GW, Slezak LA, Andersen DK, Hundal RS, Rothman DL, Petersen KF, Shulman GI. Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Clin Invest.* 103:253-9, **1999**

Emanuelli B, Peraldi P, Filloux C, Sawka-Verhelle D, Hilton D, Van Obberghen E. SOCS-3 is an insulin-induced negative regulator of insulin signaling. *J Biol Chem.* 275:15985-91, **2000**

Escribano O, Fernandez-Moreno MD, Zueco JA, Menor C, Fueyo J, Ropero RM, Diaz-Laviada I, Roman ID, Guijarro LG. Insulin receptor substrate-4 signaling in quiescent rat hepatocytes and in regenerating rat liver. *Hepatology.* 37:1461-9, **2003**

Fantin VR, Keller SR, Lienhard GE, Wang LM. Insulin receptor substrate 4 supports insulin- and interleukin 4-stimulated proliferation of hematopoietic cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 260:718-23, **1999**

Fantin VR, Lavan BE, Wang Q, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Keller SR, Lienhard GE. Cloning, tissue expression, and chromosomal location of the mouse insulin receptor substrate 4 gene. *Endocrinology*. 140:1329-37, **1999**

Fantin VR, Sparling JD, Slot JW, Keller SR, Lienhard GE, Lavan BE. Characterization of insulin receptor substrate 4 in human embryonic kidney 293 cells. *J Biol Chem*. 273:10726-32, **1998**

Fantin VR, Wang Q, Lienhard GE, Keller SR. Mice lacking insulin receptor substrate 4 exhibit mild defects in growth, reproduction, and glucose homeostasis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 278:E127-33, **2000**

Farese RV. Function and dysfunction of aPKC isoforms for glucose transport in insulin-sensitive and insulin-resistant states. Review. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 283:E1-11, **2002**

Figarella-Branger D, Civatte M, Bartoli C, Pellissier JF. Cytokines, chemokines, and cell adhesion molecules in inflammatory myopathies. Review. *Muscle Nerve*. 28:659-82, **2003**

Fixman ED, Fournier TM, Kamikura DM, Naujokas MA, Park M. Pathways downstream of Shc and Grb2 are required for cell transformation by the tpr-Met oncoprotein. *J Biol Chem*. 271:13116-22, **1996**

Fryer LG, Hajdуч E, Rencurel F, Salt IP, Hundal HS, Hardie DG, Carling D. Activation of glucose transport by AMP-activated protein kinase via stimulation of nitric oxide synthase. *Diabetes*. 49:1978-85, **2000**

Gallaher BW, Hille R, Raile K, Kiess W. Apoptosis: live or die--hard work either way! Review. *Horm Metab Res*. 33:511-9, **2001**

Garg R, Kumbkarni Y, Aljada A, Mohanty P, Ghanim H, Hamouda W, Dandona P. Troglitazone reduces reactive oxygen species generation by leukocytes and lipid peroxidation and improves flow-mediated vasodilatation in obese subjects. *Hypertension*. 36:430-5, **2000**

Ginsberg HN. Insulin resistance and cardiovascular disease. Review. *J Clin Invest*. 106:453-8, **2000**

Giovannone B, Scaldaferrri ML, Federici M, Porzio O, Lauro D, Fusco A, Sbraccia P, Borboni P, Lauro R, Sesti G. Insulin receptor substrate (IRS) transduction system: distinct and overlapping signaling potential. Review. *Diabetes Metab Res Rev*. 16:434-41, **2000**

Glenney JR Jr, Zokas L, Kamps MP. Monoclonal antibodies to phosphotyrosine. *J Immunol Methods*. 109:277-85, **1988**

Goodyear LJ, Giorgino F, Balon TW, Condorelli G, Smith RJ. Effects of contractile activity on tyrosine phosphoproteins and PI 3-kinase activity in rat skeletal muscle. *Am J Physiol.* 268:E987-95, **1995**

Gual P, Gonzalez T, Gremeaux T, Barres R, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF. Hyperosmotic stress inhibits insulin receptor substrate-1 function by distinct mechanisms in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem.* 278:26550-7, **2003**

Gual P, Le Marchand-Brustel Y, Tanti J. Positive and negative regulation of glucose uptake by hyperosmotic stress. *Review. Diabetes Metab.* 29:566-75, **2003**

Handberg A, Vaag A, Damsbo P, Beck-Nielsen H, Vinten J. Expression of insulin regulatable glucose transporters in skeletal muscle from type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia.* 33:625-7, **1990**

Harms E. *Kinderheilkunde – Störungen des Kohlenhydratstoffwechsels* 150-160, **1997**

Hayashi T, Hirshman MF, Fujii N, Habinowski SA, Witters LA, Goodyear LJ. Metabolic stress and altered glucose transport: activation of AMP-activated protein kinase as a unifying coupling mechanism. *Diabetes.* 49:527-31, **2000**

Hayashi T, Wojtaszewski JF, Goodyear LJ. Exercise regulation of glucose transport in skeletal muscle. *Review. Am J Physiol.* 273:E1039-51, **1997**

