

Aus der
Klinik für Endokrinologie und Diabetologie der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ. Prof. Dr. med. Michael Roden

**Modulation der Signaltransduktion des
Insulinrezeptors durch AICAR, einem Aktivator der
AMP-aktivierten Proteinkinase in Leberzellen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

Dirk Oliver Karoß
2016

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

gez.

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. J. Windolf

Erstgutachter: Prof. Dr. med. A. Barthel

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Al-Hasani

I. Zusammenfassung

Der Aufbau und die Funktionsweise der Insulinsignalkaskade sind Gegenstand intensiver wissenschaftlicher Forschung. Dies gilt insbesondere im Hinblick auf die Entwicklung neuer Medikamente zur Therapie des Diabetes mellitus Typ II. In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, wie 5-aminoimidazol-4-carboxamid-1- β -D-ribofuranosid (AICAR), ein Aktivator der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK), die Insulinsignalkaskade moduliert. Dies ist insbesondere vor dem Hintergrund von Interesse, dass auch die Wirkung des Biguanids Metformin über die AMPK vermittelt wird. In beiden Fällen kommt es zu einer Phosphorylierung von Threonin 172 der AMPK. Der genaue Vorgang der AMPK-Aktivierung durch Metformin ist bislang nicht geklärt, eine indirekte Aktivierung wird vermutet. Die Fragestellung wurde in-vitro in einer Ratten- (H4-II-E-Zellen) und einer humanen Hepatomazelllinie (Hep-G2) untersucht. Die Zellen wurden mit AICAR und anschließend mit Insulin stimuliert. Im Anschluss wurde der Phosphorylierungszustand von Proteinen an Schlüsselstellen der Insulinsignalkaskade mittels ELISA gemessen. Untersucht wurde der Grad der Phosphorylierung am Insulinrezeptor Tyrosin 1162/1163, Insulin-Rezeptor-Substrat-1 (IRS-1) Serin 312, Proteinkinase B (PKB/AKT) Serin 473 und Glykogensynthase-Kinase-3 β (GSK-3) Serin 9. Zudem wurde die Phosphorylierung der PKB an Serin 473 mittels Western-Blots dargestellt. An allen untersuchten Stationen der Insulinsignalkaskade konnte eine Modulation des Insulinsignals durch AICAR nachgewiesen werden. Eine Inkubation der Zellen mit AICAR vor der Insulinstimulation führte zu einem signifikanten Anstieg des Phosphorylierungszustandes der Proteine an den untersuchten Positionen.

Aus den Ergebnissen lässt sich schließen, dass eine direkte Aktivierung der AMPK die gesamte Insulinsignalkaskade moduliert und die durch Insulin hervorgerufenen Effekte verstärkt. Bei der Therapie von Patienten mit Diabetes mellitus Typ II könnte dieser Effekt genutzt werden, um einer Insulinresistenz entgegenzuwirken. Dazu müssten die Effekte von AICAR in in-vivo Experimenten bestätigt werden.

II. Abkürzungsverzeichnis

ACC	Acetyl-CoA-Carboxylase
AICAR	5-Aminoimidazol-4-Carboxamid-1- β -D-Ribofuranosid
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchinonsäure, engl. bicinchoninic acid
BSA	Rinderserumalbumin, engl. bovine serum albumin
CAMKKβ	Kalzium-Calmodulin-abhängige Kinase Kinase β (CAMKK β)
cAMP	zyklisches AMP, engl. cyclic AMP
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPP-4	Dipeptidylpeptidase-4
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FCS	fötales Kälberserum, engl. fetal calf serum
Fox	Forkhead-Box-Protein
GLP-1	Glucagon-like Peptide-1
GLUT-4	Glukosetransporter-4
GSK-3	Glykogensynthase-Kinase-3
G6Pase	Glukose-6-Phosphatase
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A
HRP	Meerrettichperoxidase; engl. horseradish peroxidase
IgG	Immunglobulin G
IP-3	Inositol-1,4,5-triphosphat
IRS	Insulin-Rezeptor-Substrat
kDa	kilo Dalton
MAP-Kinase	Mitogen aktivierte Protein-Kinase

mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
NT-BPF	NaCl, Tris, BSA, Pyrophosphat, Fluorid
PBS	Phosphate-buffered saline
PDK	Phosphoinositide-dependent Kinase
PEPCK	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKB/AKT	Proteinkinase-B
PKC	Proteinkinase-C
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPAR	Peroxisome proliferator activated Receptor
SREBP	Sterol Regulatory Element-binding Protein
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
WHO	Weltgesundheitsorganisation, engl. world health organization
ZMP	5-Aminoimidazol-4-carboxamid-ribonucleosid

III. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1** Struktur des Insulinrezeptors (S.4)
- Abb. 2** Schematische Darstellung der Insulinsignalkaskade mit Phosphorylierung der Proteinkinase B (PKB/AKT) durch die Phosphatidylinositol-3-(PI3)-Kinase –Kaskade. (S.6)
- Abb. 3** Phosphorylierung der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK) (S.9)
- Abb. 4** Regulation des Lipidstoffwechsels durch die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) der Leber (S.10)
- Abb. 5** Einfluss von Insulin (10^{-8} M und 10^{-9} M) auf die Phosphorylierung der PKB an Serin 473 in H4-II-E-Zellen (S.26)
- Abb. 6** Einfluss von Insulin (10^{-8} M) auf die Phosphorylierung der PKB an Serin 473 in Hep-G2-Zellene (S.27)
- Abb. 7** Einfluss von Insulin (10^{-8} M) und AICAR (125 μ M, 250 μ M, 500 μ M und 1 mM) auf die Phosphorylierung der PKB an Serin 473 in H4-II-E-Zellen (S.29)
- Abb. 8** Einfluss von Insulin (10^{-8} M) und AICAR (1 mM) auf die Phosphorylierung der PKB an Serin 473 in H4-II-E-Zellen (S.30)
- Abb. 9** Einfluss von Insulin (10^{-8} M) und AICAR (500 μ M, 1 mM, 2 mM) auf die Phosphorylierung der PKB an Serin 473 in H4-II-E-Zellen (Western-Blot) (S.31)
- Abb. 10** Einfluss von Insulin (10^{-9} M, 10^{-8} M) und AICAR (1 mM) auf die Phosphorylierung der PKB an Serin 473 in H4-II-E-Zellen

(Western-Blot) (S.32)

- Abb. 11** Einfluss von Insulin und (10^{-8} M) AICAR (1 mM) auf die Phosphorylierung von GSK-3 an Serin 9 in H4-II-E-Zellen (S.34)
- Abb. 12** Einfluss von AICAR (125 μ M, 250 μ M und 500 μ M) und Insulin (10^{-8} M) auf die Phosphorylierung von GSK-3 an Serin 9 in H4-II-E-Zellen (S.35)
- Abb. 13** Einfluss von AICAR (250 μ M, 500 μ M, 1 mM) und Insulin (10^{-8}) auf die Phosphorylierung des Insulinrezeptors an Tyrosin 1162/1163 in H4-II-E-Zellen (S.37)
- Abb. 14** Einfluss von Insulin (10^{-8} M) und AICAR (1 mM) auf die Phosphorylierung des IRS-1 an Serin 312 in H4-II-E-Zellen (S.39)

IV. Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Epidemiologie und Pathophysiologie des Diabetes mellitus	1
1.2	Therapie des Diabetes mellitus Typ II – orale Antidiabetika	2
1.3	Signaltransduktion des Insulins	3
1.4	Bedeutung der Proteinkinase-B (PKB/AKT)	6
1.5	Aufbau der AMPK und Vorgang der Aktivierung	7
1.6	Stoffwechseleffekte der AMPK in der Leber	9
1.7	AMPK und ihre Interaktion mit dem Insulin-Signaltransduktionsweg	11
1.8	Ziele der Arbeit	12
2	Material und Methoden	13
2.1	Zellbiologische Arbeitstechniken	13
2.1.1	Zellkultur und verwendete Medien	13
2.1.2	Subkultivierung	14
2.1.3	Kryokonservierung von Zellen	14
2.1.4	Zellstimulation	15
2.1.5	Zelllinien	15
2.2	Proteinchemische Arbeitstechniken	16
2.2.1	Proteinbestimmung mit dem BCA-Assay	16
2.2.2	ELISA (Enzyme-linked-Immunosorbent Assay)	17
2.2.3	Western-Blot	19
2.2.4	Coomassie-Färbung	23
2.2.5	Ponceau-Färbung	23
2.3	Statistik	24
3	Ergebnisse	25
3.1	Regulation der Proteinkinase B in Abhängigkeit von Insulin	25

3.1.1	H4-II-E-Zelllinie	26
3.1.2	Hep-G2-Zelllinie	27
3.2	Regulation der PKB-Aktivität durch AICAR	28
3.3	Insulin- und AICAR- abhängige Regulation der PKB (Darstellung im Western-Blot)	31
3.4	Regulation der Glykogensynthase-Kinase-3 (GSK-3)	33
3.5	Regulation des Insulinrezeptors	36
3.6	Regulation des Insulin-Rezeptor-Substrates-1 (IRS-1)	38
3.7	Zusammenfassung der Ergebnisse	40
4	Diskussion	41
4.1	Effekt von AICAR auf die Insulinsignalkaskade	41
4.2	Grenzen und Einordnung	44
5	Literaturverzeichnis	45
	Danksagung	49
	Eidesstattliche Versicherung	50

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie und Pathophysiologie des Diabetes mellitus

In den vergangenen Jahrzehnten haben chronische Erkrankungen, zu denen auch der Diabetes mellitus zählt, weltweit stark zugenommen. Diese Entwicklung wurde zum einen durch einen Überfluss an ständig zur Verfügung stehenden Nahrungsmitteln in den entwickelten Ländern und zum anderen durch einen gravierenden Bewegungsmangel eines Großteils der Bevölkerung dieser Länder begünstigt. So ging die Weltgesundheitsorganisation (engl. world health organization, WHO) im Jahr 2000 davon aus, dass sich 60 % der Weltbevölkerung weniger als 30 min. am Tag bewegen [1]. Die globale Diabetesepidemie verursacht erhebliche gesundheitliche Folgen für den Einzelnen und große finanzielle Belastungen für die betroffenen Sozialsysteme. Die Gesundheitskosten der ca. 24 Millionen Diabetiker in den USA betragen schätzungsweise 174 Milliarden US Dollar (in 2007) und jährlich steigt die Zahl der Erkrankten um ca. eine Million [2, 3]. Auch in Deutschland, wo ca. 10 % der Erwachsenen an Diabetes erkrankt sind, machen die Gesundheitsausgaben für diese Erkrankung einen großen Teil der Gesamtausgaben aus [Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes 2011].

Während der Diabetes mellitus Typ I durch einen absoluten Insulinmangel, verursacht durch einen Untergang der Insulin-produzierenden β -Zellen im Pankreas, gekennzeichnet ist, ist der Typ II Diabetes durch einen veränderten Glukose- und Lipidmetabolismus geprägt, der durch eine Insulinresistenz im Skelettmuskel, der Leber und dem Fettgewebe, sowie durch eine inadäquate Insulinsekretion der β -Zellen im Pankreas verursacht wird. Als Insulinresistenz wird das Phänomen bezeichnet, dass der Körper auf adäquate Insulinspiegel im Serum mit einer unzureichenden Stoffwechselantwort reagiert. Zu der gestörten Glukosehomöostase tragen eine dysregulierte Glukoseproduktion der Leber (gesteigerte Glukoneogenese, gesteigerte Glykogenolyse, verminderte

Glykogensynthese) und eine verminderte postprandiale Glukoseaufnahme in der Leber und im Skelettmuskel bei.

Zunächst verläuft die Krankheit asymptomatisch, da eine steigende Insulinresistenz des Körpers durch eine gesteigerte Insulinausschüttung im Pankreas kompensiert werden kann. Im Verlauf kommt es zu immer häufigeren, insbesondere postprandialen Entgleisungen des Glukosestoffwechsels, da die pankreatischen β -Zellen nicht mehr in der Lage sind den vermehrten Insulinbedarf zu decken (gestörte Glukosetoleranz, engl. impaired glucose tolerance, IGT).

1.2 Therapie des Diabetes mellitus Typ II – orale Antidiabetika

Die Therapie des Diabetes mellitus Typ II besteht aus drei Säulen:

- Zunächst sollte eine „Lifestyle“-Änderung, bestehend aus Gewichtsnormalisierung, diätetischen Maßnahmen und Steigerung der körperlichen Aktivität erfolgen. Im Anfangsstadium der erhöhten Glukosetoleranz können diese Maßnahmen den Progress der Erkrankung stoppen, oder zumindest hinauszögern [4]. Eine Studie konnte zeigen, dass eine Lifestyle-Änderung die Inzidenz des Diabetes mellitus Typ II bei Risikopatienten stärker beeinflusst als eine Therapie mit Metformin [5].
- Wenn der konservative Therapieansatz zu keinem ausreichenden Ergebnis führt, stellt die medikamentöse Mono- oder Kombinationstherapie eine weitere Therapieoption dar.
- Bei Versagen der oralen Antidiabetika ist eine Substitution von Insulin indiziert.

Als klinischer Marker für die Wirksamkeit der Therapie dient in der Praxis der HbA1c-Wert. Er misst den Anteil des Hämoglobins, der mit Glukose verbunden ist, und gibt Auskunft über den mittleren Blutzuckerwert der letzten acht Wochen. Der Wert sollte bei ansonsten gesunden Patienten unter 6,5 % liegen.

Das Biguanid Metformin ist laut Empfehlung der Deutschen Diabetes Gesellschaft das orale Antidiabetikum der ersten Wahl. In Europa ist es seit den späten 1950er Jahren in der Therapie des Diabetes mellitus Typ II in Gebrauch. Der Wirkmechanismus von Metformin ist bis heute nicht gänzlich geklärt. Der blutzuckersenkende Effekt wird vermutlich hauptsächlich durch Hemmung der hepatischen Glukoneogenese hervorgerufen. Auf zellulärer Ebene kommt es vermutlich durch eine Blockade des mitochondrialen Komplex-1 der Atmungskette zu einem Anstieg des Adenosinmonophosphat/Adenosin-triphosphat-(AMP/ATP)-Quotienten und so zu einer indirekten Aktivierung der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK) [6, 7].

Führt eine Monotherapie mit Metformin zu keiner ausreichenden Senkung der Blutglukose, sind Kombinationstherapien mit anderen oralen Antidiabetika indiziert. Eine Kombinationstherapie ist in vielen Varianten möglich und sollte individuell auf den Patienten abgestimmt werden. Auch unter Insulintherapie ist eine Weiterführung der Gabe von Metformin sinnvoll, da sie einen Insulin-einsparenden Effekt hat und einer Gewichtszunahme entgegenwirkt.

1.3 Signaltransduktion des Insulins

Insulin ist ein Polypeptid, bestehend aus einer A-Kette mit 21- und einer B-Kette mit 30 Aminosäuren, die über zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Insulin wirkt auf seine Zielzellen durch die Bindung an Insulinrezeptoren, die in die Zellmembran eingelagert sind. Der Insulinrezeptor besteht aus zwei extrazellulären Insulin-bindenden α -Untereinheiten und zwei über Disulfidbrücken mit den α -Untereinheiten verbundenen β -Untereinheiten (s. Abb. 1). Die β -Untereinheiten enthalten in ihrer zytoplasmatischen Domäne eine intrinsische Tyrosinkinase-Aktivität. Durch die Bindung von Insulin rücken die beiden α -Untereinheiten dichter zusammen. Diese Konformationsänderung wird an die β -Untereinheiten weitergegeben, was zu deren wechselseitigen Phosphorylierung durch die Tyrosinkinasen führt. Die Phosphorylierung von Tyrosinen an den Positionen 1158, 1162 und 1163 spielen funktionell eine wichtige Rolle [8, 9].

IRS-1 und IRS-2 spielen eine herausragende Rolle in der Vermittlung des Insulinsignals, während IRS-3 und IRS-4 (Vorkommen in Nervenzellen, Thymus, Niere) weniger bedeutend sind [16]. Die Phosphorylierung des IRS-1 an Tyrosin 608 und 628 ist dabei von besonderer Bedeutung [17]. Über diese Phosphotyrosine interagiert das IRS-1 mit der regulatorischen Untereinheit p85 der PI3-Kinase. Die so an die Zellmembran gekoppelte PI3-Kinase phosphoryliert mit der katalytischen Untereinheit p110 das Phospholipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat PIP₃ [18]. Nun ist die Bindung der Phosphoinositid-abhängigen Kinasen 1 und 2 (engl. phosphoinositide-dependent kinase, PDK1, 2) möglich, die dadurch aktiviert werden. Die PDK1 phosphoryliert die Proteinkinase-B (PKB auch AKT) an Threonin 308. Die Phosphorylierung an Serin 473 ist nicht abschließend geklärt, möglicherweise erfolgt sie ebenfalls durch die PDK1, oder aber durch die PDK2. Auch eine Autophosphorylierung oder die Beteiligung einer anderen Proteinkinase (Integrin-linked Kinase) werden diskutiert [19, 20]. Für die vollständige Aktivierung der PKB müssen beide Aminosäuren phosphoryliert werden. Durch solitäre Phosphorylierung von Threonin 308 kommt es nur zu einer partiellen Aktivierung der PKB, eine solitäre Phosphorylierung von Serin 473 führt zu keiner Aktivitätssteigerung [21].

Neben der PKB werden durch die PDK1 auch weitere Proteine phosphoryliert, darunter die Proteinkinase-C (PKC ζ/β) [22].

Eine Aktivierung der PKB ist nicht nur über eine Phosphorylierung durch die PDK1, sondern durch andere Mediatoren möglich. Dabei handelt es sich um Stoffe, die die Konzentration an zyklischem AMP (engl. cyclic AMP, cAMP) erhöhen. Dazu gehören Forskolin, Chloro-Phenylthio-cAMP, Prostaglandin-E1, und 8-Bromo-cAMP. Diese Substanzen führen zu einer Phosphorylierung der PKB an Threonin 308 [23].

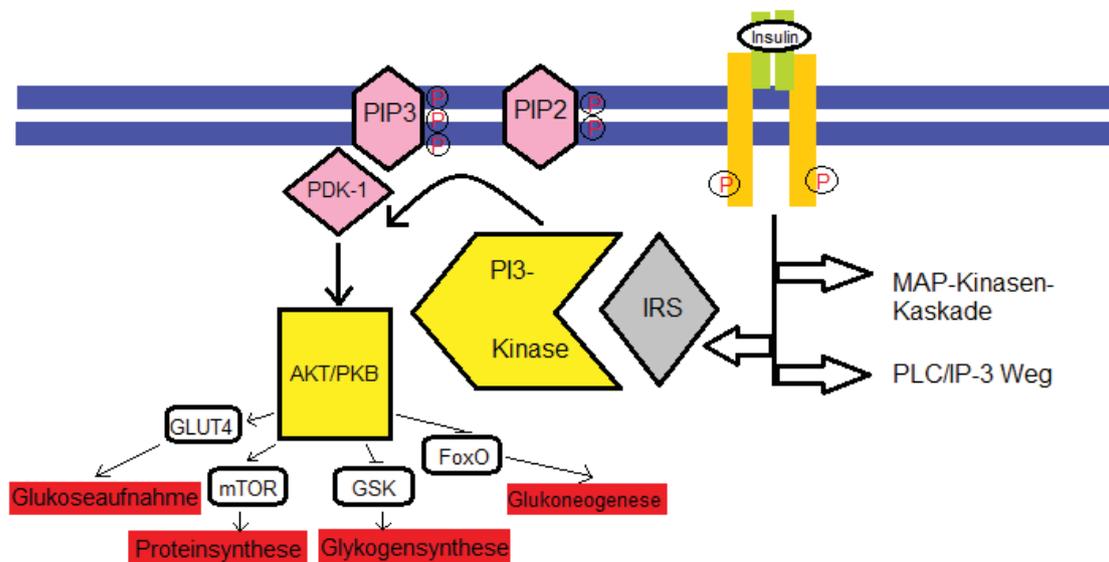


Abb. 2 Schematische Darstellung der Insulinsignalkaskade mit Phosphorylierung der Proteinkinase B (PKB/AKT) durch die Phosphatidylinositol-3-(PI3)-Kinase –Kaskade.

Nach Bindung von Insulin an den Insulinrezeptor und Autophosphorylierung der β -Untereinheiten phosphoryliert die Tyrosinkinase das Insulin-Rezeptor-Substrat (IRS). Das IRS interagiert mit der PI3-Kinase, die sich dadurch an die Zellmembran bindet und dort Phospholipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃) phosphoryliert. Die Phosphorylierung der PKB erfolgt durch die Phosphoinositid-abhängigen Kinase 1 (PDK1), die zuvor eine Bindung mit dem PIP₃ eingegangen ist. Die PKB beeinflusst ihrerseits eine Reihe von Stoffwechselfvorgängen, wie z.B. die Glukoseaufnahme über Glukosetransporter vom Typ 4 (GLUT 4), die Proteinsynthese über Mammalian Target of Rapamycin (mTOR), die Glykogensynthese über die Glykogensynthase-Kinase (GSK) und die Glukoneogenese über das Forkhead-Box-Protein (FoxO).

1.4 Bedeutung der Proteinkinase-B (PKB/AKT)

Als wichtigster Effektor der PI3-Kinase nimmt die PKB bei der Vermittlung Insulin-spezifischer Effekte eine herausragende Rolle ein. Die PKB ist 57 kDa groß und liegt in den Isoformen α , β , γ vor, wobei die β -Isoform für die Insulinsignaltransduktion von besonderer Bedeutung ist, da sie bevorzugt in Insulin-sensiblen Geweben exprimiert wird. Über die Phosphorylierung von diversen Zielproteinen nimmt die PKB unter anderem Einfluss auf die Glykogensynthese, den Glukosetransport, die Proteinbiosynthese und die Lipogenese [24].

Die Glykogensynthese wird über das direkte Substrat der PKB, die Glykogensynthase-Kinase-3 (GSK-3), reguliert. Dieses wird durch die PKB phosphoryliert und damit inaktiviert. Dadurch wird in Folge die

Phosphorylierung der Glykogensynthase durch die GSK-3 gehemmt und der inhibierende Einfluss der GSK-3 auf die Glykogensynthese reduziert. Als Folge kommt es zu einer gesteigerten Glykogensynthese [25, 26].

Die PKB nimmt auch Einfluss auf die Glukoneogenese in der Leber (und Niere) und auf die Glykogenolyse in Leber und Muskel. Dies geschieht über die Modulation der Expression der Glukose-6-Phosphatase (G6Pase). Bindet der Transkriptionsfaktor Forkhead-Box-protein-O1 (FoxO1) an den Promotor der G6Pase wird dessen Expression ermöglicht. Durch den bei hohen Insulinspiegeln aktivierten PI3-Kinase-Signalweg, wird FoxO1 über die PKB an Threonin 24, Serin 256 und Serin 319 phosphoryliert. Im Folgenden kommt es zu einer Bindung von Protein 14-3-3 an FoxO1. Im nun phosphorylierten Zustand löst sich FoxO1 vom Promotor der G6Pase und wird aus dem Zellkern exportiert. Dadurch resultiert eine Suppression der G6Pase-Expression und damit verbunden eine reduzierte Glukoneogenese [27].

Im Muskel- und Fettgewebe vermittelt die PKB den Einbau von Glukosetransportern vom Typ 4 (GLUT-4) in die Zellmembran, wodurch es zu einer gesteigerten Glukoseaufnahme in die Zelle kommen kann [28].

1.5 Aufbau der AMPK und Vorgang der Aktivierung

Die AMPK ist aus einer katalytischen α -, einer Glykogen-bindenden β -, und einer AMP- und ATP-bindenden γ -Untereinheit aufgebaut. Es gibt je zwei Isoformen der α - und β -Untereinheiten. Während die α -1- und β -1-Untereinheiten ubiquitär vorkommen, werden die α -2- und β -2-Untereinheiten nur im Muskel sowie in der Leber (α -2) exprimiert. Von der γ -Untereinheit gibt es drei Isoformen, die ubiquitär (γ -1), im Muskel (γ -2) sowie im Skelettmuskel (γ -3) vorkommen [29, 30].