Henriksen EJ, Bourey RE, Rodnick KJ, Koranyi L, Permutt MA, Holloszy JO. Glucose transporter protein content and glucose transport capacity in rat skeletal muscles. *Am J Physiol.* 259:E593-8, **1990**

Herold G et al. *Innere Medizin – Endokrinologie* 589-612, **2003**

Higaki Y, Wojtaszewski JF, Hirshman MF, Withers DJ, Towery H, White MF, Goodyear LJ. Insulin receptor substrate-2 is not necessary for insulin- and exercise-stimulated glucose transport in skeletal muscle. *J Biol Chem.* 274:20791-5, **1999**

Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature.* 420:333-6, **2002**

Hunter T, Cooper JA. Protein-tyrosine kinases. *Review. Annu Rev Biochem.* 54:897-930, **1985**

Holgado-Madruga M, Emllet DR, Moscatello DK, Godwin AK, Wong AJ. A Grb2-associated docking protein in EGF- and insulin-receptor signalling.

Nature. 379:560-4, **1996**

Holloszy JO, Hansen PA. Regulation of glucose transport into skeletal muscle. Review. Rev Physiol Biochem Pharmacol.128:99-193, **1996**

Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. Science. 271:665-8, **1996**

James DE, Jenkins AB, Kraegen EW. Heterogeneity of insulin action in individual muscles in vivo: euglycemic clamp studies in rats. Am J Physiol. 248:E567-74, **1985**

Johnston AM, Pirola L, Van Obberghen E. Molecular mechanisms of insulin receptor substrate protein-mediated modulation of insulin signalling. Review. FEBS Lett. 546:32-6, **2003**

Junger WG, Hoyt DB, Davis RE, Herdon-Remelius C, Namiki S, Junger H, Loomis W, Altman A. Hypertonicity regulates the function of human neutrophils by modulating chemoattractant receptor signaling and activating mitogen-activated protein kinase p38. J Clin Invest. 101:2768-79, **1998**

Kahn CR, White MF. The insulin receptor and the molecular mechanism of insulin action. Review. J Clin Invest. 82:1151-6, **1988**

Kapus A, Szaszi K, Sun J, Rizoli S, Rotstein OD. Cell shrinkage regulates Src kinases and induces tyrosine phosphorylation of cortactin, independent of the osmotic regulation of Na⁺/H⁺ exchangers. J Biol Chem. 274:8093-102, **1999**

Katz EB, Stenbit AE, Hatton K, DePinho R, Charron MJ. Cardiac and adipose tissue abnormalities but not diabetes in mice deficient in GLUT4. Nature. 377:151-5, **1995**

Kellerer M, Coghlan M, Capp E, Muhlhofer A, Kroder G, Mosthaf L, Galante P, Siddle K, Haring HU. Mechanism of insulin receptor kinase inhibition in non-insulin-dependent diabetes mellitus patients. Phosphorylation of serine 1327 or threonine 1348 is unaltered. J Clin Invest. 96:6-11, **1995**

Kessler A, Uphues I, Ouwens DM, Till M, Eckel J. Diversification of cardiac insulin signaling involves the p85 α/β subunits of phosphatidylinositol 3-kinase. Am J Physiol Endocrinol Metab. 280:E65-74, **2001**

Kim YB, Zhu JS, Zierath JR, Shen HQ, Baron AD, Kahn BB. Glucosamine infusion in rats rapidly impairs insulin stimulation of phosphoinositide 3-kinase but does not alter activation of Akt/protein kinase B in skeletal muscle. Diabetes. 48:310-20, **1999**

Klein HH, Vestergaard H, Kotzke G, Pedersen O. Elevation of serum insulin concentration during euglycemic hyperinsulinemic clamp studies leads to similar activation of insulin receptor kinase in skeletal muscle of subjects with and without NIDDM. *Diabetes*. 44:1310-7, **1995**

Kohn AD, Summers SA, Birnbaum MJ, Roth RA. Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J Biol Chem*. 271:31372-8, **1996**

Kolter T, Uphues I, Eckel J. Molecular analysis of insulin resistance in isolated ventricular cardiomyocytes of obese Zucker rats. *Am J Physiol*. 273:E59-67, **1997**

Kolter T, Uphues I, Wichelhaus A, Reinauer H, Eckel J. Contraction-induced translocation of the glucose transporter Glut4 in isolated ventricular cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 189:1207-14, **1992**

Kovacs P, Voigt B, Berg S, Vogt L, Kloting I. WOK.1W rats. A potential animal model of the insulin resistance syndrome. Review., *Ann N Y Acad Sci*. 827:94-9, **1997**

Kraegen EW, James DE, Storlien LH, Burleigh KM, Chisholm DJ. In vivo insulin resistance in individual peripheral tissues of the high fat fed rat: assessment by euglycaemic clamp plus deoxyglucose administration. *Diabetologia*. 29:192-8, **1986**