Die AMPK ist ein Sensor für den zellulären Energiestatus. Ihre Aufgabe ist es, die Zelle vor Energiemangel zu schützen. Im Rahmen von metabolischem Stress kommt es in der Zelle zu einem gesteigerten ATP-Verbrauch und einen verminderten ATP-Aufbau. Dabei reichert sich AMP in der Zelle an und führt zu einem Anstieg des AMP/ATP-Quotienten. Das vermehrt anfallende AMP bindet an das allosterische Zentrum der γ -Untereinheit der AMPK, wodurch es zu

einer Konformationsänderung kommt. Die geänderte Konformation steigert die Affinität einer Kinase (Komplex aus LKB1, STRAD und MO 25) für die AMPK. Die Kinase phosphoryliert die AMPK an Threonin 172 der α -Untereinheit [31, 32] (s. Abb. 3). Die allosterische Bindung von AMP an die AMPK steigert die Aktivität des Enzyms um das Zehnfache. Durch die zusätzliche Phosphorylierung kommt es zu einer hundertfachen Aktivitätssteigerung im Vergleich zur basalen Aktivität [31, 33].

Eine AMP-unabhängige Phosphorylierung der AMPK erfolgt durch die Kalzium-Calmodulin-abhängige Kinase Kinase β (CAMKK β). Die CAMKK β wird neben Kalzium auch von einem ansteigenden Kreatinin/Phosphokreatinin -Quotienten in der Muskulatur aktiviert [34, 35] (s. Abb. 3).

Die AMPK steht im Zentrum eines Netzwerkes von Stoffwechselfvorgängen, die Zellen das Überleben bei Energiemangel erlauben. Nicht nur Nährstoffmangel, auch bei zellulären Stresssituationen, wie muskulärer Aktivität und Hypoxie [36, 37], sowie durch Hormone (z. B. Adiponektin, Leptin) kommt es zu einer Phosphorylierung der AMPK [38].

5-Aminoimidazol-4-carboxamid-1- β -D-ribofuranosid (AICAR) wird bei Untersuchungen zum Einfluss der AMPK auf den Stoffwechsel und zu Interaktion mit anderen Stoffen wie Insulin verwendet. AICAR wird über den Adenosintransporter in die Zelle aufgenommen [39] und dort durch Adenosinkinasen in 5-Aminoimidazol-4-carboxamid-ribonucleosid (ZMP) phosphoryliert. Dieser Metabolit des AICAR imitiert die durch einen hohen AMP-Spiegel hervorgerufenen Effekte [40].

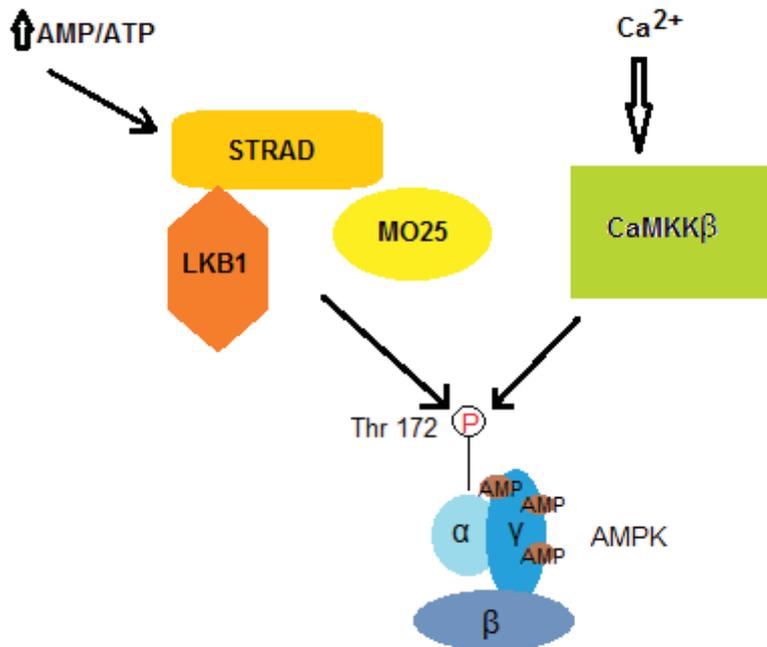


Abb. 3 Phosphorylierung der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK)

Die AMPK wird an Threonin (Thr) 172 durch den Komplex aus STRAD, LKB1, MO25 bei einem steigenden AMP/ATP-Quotienten und durch die Kalzium-Calmodulin-abhängige Kinase Kinase β (CaMKK β) bei einem ansteigenden Kalziumspiegel (Ca^{2+}) phosphoryliert. Modifiziert nach [41].

1.6 Stoffwechseleffekte der AMPK in der Leber

Der Einfluss der AMPK auf den Stoffwechsel ist durch eine Hemmung anaboler- und durch eine Förderung kataboler Stoffwechselfvorgänge gekennzeichnet.

Im Rahmen des Glukosestoffwechsels hat die AMPK einen energieeinsparenden Effekt durch die Hemmung der hepatischen Glukoneogenese [42]. Beim Lipidstoffwechsel hemmt die AMPK die Schlüsselenzyme der Fettsäure- und Cholesterinsynthese, Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC) und 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A Reduktase (HMG-CoA-Reduktase). Gleichzeitig kommt es zu einer vermehrten Fettsäureoxidation in den Mitochondrien [43] (s. Abb. 4).

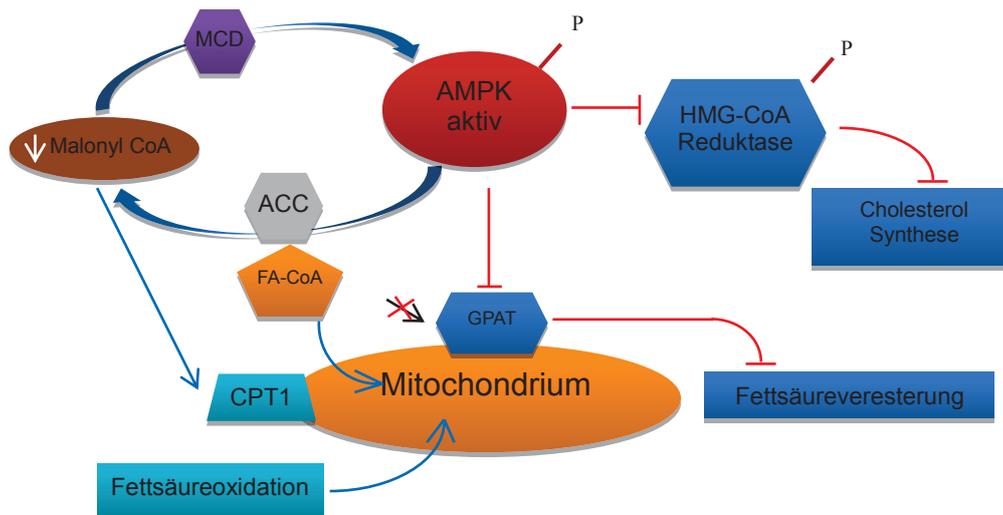


Abb. 4 Regulation des Lipidstoffwechsels durch die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) der Leber. Modifiziert nach [44]. HMG-CoA-(3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A) Reduktase, ACC (Acetyl-CoA-Carboxylase), MCD (Maloyl-CoA-Decarboxylase), CPT (Carnitin-Palmitoyl-Transferase-1), GPAT (Glycerol-3-Phosphat-Acetyltransferase)

Eine weitere Möglichkeit zur Einsparung von ATP ist die Hemmung der Proteinsynthese. Hier ist die Proteinkinase Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) als ein Schlüsselenzym Hauptangriffspunkt der AMPK [45, 46]. Nach Aktivierung der AMPK wird mTOR an Threonin 2446 phosphoryliert und inaktiviert das Protein dadurch [47]. In der Folge wird die Proteinsynthese gehemmt. Nach Insulinstimulation kommt es zu einer Phosphorylierung von mTOR an Threonin 2448 [47] und damit zu einer Steigerung der Proteinsynthese. Neben den schnell wirksamen Effekten zur Erhaltung der Energiebalance der Zelle, wurden auch langanhaltende Effekte der AMPK auf den zellulären Stoffwechsel nachgewiesen, die durch die Regulation der Genexpression erzielt werden. Zhou et al. konnten nach Aktivierung der AMPK durch Metformin eine verminderte Expression des Sterol Regulatory Element-binding Protein 1 (SREBP-1), einem Transkriptionsfaktor der Lipogenese, nachweisen [43]. Eine erhöhte SREBP-1-Expression wird als wichtiger pathophysiologischer Faktor bei einer Insulinresistenz und dem metabolischen Syndrom bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ II vermutet [48, 49]. Durch die

Aktivierung der AMPK verringert sich die Expression der Gene für Schlüsselenzyme der Glukoneogenese (Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK) und Glukose-6-Phosphatase (G6Pase) [50].

1.7 AMPK und ihre Interaktion mit dem Insulin-Signaltransduktionsweg

Während der Insulinsignaltransduktionsweg bei Energieüberfluss, also bei anaboler Stoffwechsellage aktiv ist, wird die AMPK bei Energiemangel, also bei kataboler Stoffwechsellage aktiviert. Beide Stoffwechselwege verursachen daher häufig gegensätzliche Effekte. So werden durch Insulin die Lipid-Protein- und Glykogensynthese gefördert, während sie durch die AMPK gehemmt werden.

Jedoch treten auch gleichgerichtete Stoffwechseleffekte auf, die allgemein zu einer Abnahme des Blutzuckerspiegels führen. In der Leber vermindern beide Stoffwechselwege die Expression von Schlüsselenzymen der Glukoneogenese (PEPCK und G6Pase). Am Skelettmuskel wird durch beide Stoffwechselwege der Einbau von GLUT-4 in die Zellmembran gefördert, wodurch es zu einer vermehrten Glukoseaufnahme in die Zelle kommt. Bei einer Stoffwechsellage mit aktivierter AMPK wird Glukose in die Zelle aufgenommen, um sie über die Glykolyse und nachfolgende katabole Prozesse zu verstoffwechseln und ATP für den Zellstoffwechsel zu gewinnen. Durch die Hemmung der Glykogensynthese wird eine ATP-Einsparung erreicht. Bei Energieüberfluss und hohen Insulinspiegeln wird Glukose aufgenommen, um es als Glykogen zu speichern. Bei dieser Stoffwechsellage wird die hepatische Glykolyse durch den vorherrschenden Glukoseüberschuss gehemmt.

Weiter wird die Lipolyse in Adipozyten sowohl durch den Insulinsignaltransduktionsweg als auch durch die AMPK gehemmt.

Bislang ist die Interaktion der beiden Stoffwechselwege nicht hinreichend aufgeklärt und daher aktuell Gegenstand intensiver wissenschaftlicher Forschung. Interessanterweise kann Insulin die durch eine Phosphorylierung an Threonin 172 hervorgerufene Aktivierung der AMPK durch eine

Phosphorylierung an Serin 485 und 491 antagonisieren [51]. Zudem ist bekannt dass die AMPK eine Verstärkung des Insulinsignals durch eine Phosphorylierung des IRS-1 an Serin 789 bewirken kann [17].

1.8 Ziele der Arbeit

Aufgrund der günstigen Auswirkungen auf den Stoffwechsel gilt die Aktivierung der AMPK als vielversprechende Therapieoption des Diabetes mellitus Typ II. Die Reduktion der bei Typ II Diabetikern stark erhöhten hepatischen Glukoseproduktion durch die AMPK führt zu einer besseren Kontrolle der Blutzuckerwerte.

In dieser Arbeit wird der Einfluss der Aktivierung der AMPK auf die Insulinsignaltransduktion untersucht. Zu diesem Zweck wird AICAR, ein direkter Aktivator der AMPK verwendet.

Im Einzelnen werden folgende Schlüsselstellen der Insulinsignaltransduktionskaskade untersucht:

- Insulinrezeptor, Phosphorylierung an Tyrosin 1162/1163
- IRS-1, Phosphorylierung an Serin 312
- PKB/AKT, Phosphorylierung an Serin 473
- GSK-3, Phosphorylierung an Serin 9

An den genannten Aminosäurepositionen wird der Phosphorylierungszustand nach Insulinstimulation gemessen. Parallel dazu wird untersucht, ob und in welchem Ausmaß die Phosphorylierung durch die Gabe von AICAR moduliert wird.

Die Fragestellung wird in einem Zellkulturmodell mit Ratten- und humanen Hepatomazellen, untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Zellbiologische Arbeitstechniken

2.1.1 Zellkultur und verwendete Medien

Die Zellkultivierung erfolgte in einem Inkubator bei 37° C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit einem Anteil von 5 Vol.-% CO₂ und 95 Vol.-% Luft.

In Abhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit erfolgte ein Mediumwechsel jeden zweiten Tag, selten auch täglich.

Serumhaltiges Medium:

- 500 ml Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM) high Glucose (PAA Laboratories, Pasching, Österreich)
- 10 % fötales Kälberserum (engl. fetal calf serum, FCS) (Berbio, Aalst, Belgien)
- 1 % Penicillin (Endkonzentration: 100 U/ml) / Streptavidin (Endkonzentration: 100 mg/l) als 100faches Konzentrat (Biochrom, Berlin)

Serumfreies Medium:

- 485 ml DMEM high Glucose (PAA Laboratories, Pasching, Österreich)
- 0,01 mg/ml Rinderserumalbumin (engl. bovine serum albumin, BSA)
- 5 ml 1 M 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure (HEPES, Endkonzentration: 10 mM)
- 1 % Penicillin (Endkonzentration: 100 U/ml) / Streptavidin (Endkonzentration: 100 mg/l) als 100faches Konzentrat (Biochrom, Berlin)

Die Medien wurden unter sterilen Bedingungen gemischt und im Anschluss über einen Vakuumfilter (Membrantyp: PES 0,22 µm; TPP, Trasadingen, Schweiz) filtriert.

2.1.2 Subkultivierung

Vor Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Zunächst wurde hierzu das Kulturmedium abpipettiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit Phosphate-buffered saline (PBS) gewaschen und dann mit 1 ml 0,05 %igem Trypsin/Ethylendiamintetraacetat (EDTA) für ca. 5 min im Brutschrank inkubiert und damit abgelöst. Durch Zugabe von 10 ml PBS wurde die Trypsinierung gestoppt. Nach Zentrifugieren der Zellsuspension bei 23° C und 410 x g für 5 min konnte der Überstand verworfen und nach Resuspension das Zellmaterial auf neue Kulturgefäße aufgeteilt werden.

Verwendete Materialien:

- Dulbecco PBS ohne Ca^{2+} , Mg^{2+} (PAA Laboratories, Pasching, Österreich)
- Trypsin-EDTA (PAA Laboratories, Pasching, Österreich)
- serumhaltiges Medium (s. o.)

2.1.3 Kryokonservierung von Zellen

Zunächst wurden die Zellen, wie in Kap. 2.1.2 beschrieben, durch eine Behandlung mit Trypsin vom Boden des Kulturgefäßes abgelöst. Die Zellen wurden dann in serumhaltigem Medium resuspendiert und 5 min bei 23° C und 410 x g zentrifugiert. Nach Abpipettieren des Überstandes wurde das Zellpellet in Einfriermedium resuspendiert und in Kryoröhrchen aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -80° C.

Einfriermedium:

- 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) in FCS

Das Auftauen der Zellen erfolgte bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden die Zellen in serumhaltigem Medium suspendiert, pelletiert und in das Kulturmedium überführt.

2.1.4 Zellstimulation

Die Zellen wurden in 6-Well-Platten kultiviert. Nach Entfernen des Kulturmediums wurden die Zellen dreimal mit vorgewärmtem PBS gewaschen und dann für mindestens zwölf Stunden in serumfreiem Medium kultiviert. Damit sollte die basale Phosphorylierung der an der Signaltransduktion beteiligten Proteine, hervorgerufen durch die im Serum enthaltenen Wachstumsfaktoren, möglichst minimiert werden. Im Anschluss wurden die Zellen erneut dreimal mit PBS gewaschen und in Abhängigkeit vom Versuch stimuliert.

Verwendete Materialien:

- serumfreies Medium
- Dulbecco PBS ohne Ca^{2+} , Mg^{2+} (PAA Laboratories, Pasching, Österreich)
- 6-Well Zellkulturplatten (TPP, Trasadingen, Schweiz)
- Insulin (Roche, Mannheim, Deutschland)

2.1.5 Zelllinien

H4-II-E:

Adhärent wachsende Ratten-Hepatomazelllinie (*Rattus norvegicus*).

Hep-G2:

Adhärent wachsende humane Zelllinie eines kindlichen Hepatoblastoms.

2.2 Proteinchemische Arbeitstechniken

2.2.1 Proteinbestimmung mit dem BCA-Protein-Assay

Die Quantifizierung der Proteinkonzentration ist eine Grundvoraussetzung zur Durchführung eines Western-Blots. Sie erfolgte für die hier dargestellten Versuche mittels eines BCA-Protein-Assay Kit (Pierce, Rockford, Illinois, USA), der auf der Biuret-Reaktion basiert.

In alkalischer Lösung reagieren Proteine mit Cu^{2+} -Ionen zu Cu^+ -Ionen. Durch Zugabe von Bicinchinonsäure (engl. bicinchoninic acid, BCA) entsteht ein violetter Farbkomplex. Dieser ist in seiner Extinktion proportional zur eingesetzten Proteinmenge. Zur Quantifizierung der Proteinmenge wird eine BSA-Eichkurve vorgelegt.

Erstellung der BSA-Eichkurve: Schrittweise Erstellung unterschiedlicher Konzentrationen durch Verdünnen von BSA (100 mg/ml) mit dem Lysepuffer (s.u.) des Zelllysats.

In einer Mikrotiterplatte wurden 5 μl Zelllysats bzw. Proteinstandard mit 100 μl Reaktionslösung bestehend aus BCA-Reagenz A und B (Mischungsverhältnis 50:1) versetzt. Ein Well wurde nur mit Reaktionslösung befüllt und diente als Leerwert.

Im Anschluss erfolgte eine 60-minütige Inkubation bei 37° C. Mittels eines Mikroplattenphotometers wurde im Anschluss die Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen.

Die Ermittlung der Proteinkonzentration der Proben erfolgte anhand eines Vergleichs mit der linearen BSA-Eichkurve.

Materialien:

- BCA-Assay Kit der Firma Pierce, Rockford, USA
- 96-Well Mikrotiterplatte
- BSA-Standardreihe
- Zelllysats

2.2.2 ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

Der ELISA gehört zu der Gruppe der Immunoassay-Verfahren und dient zum Nachweis von Antigenen (z. B. Proteinen). Durch eine spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion mit einem Enzym-gekoppelten Antikörper lässt sich die Menge des markierten Antigens in einer Farbreaktion quantifizieren.

Die in dieser Arbeit verwendeten ELISA der Firma Biosource arbeiten nach dem Prinzip des Double-Antibody-Sandwich-ELISA.

Die Proben werden in Mikrotiterplatten pipettiert, auf dessen Boden ein Antigen-spezifischer Immunglobulin-G-(IgG)-Antikörper gebunden ist (coating-Antikörper). Das nachzuweisende Antigen der Probe geht eine Verbindung mit dem coating-Antikörper ein. Ein im Anschluss durchgeführter Waschvorgang entfernt ungebundene Bestandteile der Probe. Es folgt die Zugabe eines zweiten, ebenfalls Antigen-spezifischen IgG-Antikörpers, wodurch ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex entsteht (Sandwich-ELISA). Nach einem erneuten Waschvorgang wird ein sogenannter Detektions-Antikörper zugegeben, an dessen Fc-Teil Merrettichperoxidase (engl. horseradish peroxidase, HRP) gebunden ist. Im letzten Schritt wird in jedes Well HRP-Substrat zugegeben, wodurch es zu einem Farbumschlag kommt, der photometrisch quantifiziert werden kann. Dabei verhält sich die gemessene Extinktion proportional zur Konzentration des Antigens in der Probe.

Material:

- AKT-Lysepuffer: (50 mM HEPES pH 7,6, 1 % v/v Triton x-100, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 % v/v Glycerol, 1 mM Dithiothreitol (DTT), vor Gebrauch 1 mM Natriumvanadat und 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) hinzugeben)

ELISA-Immunoassay-Kits (Biosource, Nivelles, Belgien):

- Insulinrezeptor Tyrosin 1162/1163,
- Insulinrezeptor β -Subunit,
- IRS-1 Serin 312,
- IRS Total,

- PKB/AKT Serin 473,
- PKB/AKT Total,
- GSK-3 Serin 9,
- GSK-3 Total

Durchführung:

Vor Durchführung des ELISA erfolgte eine Zellstimulation für 15 min. in 6-Well-Platten. Die Zellen wurden vor der Stimulation mindestens zwölf Stunden in serumfreiem Medium kultiviert. Nach der Stimulation wurden die Zellen dreimal mit gekühltem D-PBS gewaschen und anschließend durch Zugabe von 350 µl AKT-Lysepuffer für 30 min. auf Eis lysiert. Nach Überführung des Lysats in 1,5 ml Reaktionsgefäße erfolgte eine Zentrifugation bei 4° C mit 20780 x g für 10 min.. 10 µl des Überstands wurden mit 90 µl des mitgelieferten Verdünnungspuffers gemischt und in die mit dem coating-Antikörper präparierten 96-Well-Mikrotiterplatte des ELISA pipettiert. Einer zweistündigen Inkubation bei Raumtemperatur schloss sich ein viermaliger Waschvorgang, mit dem vom Hersteller mitgelieferten Waschpuffer an. Im Anschluss wurde jedes Well mit 100 µl einer Lösung des zweiten Antikörpers befüllt. Einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur folgte ein erneuter viermaliger Waschvorgang. Im nächsten Schritt wurde in jedes Well 100 µl eines Detektionsantikörpers gegeben und 30 min. inkubiert. Nach erneutem viermaligem Waschen wurden 100 µl der mitgelieferten Chromogenlösung in die Wells gefüllt und die Proben 25 min. im Dunklen bei Raumtemperatur inkubiert. Der entstandene gelbe Farbumschlag wurde nach Zugabe von 100 µl einer mitgelieferten Stop-Lösung photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Analyse der zu untersuchenden Antigene erfolgte jeweils mit einem ELISA, der ausschließlich die phosphorylierten Proteine detektierte (Phospho-ELISA), und danach mit einem ELISA, der das Protein unabhängig von seinem Phosphorylierungszustand quantifizierte (Total-ELISA). Dadurch war es möglich den Anteil der phosphorylierten Proteine an der Gesamtmenge für jedes Protein zu bestimmen. Jedem ELISA diente ein im Kit mitgelieferter Massenstandard als Normierung.

2.2.3 Western-Blot

Mit einem Western-Blot (auch Immunoblot) lassen sich Proteine nachweisen, die auf eine Trägermembran übertragen (engl. blotting) werden. Durch das Verwenden spezifischer primärer und sekundärer Antikörper kann im Anschluss das Vorhandensein bestimmter Zielproteine nachgewiesen werden. Die Proteine werden dabei über eine Peroxidase-reaktion (sekundärer Antikörper ist an Peroxidase gekoppelt) nachgewiesen.

Zunächst erfolgt eine Gel-Elektrophorese in einer Trägermatrix (Polyacrylamidgel), in der die Proteine entsprechend ihrer Größe und/oder Ladung aufgetrennt werden. Die im Gel enthaltenen Proteinbanden werden im nächsten Schritt auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (geblottet). Ein Primärantikörper bindet an das Epitop des gesuchten Antigens. Ein Peroxidase-gekoppelter Sekundärantikörper bindet an den Primärantikörper. Nach Zugabe des Western-Blotting Substrates katalysiert die Peroxidase eine Chemoluminiszenzreaktion, die durch Belichtung eines Films dargestellt wird und dem Nachweis der entsprechenden Proteine dient.