Kraegen EW, Sowden JA, Halstead MB, Clark PW, Rodnick KJ, Chisholm DJ, James DE. Glucose transporters and in vivo glucose uptake in skeletal and cardiac muscle: fasting, insulin stimulation and immunolocalization studies of GLUT1 and GLUT4. *Biochem J*. 295:287-93, **1993**

Krebs DL, Uren RT, Metcalf D, Rakar S, Zhang JG, Starr R, De Souza DP, Hanzinikolas K, Eyles J, Connolly LM, Simpson RJ, Nicola NA, Nicholson SE, Baca M, Hilton DJ, Alexander WS. SOCS-6 binds to insulin receptor substrate 4, and mice lacking the SOCS-6 gene exhibit mild growth retardation. *Mol Cell Biol*. 22:4567-78, **2002**

Krook A, Bjornholm M, Galuska D, Jiang XJ, Fahlman R, Myers MG Jr, Wallberg-Henriksson H, Zierath JR. Characterization of signal transduction and glucose transport in skeletal muscle from type 2 diabetic patients. *Diabetes*. 49:284-92, **2000**

Krook A, Roth RA, Jiang XJ, Zierath JR, Wallberg-Henriksson H. Insulin-stimulated Akt kinase activity is reduced in skeletal muscle from NIDDM subjects. *Diabetes*. 47:1281-6, **1998**

Krook A, Widegren U, Jiang XJ, Henriksson J, Wallberg-Henriksson H, Alessi D, Zierath JR. Effects of exercise on mitogen- and stress-activated kinase signal transduction in human skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 279:R1716-21, **2000**

Krump E, Nikitas K, Grinstein S. Induction of tyrosine phosphorylation and Na⁺/H⁺ exchanger activation during shrinkage of human neutrophils. *J Biol Chem.* 272:17303-11, **1997**

Kubota N, Tobe K, Terauchi Y, Eto K, Yamauchi T, Suzuki R, Tsubamoto Y, Komeda K, Nakano R, Miki H, Satoh S, Sekihara H, Sciacchitano S, Lesniak M, Aizawa S, Nagai R, Kimura S, Akanuma Y, Taylor SI, Kadowaki T. Disruption of insulin receptor substrate 2 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory beta-cell hyperplasia. *Diabetes.* 49:1880-9, **2000**

Lamphere L, Lienhard GE. Components of signaling pathways for insulin and insulin-like growth factor-I in muscle myoblasts and myotubes. *Endocrinology.* 131:2196-202, **1992**

Lavan BE, Fantin VR, Chang ET, Lane WS, Keller SR, Lienhard GE. A novel 160-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated embryonic kidney cells is a new member of the insulin receptor substrate family. *J Biol Chem.* 272:21403-7, **1997**

Lavan BE, Lane WS, Lienhard GE. The 60-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated adipocytes is a new member of the insulin receptor substrate family. *J Biol Chem.* 272:11439-43, **1997**

Lavan BE, Lienhard GE. The insulin-elicited 60-kDa phosphotyrosine protein in rat adipocytes is associated with phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem.* 268:5921-8, **1993**

Leturque A, Loizeau M, Vaulont S, Salminen M, Girard J. Improvement of insulin action in diabetic transgenic mice selectively overexpressing GLUT4 in skeletal muscle. *Diabetes.* 45:23-7, **1996**

Li D, Randhawa VK, Patel N, Hayashi M, Klip A. Hyperosmolarity reduces GLUT4 endocytosis and increases its exocytosis from a VAMP2-independent pool in I6 muscle cells. *J Biol Chem.* 276:22883-91, **2001**

Lingohr MK, Dickson LM, Wrede CE, Briaud I, McCuaig JF, Myers MG Jr, Rhodes CJ. Decreasing IRS-2 expression in pancreatic beta-cells (INS-1) promotes apoptosis, which can be compensated for by introduction of IRS-4 expression. *Mol Cell Endocrinol.* 209:17-31, **2003**

Litherland GJ, Hajduch E, Hundal HS. Intracellular signalling mechanisms regulating glucose transport in insulin-sensitive tissues (review). *Review. Mol*

Membr Biol. 18:195-204, **2001**

Liu LS, Spelleken M, Rohrig K, Hauner H, Eckel J. Tumor necrosis factor- α acutely inhibits insulin signaling in human adipocytes: implication of the p80 tumor necrosis factor receptor. *Diabetes*. 47:515-22, **1998**

Liu SC, Wang Q, Lienhard GE, Keller SR. Insulin receptor substrate 3 is not essential for growth or glucose homeostasis. *J Biol Chem*. 274:18093-9, **1999**

Ma YC, Huang XY. Novel signaling pathway through the beta-adrenergic receptor. *Review. Trends Cardiovasc Med*. 12:46-9, **2002**

Maegawa H, Shigeta Y, Egawa K, Kobayashi M. Impaired autophosphorylation of insulin receptors from abdominal skeletal muscles in nonobese subjects with NIDDM. *Diabetes*. 40:815-9, **1991**