Materialien:

- polyklonale Antikörper, proteinspezifisch
- polyklonale Anti-IgG, Peroxidase gekoppelt (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark)
- NT-BPF (NaCl, Tris, BSA, Pyrophosphat, Fluorid): 50 mM Natriumchlorid, 50 mM Trishydroxymethylaminomethan-(Tris)-base, 50 mM Natriumpyrophosphat, 100 mM Natriumfluorid, 0,1 % (m/v) Natrium-Methylhydroxybenzoat, 0,5 % (m/v) BSA, 0,05 % (m/v) Triton-X 100 pH 7,4
- Zelllysate (Proteinmenge mittels BCA-Assay zuvor ermittelt)
- Roati-Load 14 x (Roth, Karlsruhe)
- Tris-Tricin Elektrophorese Anoden-Puffer: (24,22 g Tris-Base, in 800 ml H₂O, pH Einstellung auf 8,9 mit konz. HCl, mit dest. H₂O ad 1 l)
- Tris-Tricin Elektrophorese Kathoden-Puffer: (12,11 g Tris-Base, 17,92

g Tricin, 1 g Natriumdodecylsulfat, mit H₂O ad 1 l)

- Massenstandard: PageRuler prestained Protein ladder plus (Fermentas, St. Leon-Rot)

Gel:

- destilliertes Wasser
- Tris-Tricin-Elektrophorese-Gelpuffer (363,4 g Tris-Base in 500 ml H₂O, pH-Einstellung auf 8,45 mit konz. HCl, 3,0 g Natriumdodecylsulfat, mit H₂O auf 1 l auffüllen)
- 30 % (m/v) Bisacrylamid Rotiphorese Gel 30 (37,5:1) (Roth, Karlsruhe)
- 10 % (m/v) Ammonium-Persulfat (APS)
- Tetramethylethylendiamin (TEMED)
- 0,5 % Bromphenolblau
- Isobutanol

Herstellung des Polyacrylamidgels:

Die Größe der Gele betrug 7,0 x 9,0 cm mit einer Dicke von 1,5 mm. Sie bestanden aus einem hochprozentigen Trenngel (untere Phase) und einem niederprozentigen Sammelgel (obere Phase).

Trenngel 10 % (Stammlösung): 6,7 ml dest. H₂O, 6,7 ml Gel-Puffer, 6,7 ml 30 % Acrylamid.

Der Stammlösung wurden 66,7 µl 10 % APS und 50 µl TEMED zugegeben, wodurch die Polymerisation eingeleitet wurde. Nach Überführung der Lösung in eine Gießform, wurden 200 µl Isopropanol auf den oberen Rand des Gels gegeben, um einen scharfen, blasenfreien Abschluss des Gels zu erhalten. Nach vollständiger Polymerisation wurde der Isopropanol-Überstand entfernt.

Sammelgel (Stammlösung): 12,5 ml dest. H₂O, 5 ml Gel-Puffer, 2,5 ml 30 % Acrylamid, 1 Trpf. Bromphenolblaulösung

Durch Zugabe von 100 µl 10 % APS und 80 µl TEMED wurde die Polymerisation gestartet. Das Sammelgel wurde auf das Trenngel gegossen. Vor der Auspolymerisation wurde ein Kunststoffkamm (Breite 1,5 mm, 10 Spuren) auf der Oberseite des Gels eingesteckt, der nach der Auspolymerisation vorsichtig entfernt werden konnte.

Blot:

- Nitrocellulose-Transfer-Membran (Whatman, Dassel)
- Rotilabo-Blottingpapier 1,5 mm (Roth, Karlsruhe)
- SemiDry-Transfer-Puffer (48 mM Tris-Base, 39 mM Glycin, 0,04 % (m/v) Natriumdodecylsulfat in H₂O, 40 % (v/v) Methanol)
- CL-XPosure Film Clear Blue X-Ray Film (Pierce, Rockford, Illinois, USA)
- Pierce ECL Western-Blotting Substrat (Pierce, Rockford, Illinois, USA)

Verwendete Antikörper (cell signaling, Bosten, MA):

- Primäre Antikörper:
Phospho-AKT Serin 473, No. 4058s
Total-AKT, No. 9272
- Sekundäre Antikörper:
Anti-Rabbit IgG, HRP-linked Antibody, No. 7074 P2

Durchführung des Western-Blots:

Um die Proteine des Zelllysats vollständig zu denaturieren, wurde dem Lysat Laemmli-Puffer (4 x Roati-Load, Verhältnis Lysat: Roati-Load 3:1) zugegeben und 7,5 min. bei 99° C erhitzt. Danach wurden 40 µg des Zelllysats in die Geltasche des Polyacrylamidgels gefüllt. Das entsprechende Volumen wurde zuvor mittels des BCA-Assays ermittelt. Ein Proteinmarker (PageRuler, 2 µl) diente in einer Elektrophoresespur neben den Probenspuren als Größenstandard. Die Elektrophorese wurde bei einer Feldstärke von 2 bis 5 V/cm durchgeführt. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn das Bromphenolblau des Größenstandards die Unterkante des Gels erreicht hatte. Nun erfolgte die Übertragung der Proben auf eine Nitrozellulosemembran. Dazu wurde zunächst das Sammelgel entfernt und das Trenngel mit destilliertem Wasser gewaschen. Nun wurde das Gel in einer Semi-dry Apparatur zwischen zwei Lagen Rotilabo Blottingpapier (1,5 mm) gelegt. Eine Nitrozellulosemembran wurde zwischen Gel und Anode platziert und wie das verwendete Filterpapier vor dem Zusammenbau der Apparatur mit SemiDry-

Transfer-Puffer getränkt. Die Übertragung der Proteine auf die Membran erfolgte durch Anlegen einer Stromdichte von $0,8 \text{ mA/cm}^2$ für zwei Stunden. Durch Färben der Membran mit Ponceau S wurde der Transfer der Proteine kontrolliert. Um freie Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren, wurde die Membran in einem weiteren Schritt 15 min. bei Raumtemperatur in NT-PBF inkubiert. Das Gel wurde nach dem Blot mit Coomassie gefärbt, so dass die im Gel verbliebenen Proteine und das durch die Elektrophorese entstandene Bandenmuster sichtbar wurde. Die Membran wurde bei 4° C über Nacht mit dem primären Antikörper inkubiert. Danach erfolgten drei Waschvorgänge in NT-BPF bei Raumtemperatur und anschließend die einstündige Inkubation mit dem sekundären Antikörper (1:5000 bzw. 1:10000 in NT-PBF). Nach drei weiteren Waschvorgängen in NT-PBF wurde die Membran in der Dunkelkammer mit Pierce ECL Western-Blotting Substrat A+B (Mischungsverhältnis 1:1) für 2 min. inkubiert. Die entstandene Chemolumineszenz wurde durch Belichtung eines Films und Entwicklung in einer Filmentwicklungsmaschine dargestellt.

Re-Blot

Materialien:

- Ablösungs-Puffer: (8 g Tris-Base, 20 g Natriumdodecylsulfat in 500 ml H_2O , pH Einstellung auf 7,4 mit konz. HCl, mit H_2O auf 1 l auffüllen, Mercaptoethanol zugeben)
- Nitrozellulosemembran (geblottet und mit Antikörper benetzt)
- NT-BPF (s. o.)
- polyklonale Antikörper, proteinspezifisch

Durch Behandeln der Membran mit dem Ablösungs-Puffer für 10 min. wurden primäre und sekundäre Antikörper von der Membran entfernt. Im Anschluss wurde die Membran mit NT-BPF erneut geblockt und im Weiteren wie oben bei der Durchführung des Western-Blots verfahren.

Im ersten Blot wurden die phosphorylierten Proteine nachgewiesen. Der Re-Blot diente zum Nachweis des Gesamtproteins.

2.2.4 Coomassie-Färbung

Materialien:

- Polyacrylamidgel, nach Gelelektrophorese und Blot
- Färbelösung: 0,1 % (m/v) Coomassie Blau R-250, 45 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Eisessig, mit dest. Wasser auf 1 l Gesamtvolumen
- Entfärber: 10 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Eisessig, mit dest. Wasser auf 1 l Gesamtvolumen

Bei der Coomassie-Färbung wurde das Gel in der Färbelösung einige Minuten inkubiert. Dabei binden basische- und aromatische Seitenketten der Proteine den Farbstoff. Nach Schwenken des Gels im Entfärber wurden die angefärbten Proteinbanden sichtbar. Die Coomassie-Färbung dient als Kontrolle der Gelelektrophorese (s. Kap. 2.2.3).

2.2.5 Ponceau-Färbung

Materialien:

- Nitrozellulosemembran, geblottet, ungeblockt
- Ponceau S Farblösung (0,5 g Ponceau S 0,1 %, 500 ml 5 % Essigsäure)

Bei der Ponceau-Färbung wurde nach dem Blotten die ungeblockte Membran in der Ponceau-Lösung inkubiert. Die auf der Membran vorhandenen Proteine färben sich an, wodurch der Transfer der Proteine von dem Acrylamidgel auf die Membran angezeigt wird. Unspezifische Bindungsstellen werden durch nachfolgendes Inkubieren der Membran in NT-BPF geblockt und überschüssiger Farbstoff von BSA absorbiert.

2.3 Statistik

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit dem Programm IBM SPSS Statistics. Zu den erhobenen Daten wurden der Mittelwert (arithmetisches Mittel) und die Standardabweichung ermittelt. Die Standardabweichung wurde als Fehlerindikator in die Diagramme eingefügt. Die statistische Signifikanz wurde anhand des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests ermittelt. Die maximale Irrtumswahrscheinlichkeit der errechneten p-Werte wurde mit einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ festgelegt, da in der Literatur p-Werte $< 0,05$ grundsätzlich als statistisch signifikant angenommen werden.

3 Ergebnisse

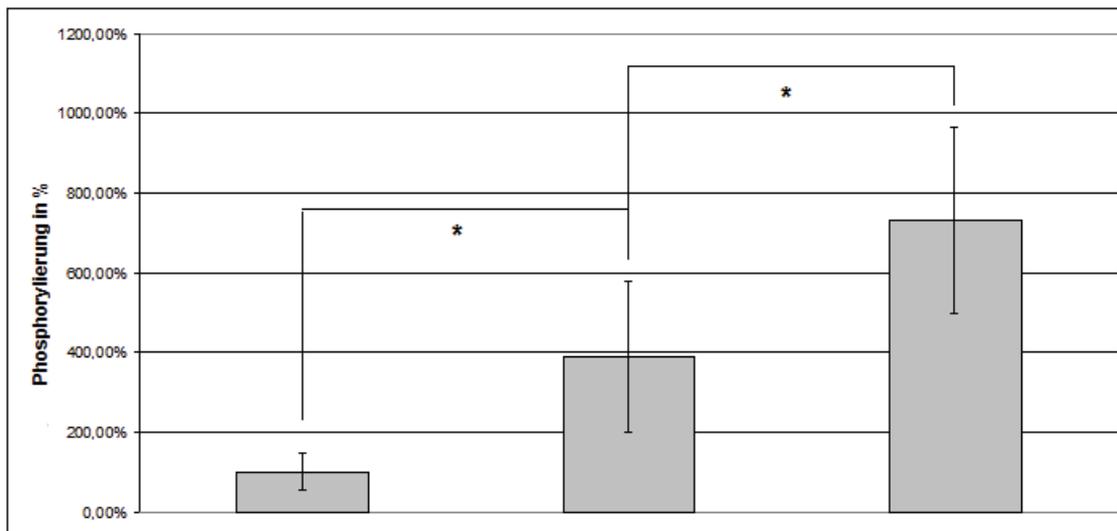
3.1 Regulation der Proteinkinase B in Abhängigkeit von Insulin

Zunächst wurde der Effekt von Insulin auf den Phosphorylierungszustand der PKB an zwei unterschiedlichen Zelllinien untersucht. Beispielhaft wurde dazu der Phosphorylierungszustand an Serin 473 gemessen.

Zur Senkung der basalen Phosphorylierung der an der Signaltransduktion beteiligten Proteine, durch die im Serum enthaltenen Wachstumsfaktoren wurden die Zellen vor dem Versuch zwölf Stunden in serumfreiem Medium inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen 15 min. mit Insulin stimuliert. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Insulin. Anschließend wurde die Gesamt-PKB-Menge und die Menge an phosphoryliertem (Serin 473) PKB in den Zelllysaten mit jeweils einem entsprechenden ELISA bestimmt um die Phospho-Proteinmenge in Relation zur Gesamtproteinmenge zu setzen.

Der basale Phosphorylierungszustand der Kontrolle wurde in der Auswertung mit 100 % angegeben.

3.1.1 H4-II-E-Zelllinie



Insulin 10 ⁻⁹ M	-	+	-
Insulin 10 ⁻⁸ M	-	-	+

Abb. 5 Einfluss von Insulin (10⁻⁸ M und 10⁻⁹ M) auf die Phosphorylierung der PKB an Serin 473 in H4-II-E-Zellen

Für die Mittelwerte und die Standardabweichung wurden drei Versuchsreihen mit jeweils drei bis vier parallelen Proben pro Konzentration gemessen.

* Statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle bzw. zwischen den beiden Insulinkonzentrationen ($p < 0,05$).

Nach Stimulation der Zellen mit Insulin konnte ein signifikanter Anstieg der Phosphorylierung an Serin 473 der PKB im Vergleich zur nicht-stimulierten Kontrolle detektiert werden.

Im Vergleich zur Kontrolle stieg der Grad der Phosphorylierung um 390 % (Insulin 10⁻⁹ M) und 731 % (Insulin 10⁻⁸ M).

Die Stimulation der Zellen mit Insulin in der Konzentration 10⁻⁸ M führte zu einem signifikanten Anstieg der Phosphorylierung um 70 % gegenüber einer Zellstimulation mit einer Insulin-Konzentration von 10⁻⁹ M.

Die Phosphorylierung der PKB an Serin 473 wird konzentrationsabhängig durch Insulin gesteigert.

3.1.2 Hep-G2-Zelllinie

Wie in dem zuvor durchgeführten Versuch mit Zellen des Typs H4-II-E wurden die Hep-G2-Zellen zunächst zwölf Stunden in serumfreiem Medium inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine 15-minütige Stimulation der Zellen mit Insulin in der Konzentration 10^{-8} M. Als Kontrolle diente eine Inkubation mit serumfreiem Medium. Die Bestimmung des Phosphorylierungszustandes der PKB an Serin 473 erfolgte wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben (s. Abb. 6). Der basale Phosphorylierungszustand der Kontrolle wurde in der Auswertung mit 100 % angegeben.

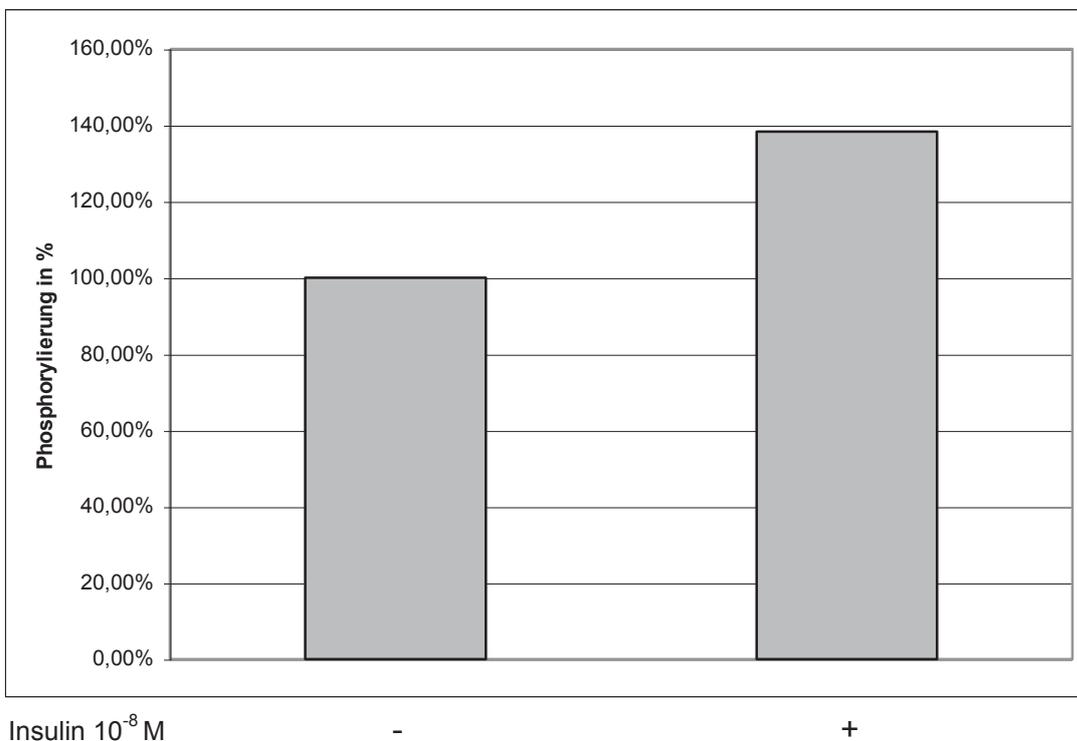


Abb. 6 Einfluss von Insulin (10^{-8} M) auf die Phosphorylierung der PKB an Serin 473 in Hep-G2-Zellen
Die angegebenen Mittelwerte stammen jeweils aus zwei Proben einer Versuchsreihe.

Eine Stimulation mit Insulin führte an Hep G2-Zellen zu einem Anstieg des Phosphorylierungszustandes der PKB an Serin 473 um 38 %. Aufgrund der geringen Probenzahl konnte kein Signifikanzniveau errechnet werden.

Die weiteren Versuche wurden aufgrund der hohen Differenzierung und der Hepatozyten-typischen Eigenschaften wie zum Beispiel der Expression eines

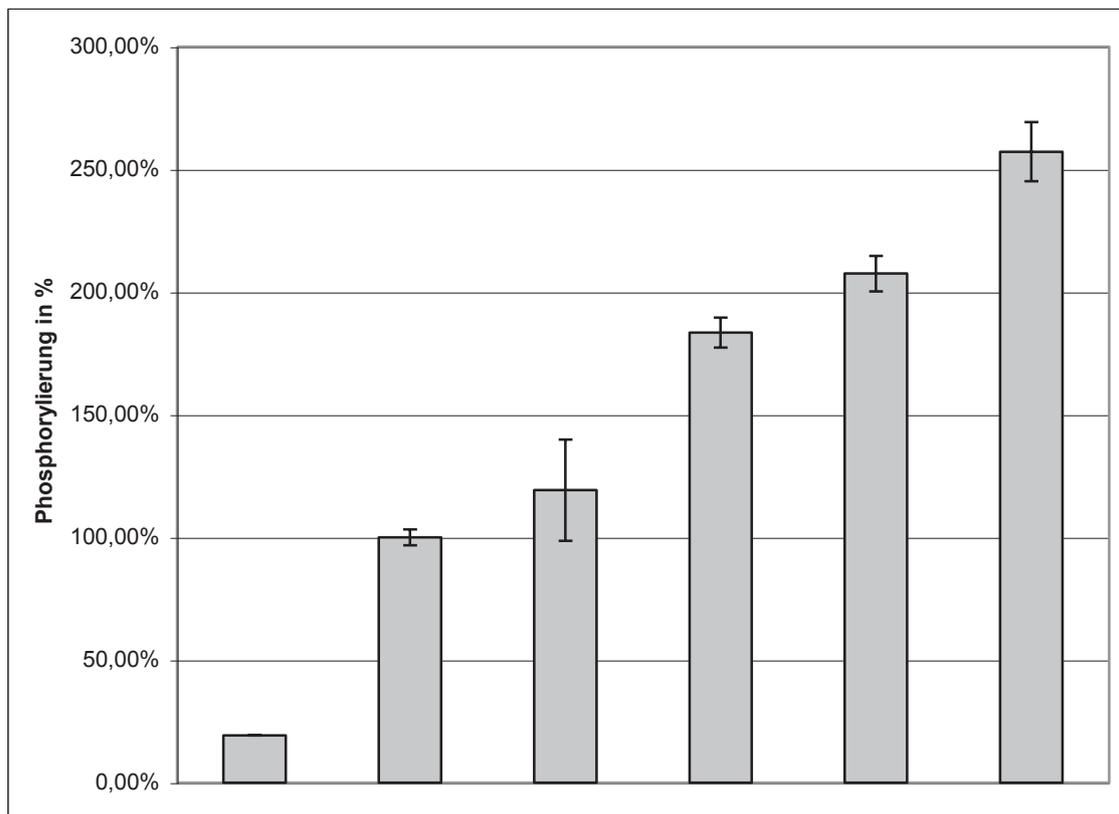
Insulinrezeptors und glucogener Enzyme wie der G6Pase mit H4-II-E Zellen durchgeführt.

3.2 Regulation der PKB-Aktivität durch AICAR

In weiteren Versuchen wurde nun der Einfluss von AICAR auf den Phosphorylierungszustand der PKB untersucht. Wie in den vorangegangenen Versuchen erfolgte die Auswertung mittels eines ELISA für die Gesamt-PKB-Menge und die Menge an phosphoryliertem (Serin 473) PKB in den Zelllysaten.

H4-II-E-Zellen wurden wiederum zwölf Stunden in serumfreiem Medium inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine 30-minütige Behandlung der Zellen mit AICAR in unterschiedlichen Konzentrationen (125 μ M, 250 μ M, 500 μ M und 1 mM). Anschließend wurden die Zellen für 15 min. mit Insulin in der Konzentration 10^{-8} M inkubiert. Als Kontrollen dienten unbehandelte Zellen sowie Zellen die ausschließlich mit Insulin inkubiert wurden (s. Abb. 8). Die Gesamt-PKB-Menge und die Menge an phosphoryliertem PKB an Serin 473 wurden mit einem ELISA aus dem Zelllysat bestimmt.

Der Phosphorylierungsgrad der mit Insulin in der Konzentration 10^{-8} M stimulierten Zellen wurde mit 100 % angegeben (s. Abb. 8).



AICAR	-	-	125 μ M	250 μ M	500 μ M	1 mM
Insulin 10^{-8} M	-	+	+	+	+	+

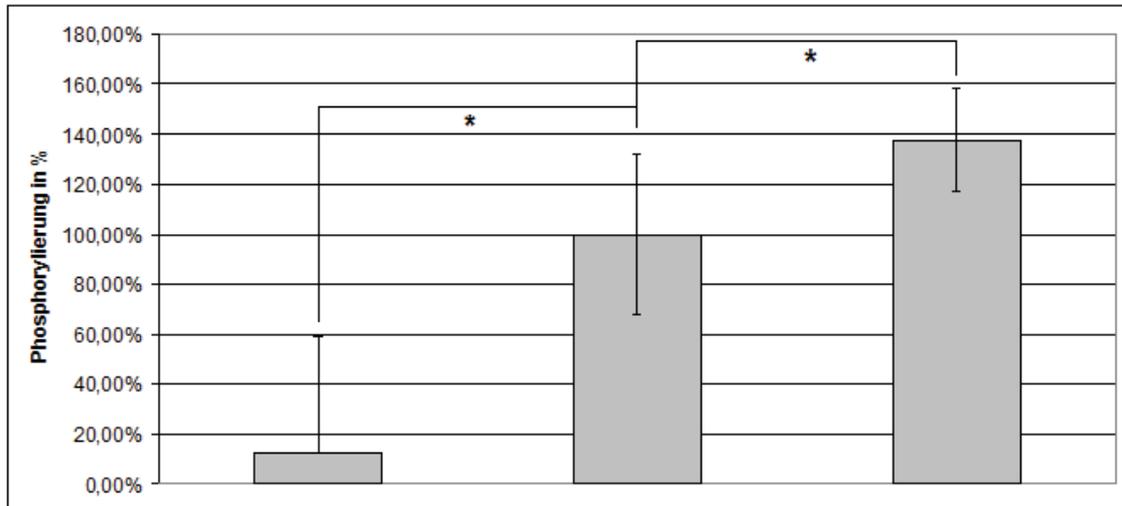
Abb. 7 Einfluss von Insulin (10^{-8} M) und AICAR (125 μ M, 250 μ M, 500 μ M und 1 mM) auf die Phosphorylierung der PKB an Serin 473 in H4-II-E-Zellen.

Die angegebenen Mittelwerte und die Standardabweichung stammen aus einem Experiment mit drei parallelen Ansätzen je Versuchsbedingung.

Nach Stimulation der Zellen mit Insulin kam es zu einem Anstieg des Phosphorylierungszustandes an Serin 473 der PKB. Eine Vorbehandlung mit AICAR konnte den Effekt von Insulin auf den Phosphorylierungszustand konzentrationsabhängig verstärken.

Im Vergleich zu den nur mit Insulin stimulierten Proben kam es zu einem Anstieg des Phosphorylierungszustandes um 19,25 % (125 μ M AICAR) 83,42 % (250 μ M AICAR), 107,49 % (500 μ M AICAR) und 157,22 % (1 mM AICAR).

Der obige Versuch wurde zur statistischen Absicherung mit einer festgelegten AICAR-Konzentration von 1 mM wiederholt, da diese in den vorangegangenen Versuchen zu einer maximalen Steigerung des Insulineffektes geführt hatte (s. Abb. 8). Der Phosphorylierungsgrad der mit Insulin in der Konzentration 10^{-8} M stimulierten Zellen wurde mit 100 % angegeben.