Meier R, Thelen M, Hemmings BA. Inactivation and dephosphorylation of protein kinase B α (PKB α) promoted by hyperosmotic stress. *EMBO J*. 17:7294-303, **1998**

Meigs JB, Mittleman MA, Nathan DM, Tofler GH, Singer DE, Murphy-Sheehy PM, Lipinska I, D'Agostino RB, Wilson PW. Hyperinsulinemia, hyperglycemia, and impaired hemostasis: the Framingham Offspring Study. *JAMA*. 283:221-8, **2000**

Mihindikulasuriya KA, Zhou G, Qin J, Tan TH. Protein phosphatase 4 interacts with and down-regulates insulin receptor substrate 4 following tumor necrosis factor- α stimulation. *J Biol Chem*. 279:46588-94, **2004**

Mooney RA, Senn J, Cameron S, Inamdar N, Boivin LM, Shang Y, Furlanetto RW. Suppressors of cytokine signaling-1 and -6 associate with and inhibit the insulin receptor. A potential mechanism for cytokine-mediated insulin resistance. *J Biol Chem*. 276:25889-93, **2001**

Morisco C, Condorelli G, Trimarco V, Bellis A, Marrone C, Condorelli G, Sadoshima J, Trimarco B. Akt mediates the cross-talk between beta-adrenergic and insulin receptors in neonatal cardiomyocytes. *Circ Res*. 96:180-8, **2005**

Muller G, Jung C, Wied S, Welte S, Frick W. Insulin-mimetic signaling by the sulfonylurea glimepiride and phosphoinositolyglycans involves distinct mechanisms for redistribution of lipid raft components. *Biochemistry*. 40:14603-20, **2001**

Nikulina MA, Sandhu N, Shamim Z, Andersen NA, Oberson A, Dupraz P, Thorens B, Karlens AE, Bonny C, Mandrup-Poulsen T. The JNK binding domain of islet-brain 1 inhibits IL-1 induced JNK activity and apoptosis but

not the transcription of key proapoptotic or protective genes in insulin-secreting cell lines. *Cytokine*. 24:13-24, **2003**

Nolan JJ, Freidenberg G, Henry R, Reichart D, Olefsky JM. Role of human skeletal muscle insulin receptor kinase in the in vivo insulin resistance of noninsulin-dependent diabetes mellitus and obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 78:471-7, **1994**

Numan S, Russell DS. Discrete expression of insulin receptor substrate-4 mRNA in adult rat brain. *Brain Res Mol Brain Res*. 72:97-102, **1999**

Ogata N, Chikazu D, Kubota N, Terauchi Y, Tobe K, Azuma Y, Ohta T, Kadowaki T, Nakamura K, Kawaguchi H. Insulin receptor substrate-1 in osteoblast is indispensable for maintaining bone turnover. *J Clin Invest*. 105:935-43, **2000**

Oliver MF, Opie LH. Effects of glucose and fatty acids on myocardial ischaemia and arrhythmias. Review. *Lancet*. 343:155-8, **1994**

Ouwens DM, van der Zon GC, Pronk GJ, Bos JL, Moller W, Cheatham B, Kahn CR, Maassen JA. A mutant insulin receptor induces formation of a Shc-growth factor receptor bound protein 2 (Grb2) complex and p21ras-GTP without detectable interaction of insulin receptor substrate 1 (IRS1) with Grb2. Evidence for IRS1-independent p21ras-GTP formation. *J Biol Chem*. 269:33116-22, **1994**

Papke K. Exaplan – Klinische Pharmakologie, Pharmakotherapie des Diabetes mellitus. 781-784, **1998**

Paternostro G, Pagano D, Gneccchi-Ruscione T, Bonser RS, Camici PG. Insulin resistance in patients with cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res*. 42:246-53, **1999**

Patti ME, Sun XJ, Bruening JC, Araki E, Lipes MA, White MF, Kahn CR. 4PS/insulin receptor substrate (IRS)-2 is the alternative substrate of the insulin receptor in IRS-1-deficient mice. *J Biol Chem*. 270:24670-3, **1995**

Pedersen O, Bak JF, Andersen PH, Lund S, Moller DE, Flier JS, Kahn BB. Evidence against altered expression of GLUT1 or GLUT4 in skeletal muscle of patients with obesity or NIDDM. *Diabetes*. 39:865-70, **1990**

Pelicci G, Lanfrancone L, Grignani F, McGlade J, Cavallo F, Forni G, Nicoletti I, Grignani F, Pawson T, Pelicci PG. A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction. *Cell*. 70:93-104, **1992**

Petersen KF, Shulman GI. Pathogenesis of skeletal muscle insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. Review. *Am J Cardiol*. 90:11G-18G,

2002

Pillay TS, Xiao S, Olefsky JM. Glucose-induced phosphorylation of the insulin receptor. Functional effects and characterization of phosphorylation sites. *J Clin Invest.* 97:613-20, **1996**

Previs SF, Withers DJ, Ren JM, White MF, Shulman GI. Contrasting effects of IRS-1 versus IRS-2 gene disruption on carbohydrate and lipid metabolism in vivo. *J Biol Chem.* 275:38990-4, **2000**