AICAR	-	-	1 mM
Insulin 10^{-8}	-	+	+

Abb. 8 Einfluss von Insulin (10^{-8} M) und AICAR (1 mM) auf die Phosphorylierung der PKB an Serin 473 in H4-II-E-Zellen

Die angegebenen Mittelwerte und die Standardabweichung stammen aus sechs Versuchsreihen mit mindestens drei Parallelansätzen je Versuchsbedingung. * Statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle und zur AICAR negativen Probe ($p < 0,05$).

Geht der Insulinstimulation der H4-II-E-Zellen eine Behandlung mit AICAR in einer Konzentration von 1 mM voraus, kommt es zu einem signifikanten Anstieg des Phosphorylierungszustandes an Serin 473 der PKB. Der Anstieg betrug 37 % gegenüber der nur mit Insulin behandelten Kontrolle. Die Ergebnisse des vorangegangenen Vorversuches (s. Abb. 8) konnten somit mit einer größeren Probenanzahl bestätigt werden. Der zuvor gemessene Anstieg des Phosphorylierungszustandes an Serin 473 nach Behandlung der Zellen mit AICAR ist signifikant im Vergleich zu den nicht mit AICAR vorbehandelten Proben.

3.3 Insulin- und AICAR- abhängige Regulation der PKB (Darstellung im Western-Blot)

Der Effekt einer 30minütigen Vorstimulation mit AICAR in Insulin-behandelten H4-II-E-Zellen auf den Phosphorylierungszustand der PKB wurde ebenfalls im Western-Blot-Verfahren untersucht. Dabei wurde bei einer konstanten Insulinkonzentration von 10^{-8} M die AICAR-Konzentration zwischen 250 μ M, 500 μ M, 1 mM und 2 mM variiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen lysiert. Mit den BCA-normierten Zelllysaten wurde ein Western-Blot mit einem Antikörper für PKB Serin 473 durchgeführt. Anschließend erfolgte ein Re-Blot mit einem Antikörper für das Gesamt-PKB (s. Abb. 10).

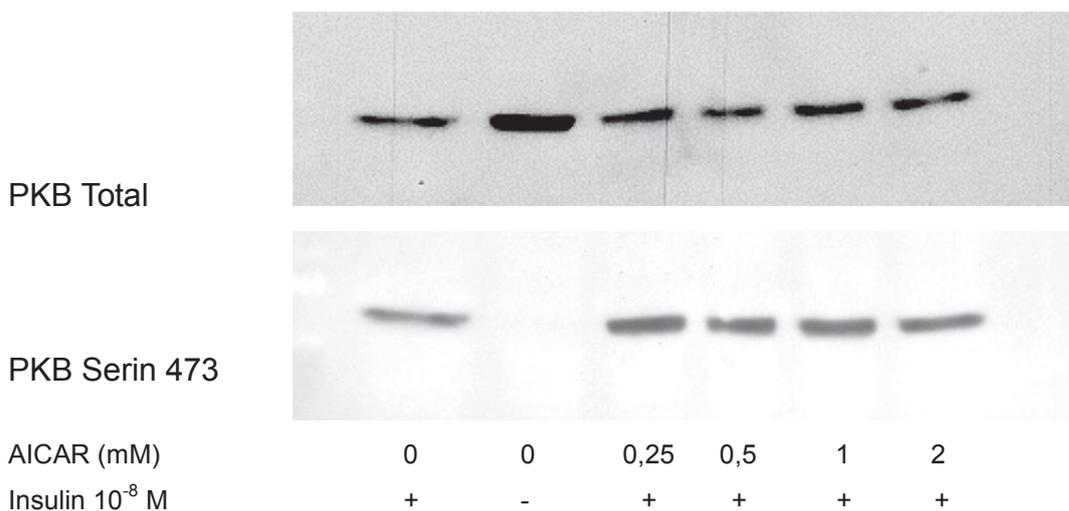


Abb. 9 Einfluss von Insulin (10^{-8} M) und AICAR (250 μ M, 500 μ M, 1 mM, 2 mM) auf die Phosphorylierung der PKB an Serin 473 in H4-II-E-Zellen (Western-Blot)

In einem weiteren Versuch wurden H4-II-E-Zellen nach oben beschriebenem Protokoll zunächst mit 1 mM AICAR für 30 min. behandelt. Im Anschluss erfolgte eine Stimulation der Zellen mit Insulin in den Konzentrationen 10^{-9} M und 10^{-8} M (s. Abb. 11).

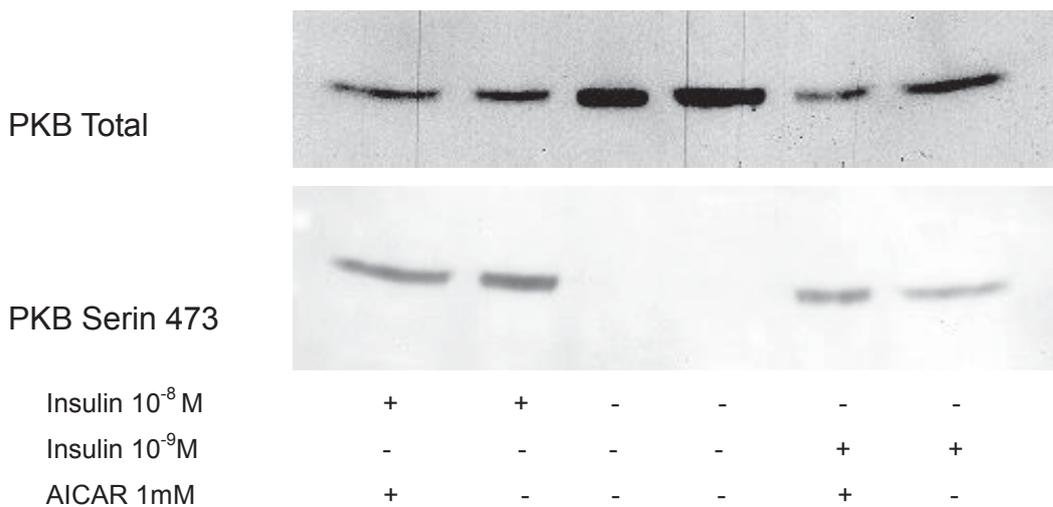


Abb. 10 Einfluss von Insulin (10⁻⁹ M, 10⁻⁸ M) und AICAR (1 mM) auf die Phosphorylierung der PKB an Serin 473 in H4-II-E-Zellen (Western-Blot)

Die in Abbildung 10 und 11 dargestellten Western-Blot bestätigen die zuvor erhobenen ELISA-Daten. Mit Insulin stimulierte Proben zeigen eine Phosphorylierung an Serin 473. Der Grad der Phosphorylierung ist Abhängig von der eingesetzten Insulinkonzentration (s. Abb. 11).

Geht der Insulinstimulation eine Behandlung der Zellen mit AICAR voraus, steigt der Grad der Phosphorylierung an Serin 473 an (s. Abb. 10 und 11).

Zusammenfassend zeigen die hier erhobenen Daten, dass es nach Stimulation der Zellen mit Insulin zu einem signifikanten Anstieg der Phosphorylierung der PKB an Serin 473 kommt. Es konnte eine Konzentrations-Wirkungsbeziehung zwischen eingesetzter Insulin-Konzentration und dem Phosphorylierungszustand dargestellt werden.

Erfolgte vor Insulinstimulation eine Inkubation der Zellen mit AICAR, konnte der Phosphorylierungszustand der PKB an Serin 473 im Vergleich zu den nur mit Insulin stimulierten Zellen gesteigert werden.

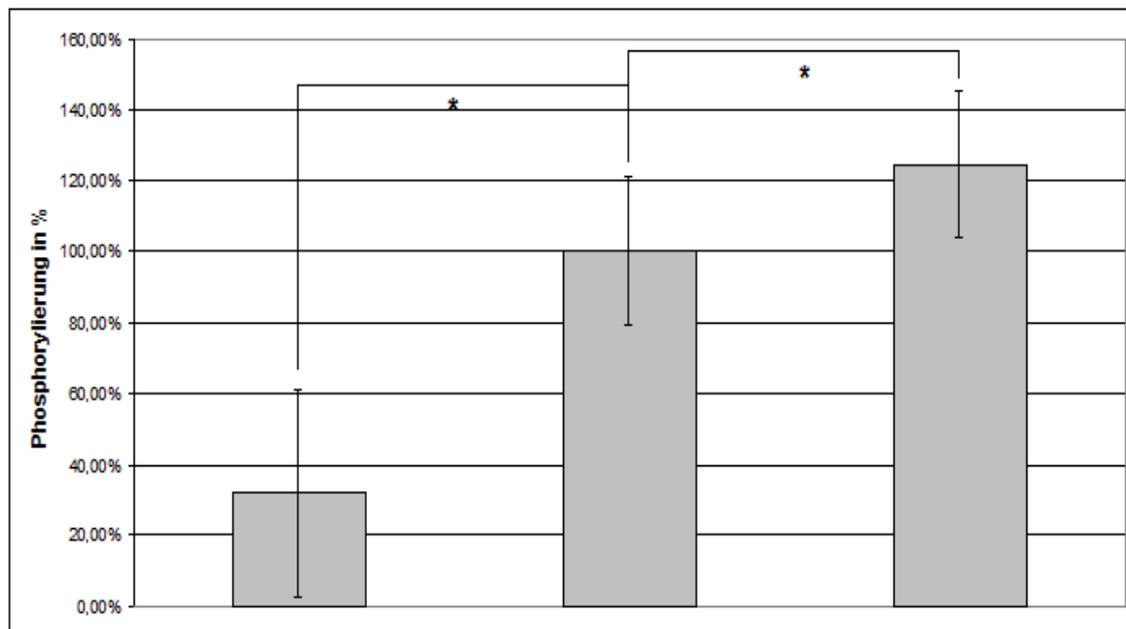
Der maximale Effekt konnte bei einer AICAR-Konzentration von 1 mM detektiert werden, wobei einschränkend bemerkt werden muss, dass höhere Konzentrationen mit dem ELISA Verfahren nicht getestet wurden.

3.4 Regulation der Glykogensynthase-Kinase-3 (GSK-3)

Da nachgewiesen werden konnte, dass der Insulin-abhängige Phosphorylierungszustand der PKB durch eine Vorbehandlung der Zellen mit AICAR signifikant gesteigert wird, stellte sich die Frage, ob auch die Aktivität der PKB (gemessen am Phosphorylierungszustand der PKB-Substrate) durch AICAR beeinflusst wird.

Die Fragestellung wurde exemplarisch an der GSK-3, einem direkten Substrat der PKB, untersucht.

Wie in den zuvor durchgeführten Versuchen wurden die H4-II-E-Zellen zunächst zwölf Stunden in serumfreiem Medium inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine 30-minütige Behandlung mit AICAR (1 mM) und anschließend eine 15-minütige Stimulation mit Insulin (10^{-8} M). Der Phosphorylierungszustand der GSK-3 an Serin 9 wurde mittels eines ELISA ausgewertet. Dazu wurden die Zellen mit einem Antikörper für phosphoryliertes GSK-3 Serin 9 bzw. für Gesamt-GSK-3 inkubiert. Der Phosphorylierungszustand der nur mit Insulin stimulierten Proben wurde mit 100 % angegeben (s. Abb. 12).