Pschyrembel Klinisches Wörterbuch – CD Rom, 258. Auflage, Version 2, **1999**

Qiao LY, Goldberg JL, Russell JC, Sun XJ. Identification of enhanced serine kinase activity in insulin resistance. *J Biol Chem.* 274:10625-32, **1999**

Qiu H, Zappacosta F, Su W, Annan RS, Miller WT. Interaction between Brk kinase and insulin receptor substrate-4. *Oncogene.* 24:5656-64, **2005**

Qu BH, Karas M, Koval A, LeRoith D. Insulin receptor substrate-4 enhances insulin-like growth factor-I-induced cell proliferation. *J Biol Chem.* 274:31179-84, **1999**

Rakatzi I, Ramrath S, Ledwig D, Dransfeld O, Bartels T, Seipke G, Eckel J. A novel insulin analog with unique properties: LysB3,GluB29 insulin induces prominent activation of insulin receptor substrate 2, but marginal phosphorylation of insulin receptor substrate 1. *Diabetes.* 52:2227-38, **2003**

Ren JM, Marshall BA, Mueckler MM, McCaleb M, Amatruda JM, Shulman GI. Overexpression of Glut4 protein in muscle increases basal and insulin-stimulated whole body glucose disposal in conscious mice. *J Clin Invest.* 95:429-32, **1995**

Reusch JE. Current concepts in insulin resistance, type 2 diabetes mellitus, and the metabolic syndrome. Review. *Am J Cardiol.* 90:19G-26G, **2002**

Ricort JM, Tanti JF, Van Obberghen E, Le Marchand-Brustel Y. Different effects of insulin and platelet-derived growth factor on phosphatidylinositol 3-kinase at the subcellular level in 3T3-L1 adipocytes. A possible explanation for their specific effects on glucose transport. *Eur J Biochem.* 239:17-22, **1996**

Rinninger F, Greten H. Innere Medizin Verstehen – Lernen – Anwenden, Glucosstoffwechsel; 937-676, **1998**

Rondinone CM, Wang LM, Lonroth P, Wesslau C, Pierce JH, Smith U. Insulin receptor substrate (IRS) 1 is reduced and IRS-2 is the main docking protein for phosphatidylinositol 3-kinase in adipocytes from subjects with non-

insulin-dependent diabetes mellitus. Proc Natl Acad Sci USA. 94:4171-5, **1997**

Rui L, Yuan M, Frantz D, Shoelson S, White MF. SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. J Biol Chem. 277:42394-8, **2002**

Russell RR 3rd, Bergeron R, Shulman GI, Young LH. Translocation of myocardial GLUT-4 and increased glucose uptake through activation of AMPK by AICAR. Am J Physiol. 277:H643-9, **1999**

Ryder JW, Yang J, Galuska D, Rincon J, Bjornholm M, Krook A, Lund S, Pedersen O, Wallberg-Henriksson H, Zierath JR, Holman GD. Use of a novel impermeable biotinylated photolabeling reagent to assess insulin- and hypoxia-stimulated cell surface GLUT4 content in skeletal muscle from type 2 diabetic patients. Diabetes. 49:647-54, **2000**

Sajan MP, Bandyopadhyay G, Kanoh Y, Standaert ML, Quon MJ, Reed BC, Dikic I, Farese RV. Sorbitol activates atypical protein kinase C and GLUT4 glucose transporter translocation/glucose transport through proline-rich tyrosine kinase-2, the extracellular signal-regulated kinase pathway and phospholipase D. Biochem J. 362:665-74, **2002**

Sawka-Verhelle D, Tartare-Deckert S, White MF, Van Obberghen E. Insulin receptor substrate-2 binds to the insulin receptor through its phosphotyrosine-binding domain and through a newly identified domain comprising amino acids 591-786. J Biol Chem. 271:5980-3, **1996**

Sciacchitano S, Taylor SI. Cloning, tissue expression, and chromosomal localization of the mouse IRS-3 gene. Endocrinology. 138:4931-40, **1997**

Sesti G, Federici M, Hribal ML, Lauro D, Sbraccia P, Lauro R. Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders. Review. FASEB J. 15:2099-111, **2001**

Shepherd PR, Nave BT, Rincon J, Haigh RJ, Foulstone E, Proud C, Zierath JR, Siddle K, Wallberg-Henriksson H. Involvement of phosphoinositide 3-kinase in insulin stimulation of MAP-kinase and phosphorylation of protein kinase-B in human skeletal muscle: implications for glucose metabolism. Diabetologia. 40:1172-7, **1997**

Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. Review. J Clin Invest. 106:171-6, **2000**

Smith-Hall J, Pons S, Patti ME, Burks DJ, Yenush L, Sun XJ, Kahn CR, White MF. The 60 kDa insulin receptor substrate functions like an IRS protein (pp60IRS3) in adipose cells. Biochemistry. 36:8304-10, **1997**

Sönnichsen A, Hummel T, Hoffmann A, Buchta M. Das Erste – Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie; 755-757, **1998**

Summers SA, Whiteman EL, Cho H, Lipfert L, Birnbaum MJ. Differentiation-dependent suppression of platelet-derived growth factor signaling in cultured adipocytes. *J Biol Chem.* 274:23858-67, **1999**

Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden PA, Cahill DA, Goldstein BJ, White MF. Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature.* 352:73-7, **1991**

Sun XJ, Wang LM, Zhang Y, Yenush L, Myers MG Jr, Glasheen E, Lane WS, Pierce JH, White MF. Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. *Nature.* 377:173-7, **1995**

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

Tamemoto H, Kadowaki T, Tobe K, Yagi T, Sakura H, Hayakawa T, Terauchi Y, Ueki K, Kaburagi Y, Satoh S, et al. Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature.* 372:182-6, **1994**

Tanti JF, Grillo S, Gremeaux T, Coffey PJ, Van Obberghen E, Le Marchand-Brustel Y. Potential role of protein kinase B in glucose transporter 4 translocation in adipocytes. *Endocrinology.* 138:2005-10, **1997**

Telting D, van der Zon GC, Dorrestijn J, Maassen JA. IRS-1 tyrosine phosphorylation reflects insulin-induced metabolic and mitogenic responses in 3T3-L1 pre-adipocytes. *Arch Physiol Biochem.* 109:52-62, **2001**

Till M, Kolter T, Eckel J. Molecular mechanisms of contraction-induced translocation of GLUT4 in isolated cardiomyocytes. *Am J Cardiol.* 80:85A-89A, **1997**

Toyoda N, Robinson FW, Smith MM, Flanagan JE, Kono T. Apparent translocation of glucose transport activity in rat epididymal adipocytes by insulin-like effects of high pH or hyperosmolarity. *J Biol Chem.* 261:2117-22, **1986**

Tseng YH, Kriauciunas KM, Kokkotou E, Kahn CR. Differential roles of insulin receptor substrates in brown adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol.* 24:1918-29, **2004**

Tseng YH, Ueki K, Kriauciunas KM, Kahn CR. Differential roles of insulin receptor substrates in the anti-apoptotic function of insulin-like growth factor-1 and insulin. *J Biol Chem.* 277:31601-11, **2002**

Tsuruzoe K, Emkey R, Kriauciunas KM, Ueki K, Kahn CR. Insulin receptor substrate 3 (IRS-3) and IRS-4 impair IRS-1- and IRS-2-mediated signaling. *Mol Cell Biol.* 21:26-38, **2001**

Uchida T, Myers MG Jr, White MF. IRS-4 mediates protein kinase B signaling during insulin stimulation without promoting antiapoptosis. *Mol Cell Biol.* 20:126-38, **2000**

van den Brandt J, Kovacs P, Kloting I. Metabolic syndrome and aging in Wistar Ottawa Karlsburg W rats. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 26:573-6, **2002**

Van Obberghen E, Baron V, Delahaye L, Emanuelli B, Filippa N, Giorgetti-Peraldi S, Lebrun P, Mothe-Satney I, Peraldi P, Rocchi S, Sawka-Verhelle D, Tartare-Deckert S, Giudicelli J. Surfing the insulin signaling web. Review. *Eur J Clin Invest.* 31:966-77, **2001**

Van Obberghen E. Signalling through the insulin receptor and the insulin-like growth factor-I receptor. Review. *Diabetologia.* 37 Suppl 2:S125-34, **1994**

Warram JH, Martin BC, Krolewski AS, Soeldner JS, Kahn CR. Slow glucose removal rate and hyperinsulinemia precede the development of type II diabetes in the offspring of diabetic parents. *Ann Intern Med.* 113:909-15, **1990**

Weiss JN, Lamp ST. Cardiac ATP-sensitive K⁺ channels. Evidence for preferential regulation by glycolysis. *J Gen Physiol.* 94:911-35, **1989**

Wellen KE, Hotamisligil GS. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest.* 112:1785-8, **2003**

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

White MF. The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. Review. *Mol Cell Biochem.* 182:3-11, **1998**

White MF. The insulin signalling system and the IRS proteins. Review. *Diabetologia.* 40 Suppl 2:S2-17 **1997**

Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. Review. *Physiol Rev.* 79:143-80, **1999**

Withers DJ, Burks DJ, Towery HH, Altamuro SL, Flint CL, White MF. Irs-2 coordinates Igf-1 receptor-mediated beta-cell development and peripheral insulin signalling. *Nat Genet.* 23:32-40, **1999**

Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S, Zhang Y, Bernal D, Pons S, Shulman GI, Bonner-Weir S, White MF. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature*. 391:900-4, **1998**

Xiao H, Yin T, Wang XY, Uchida T, Chung J, White MF, Yang YC. Specificity of interleukin-2 receptor gamma chain superfamily cytokines is mediated by insulin receptor substrate-dependent pathway. *J Biol Chem*. 277:8091-8, **2002**

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*. 16:3074-84, **1996**

Yarden Y, Ullrich A. Growth factor receptor tyrosine kinases. Review. *Annu Rev Biochem*. 57:443-78, **1988**

Ye P, Li L, Lund PK, D'Ercole AJ. Deficient expression of insulin receptor substrate-1 (IRS-1) fails to block insulin-like growth factor-I (IGF-I) stimulation of brain growth and myelination. *Brain Res Dev Brain Res*. 136:111-21, **2002**

Yin T, Keller SR, Quelle FW, Witthuhn BA, Tsang ML, Lienhard GE, Ihle JN, Yang YC. Interleukin-9 induces tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 via JAK tyrosine kinases. *J Biol Chem*. 270:20497-502, **1995**

Yu C, Chen Y, Cline GW, Zhang D, Zong H, Wang Y, Bergeron R, Kim JK, Cushman SW, Cooney GJ, Atcheson B, White MF, Kraegen EW, Shulman GI. Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J Biol Chem*. 277:50230-6, **2002**

Zhou L, Chen H, Xu P, Cong LN, Sciacchitano S, Li Y, Graham D, Jacobs AR, Taylor SI, Quon MJ. Action of insulin receptor substrate-3 (IRS-3) and IRS-4 to stimulate translocation of GLUT4 in rat adipose cells. *Mol Endocrinol*. 13:505-14, **1999**

Zhou Q, Dohm GL. Treadmill running increases phosphatidylinositol 3-kinase activity in rat skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*. 236:647-50, **1997**

Zierath JR, Krook A, Wallberg-Henriksson H. Insulin action in skeletal muscle from patients with NIDDM. Review. *Mol Cell Biochem*. 182:153-60, **1998**

Zisman A, Peroni OD, Abel ED, Michael MD, Mauvais-Jarvis F, Lowell BB, Wojtaszewski JF, Hirshman MF, Virkamaki A, Goodyear LJ, Kahn

CR, Kahn BB. Targeted disruption of the glucose transporter 4 selectively in muscle causes insulin resistance and glucose intolerance. Nat Med. 6:924-8, **2000**

7. ANHANG

ABKÜRZUNGEN

| | |
|--------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| 32D Zellen | Hämatopoetische Myeloid Progenitor Zellen (Knochenmark-Lymphoblasten der Maus) |
| 32D^{IR} Zellen | 32D Zellen mit Überexpression d. Insulinrezeptors |
| AMPK | Adenosinmonophosphatkinase |
| Anti-GAD | Glutamatdecarboxylase Antikörper |
| aPKC | Atypische Protein Kinase C |
| ATP | Adenosidtriphosphat |
| BB Ratten | Bio Breeding Ratten |
| BMI | Body Mass Index |
| Brk | Brust Tumor Kinase |
| EGF | epidermaler Wachstumsfaktor |
| ERK | extrazellulär signalregulierte Kinase |
| Fatty Acyl CoA | Fatty Acyl Coenzym A |
| Gab-1 | Grb-2 assoziiertes Bindungsprotein 1 |
| GK-Ratten | Goto-Kakizaki Ratten |
| GLUT | Glucosetransporter |
| HbA_{1c} | Glykosylierte Hämoglobinfraktion |
| HDL | High density Lipoproteins |
| HEK 293 Zellen | Human Embyonic Kidney Cells |
| HLA | Humanes Leukozyten Antigen |
| IAA | Insulin-Autoantikörper |
| ICA | Zytoplasmatische Inselzellantikörper |
| IDDM | Insulin dependant Diabetes Mellitus |
| IGF | Insulinlike Growth Factor |
| IL | Interleukin |
| IP | Immunopräzipitat |
| IR | Insulinrezeptor |
| IRS | Insulinrezeptorsubstrat |
| JNK | c-Jun NH ₂ -terminale Kinase |
| KHK | Koronare Herzkrankheit |

| | |
|-------------------------------|-----------------------------------------|
| KO | Knockout |
| KRLB | Kinase regulatory loop binding |
| L6 Zellen | Skelettmuskel-Myoblasten der Ratte |
| LDL | Low density Lipoprotein |
| MAPK | mitogen-aktivierte Proteinkinase |
| mRNA | Messenger Ribonukleinsäure |
| NIDDM | Non Insulin dependant Diabetes Mellitus |
| NIH-3T3 Zellen | embryonale Fibroblasten der Maus |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| oGTT | Oraler Glucosetoleranztest |
| OS | Osmotic shock – hyperosmolarer Stress |
| p110 | Katalytische Untereinheit von PI3-K |
| p85 | Regulatorische Untereinheit von PI3-K |
| PAI-1 | Plasminogenaktivator-Inhibitor |
| PDGF | Platelet-derived Growth Factor |
| PDK | Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase |
| PH | Partielle Hepatektomie |
| PH-Domäne | Pleckstrin Homology Domäne |
| PI3-K | Phosphatidylinositol – 3 – Kinase |
| PKB / Akt | Proteinkinase B |
| PKC | Proteinkinase C |
| PP2A | Protein Phosphatase 2A |
| PP4 | Protein Phosphatase 4 |
| PTB-Domäne | Phosphotyrosin Bindungsdomäne |
| RT1^{u/a} | Haplotypen |
| S / T Pase | Serin / Threonin Phosphatase |
| Ser³⁰⁷ | Serin Aminosäure 307 |
| SGA | Small for gestational age |
| SH2-Domäne | Src-homologe Domäne |
| SHC | Src Homology Collagen |
| SOCS | Supressor of cytokine signaling |
| TNFα | Tumornekrosefaktor α |
| VLDL | Very low density Lipoprotein |
| WOK.W Ratten | Wistar Ottawa Karlsburg W Ratten |

| | |
|-----------------|----------------------------------|
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)aminomethan |
| Tween 20 | Polyoxyethylensorbitanmonolaurat |
| RIPA | Radioimmunopräzipitationsassay |
| IgG | Immunglobulin G |
| IgM | Immunglobulin M |

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abb. 1:** Intrazelluläre Mechanismen der Insulinvermittelten Glucoseaufnahme
- Abb. 2:** IRS – Isoformenstrukturvergleich von IRS-1 bis IRS-4
- Abb. 3:** IRS-4 Expression in verschiedenen Muskelgeweben der Wistar Ratte
- Abb. 4:** IRS-4 Expression in isolierten Kardiomyocyten der Wistar Ratte
- Abb. 5:** Vergleich der IRS-4 Expression in Herz und Soleus der Wistar Ratte
- Abb. 6:** IRS-4 Expression in verschiedenen Muskelgeweben der WOK.W Ratte
- Abb. 7:** Vergleich der IRS-4 Expression zwischen Wistar- und WOK.W Ratten
- Abb. 8:** Vergleich der IRS-1 Expression zwischen Wistar- und WOK.W Ratten
- Abb. 9:** Vergleich der IRS-2 Expression zwischen Wistar- und WOK.W Ratten
- Abb. 10:** IRS-4-Immunopräzipitate aus Herz-Lysaten und HEK 293 Zellen
- Abb. 11:** Phospho-Tyrosin-Immunopräzipitate aus frischen Kardiomyocyten
- Abb. 12:** IRS-4 Immunopräzipitate aus humanen Skelettmuskelzellen
- Abb. 13:** Immunopräzipitate aus humanen Skelettmuskelzellen mit Anti-IRS-2 und Anti-IRS-4 Antikörper
- Abb. 14:** IRS-4 Tyrosin-Phosphorylierung nach verschiedenen Stimuli in HEK 293 Zellen
- Abb. 15:** IRS-4 Tyrosin-Phosphorylierung nach verschiedenen Stimuli in humanen Skelettmuskelzellen
- Abb. 16:** Hyperosmotischer Stress an Muskelzellen

DANKSAGUNGEN

Herrn Prof. Dr. J. Eckel danke ich für die Ermöglichung dieser Dissertation und für die hervorragende, kontinuierliche Betreuung, Beratung und Unterstützung bei dieser Arbeit.

Besonderer Dank gebührt Frau Daniela Ledwig, die mir von Beginn an mit Rat und Tat zur Seite stand und einen wesentlichen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beitrug.

Frau Dr. Daniela Dietze-Schröder und Herrn Dr. Olaf Dransfeld möchte ich für die gute Zusammenarbeit und Hilfestellung im Labor danken.

Mein herzlicher persönlicher Dank gilt meinen Eltern Peter und Ulrike Schreyer für ihre Ermutigungen, Geduld und die liebevolle Begleitung.

CURRICULUM VITAE

Name Schreyer, Sylvia
Geburtsdatum 07. Juli 1977
Geburtsort Düsseldorf
Ausbildung
 1984 – 1988 kath. Grundschule Flurstr.
 in Düsseldorf
 1988 – 1997 Marie Curie Gymnasium
 Gräulingerstr. in Düsseldorf
 1997 Abitur



Berufsausbildung

1997 – 2004 Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine
 Universität in Düsseldorf
 1999 Physikum
 2001 1. Teil der ärztlichen Prüfung
 2003 2. Teil der ärztlichen Prüfung
 04/2003 – 03/2004 Praktisches Jahr am Marienhospital in Düsseldorf
 (Gynäkologie und Geburtshilfe) sowie am Hospital
 Central in Mendoza, Argentinien (Innere Medizin und
 Chirurgie)
 12/2004 3. Teil der ärztlichen Prüfung
 03/2005 Assistenzärztin, Abteilung für Chirurgie,
 Kliniken der Landeshauptstadt Düsseldorf,
 Krankenhaus Gerresheim

Auslandsaufenthalte

1994 -1995 Portageville High School, Portageville, Missouri, USA
 2001 Victoria Hospital, Victoria, Mahé, Seychellen
 (Famulatur - Gynäkologie und Geburtshilfe, Chirurgie)
 2003 - 2004 Hospital Central Mendoza, Argentinien
 (Praktisches Jahr)

Sprachen Deutsch
 Englisch
 Spanisch
 Französisch