AICAR 1 mM

-

-

+

Insulin 10⁻⁸ M

-

+

+

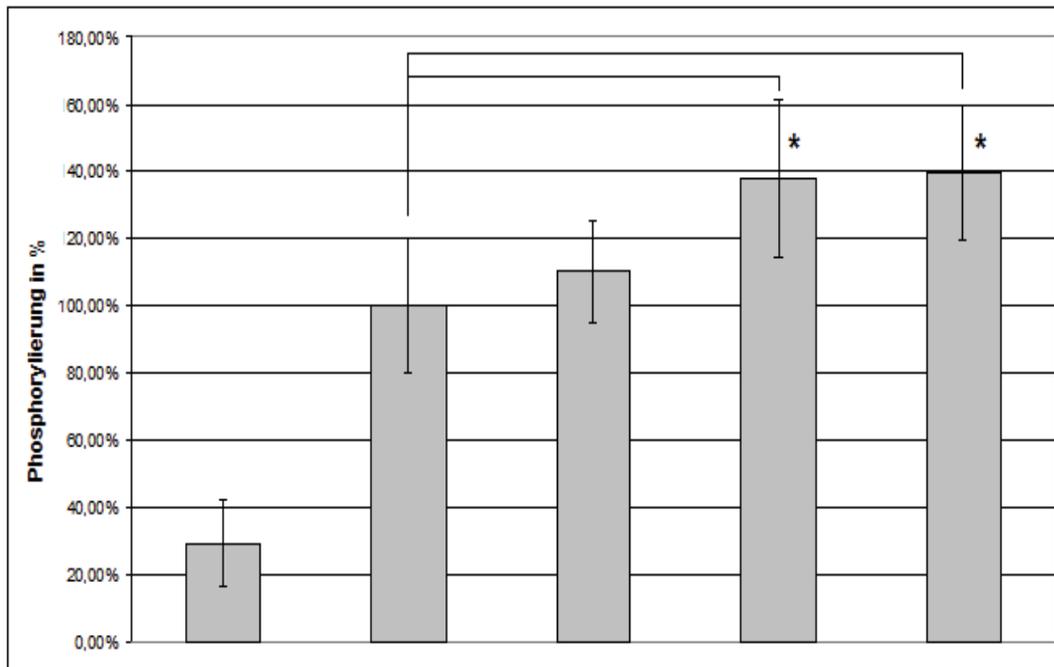
Abb. 11 Einfluss von Insulin und (10⁻⁸ M) AICAR (1 mM) auf die Phosphorylierung von GSK-3 an Serin 9 in H4-II-E-Zellen

Der angegebene Mittelwert und die Standardabweichung beziehen sich auf drei Versuchsreihen mit jeweils drei Parallelproben pro Versuchsbedingung. * Statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle und zur AICAR-negativen Probe ($p < 0,05$).

Nach Insulinstimulation kam es zu einem signifikanten Anstieg des Phosphorylierungsgrades an Serin 9 der GSK-3.

Erfolgte vor Insulinstimulation eine Behandlung der Zellen mit AICAR, konnte der Phosphorylierungsgrad zusätzlich gesteigert werden. Der durch eine Inkubation der Zellen mit AICAR erzielte additive Effekt betrug 24 %.

In einem weiteren Versuch sollte eine Konzentrations-Wirkungsbeziehung zwischen eingesetzter AICAR-Konzentration (125 μ M, 250 μ M und 500 μ M) und Phosphorylierungszustand der GSK-3 an Serin 9 nach Insulinstimulation (10⁻⁸ M) untersucht werden (s. Abb. 13). Der Phosphorylierungszustand der nur mit Insulin stimulierten Proben wurde mit 100 % angegeben.



AICAR	-	-	125 μ M	250 μ M	500 μ M
Insulin 10^{-8} M	-	+	+	+	+

Abb. 12 Einfluss von AICAR (125 μ M, 250 μ M und 500 μ M) und Insulin (10^{-8} M) auf die Phosphorylierung von GSK-3 an Serin 9 in H4-II-E-Zellen

Der angegebene Mittelwert und die Standardabweichung beziehen sich auf zwei Versuchsreihen mit jeweils drei Parallelansätzen je Versuchsbedingung. * Statistisch signifikanter Unterschied zur AICAR-negativen Kontrolle ($p < 0,05$).

Wie im vorangegangenen Versuch konnte ein signifikanter Anstieg des Phosphorylierungsgrades gemessen werden, wenn die Proben vor Stimulation mit Insulin mit AICAR behandelt wurden.

Dabei ließ sich eine Abhängigkeit des Phosphorylierungszustandes von der eingesetzten AICAR-Konzentration nachweisen. Ab einer AICAR-Konzentration von 250 μ M war der Unterschied verglichen mit den Proben ohne AICAR statistisch signifikant. Der Phosphorylierungszustand stieg um 10 % (AICAR 125 μ M), 38 % (AICAR 250 μ M), und 40 % (AICAR 500 μ M) gegenüber der AICAR-negativen, nur mit Insulin stimulierten Kontrolle.

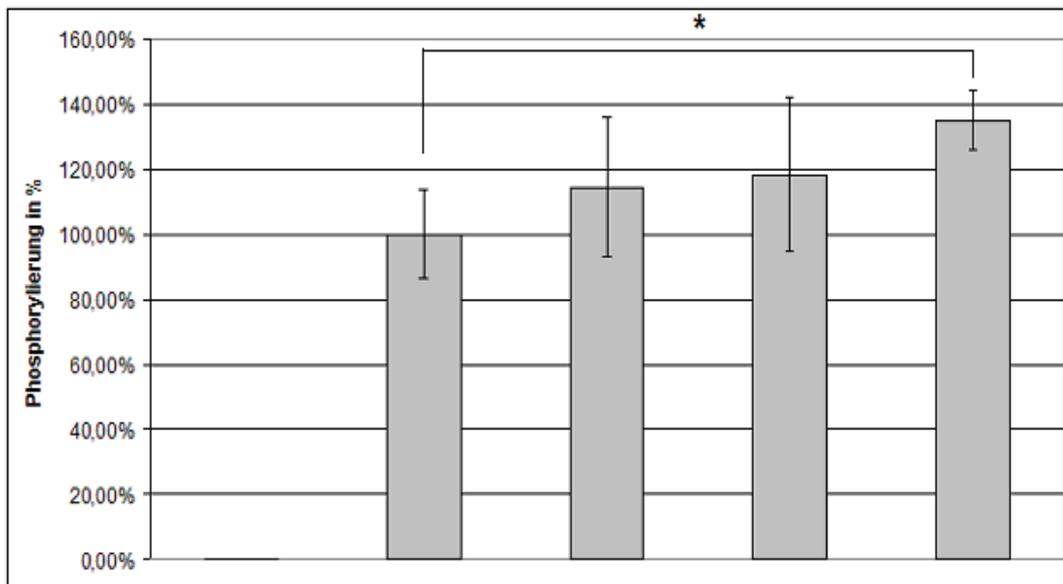
AICAR beeinflusst im Verlauf der Insulin-Signalkaskade auch die Signalkette unterhalb der PKB. Die durch Insulin hervorgerufenen Effekte werden signifikant und konzentrationsabhängig durch AICAR verstärkt.

3.5 Regulation des Insulinrezeptors

Nachdem in den vorangegangenen Versuchen die Modulation des Insulinsignals durch AICAR an und unterhalb der PKB analysiert wurde, wurde anschließend der Einfluss auf die Insulinsignalkaskade oberhalb der PKB untersucht.

Zur Untersuchung der Fragestellung wurden H4-II-E-Zellen zwölf Stunden in serumfreiem Medium inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen 30 min. mit AICAR in den Konzentrationen 250 μ M, 500 μ M und 1 mM behandelt. Anschließend wurden die Zellen für 15 min. mit Insulin (10^{-8} M) stimuliert. Als Kontrollen dienten unbehandelte bzw. ausschließlich mit Insulin behandelte Zellen. Anschließend wurde ein ELISA mit dem Zelllysate durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit einem Antikörper, der spezifisch an Tyrosin phosphorylierte Insulinrezeptoren (IR pY 1162/1163) detektiert, und mit einem Antikörper, der den Insulinrezeptor unabhängig vom Phosphorylierungszustand erkennt.

Der Phosphorylierungszustand der nur mit Insulin stimulierten Proben wurde mit 100 % angenommen (s. Abb. 14).



AICAR	-	-	250 µM	500 µM	1 mM
Insulin 10^{-8} M	-	+	+	+	+

Abb. 13 Einfluss von AICAR (250 µM, 500 µM, 1 mM) und Insulin (10^{-8}) auf die Phosphorylierung des Insulinrezeptors an Tyrosin 1162/1163 in H4-II-E-Zellen

Der angegebene Mittelwert und die Standardabweichung beziehen sich auf drei Versuchsreihen mit jeweils drei Parallelansätzen je Versuchsbedingung. * Statistisch signifikanter Unterschied zur AICAR-negativen Probe ($p < 0,05$).

Durch Stimulation der Zellen mit Insulin kommt es zu einem signifikanten Anstieg des Phosphorylierungszustandes des Insulinrezeptors an Tyrosin 1162/1163 im Vergleich zu der nicht mit Insulin stimulierten Kontrolle.

Erfolgte vor der Insulinstimulation eine Behandlung der Zellen mit AICAR, konnte die Zunahme des Phosphorylierungszustandes weiter gesteigert werden.

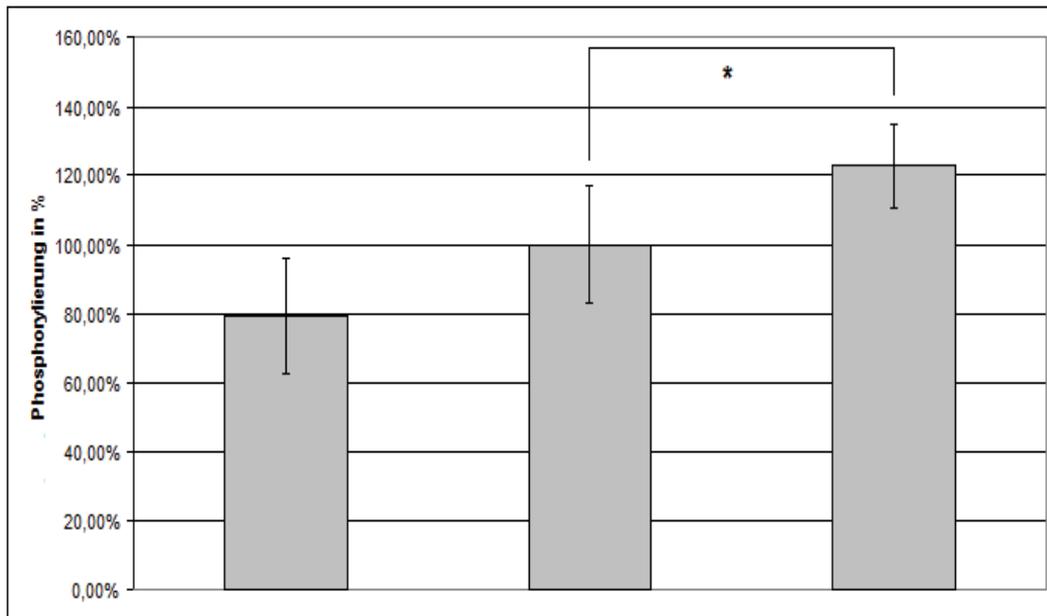
Statistisch signifikant wurde diese Beobachtung ab einer AICAR-Konzentration von 1 mM. Bei dieser eingesetzten AICAR-Konzentration stieg der Phosphorylierungszustand um 34 % gegenüber der nicht mit AICAR behandelten Kontrolle.

Die Phosphorylierung des Insulinrezeptors an Tyrosin 1162/1163 wird durch eine Behandlung der Zellen mit AICAR vor der Insulinstimulation signifikant gesteigert.

3.6 Regulation des Insulin-Rezeptor-Substrates-1 (IRS-1)

Die Modulation des Insulinrezeptors durch AICAR konnte im vorangegangenen Versuch nachgewiesen werden. Im Weiteren wurde untersucht, ob das IRS-1, ein Bindeglied zwischen dem Insulinrezeptor und der PI3-Kinase, ebenfalls durch AICAR moduliert wird. Beispielhaft wurde die Phosphorylierung des IRS-1 an Serin 312 gemessen.

H4-II-E-Zellen wurden zwölf Stunden in serumfreiem Medium inkubiert und anschließend für 15 min. mit Insulin (10^{-8} M) inkubiert. Ein Teil der Proben wurde unmittelbar vor der Insulinstimulation 30 min. mit AICAR (1 mM) behandelt. Als Kontrollen wurden AICAR- und AICAR-Insulin-unbehandelte Proben mitgeführt. Zur Quantifizierung des Phosphorylierungszustandes des IRS-1 wurden die Proben mittels ELISA-Technik mit einem Antikörper für IRS-1 bzw. für die an Serin 312 phosphorylierte Form des IRS-1 ausgewertet. Der Phosphorylierungszustand der mit Insulin in der Konzentration 10^{-8} M stimulierten Zellen wurde mit 100 % angegeben (s. Abb. 15).



AICAR 1 mM	-	-	+
Insulin 10 ⁻⁸ M	-	+	+

Abb. 14 Einfluss von Insulin (10⁻⁸ M) und AICAR (1 mM) auf die Phosphorylierung des IRS-1 an Serin 312 in H4-II-E-Zellen.

Der angegebene Mittelwert und die Standardabweichung beziehen sich auf drei Versuchsreihen mit vier Parallelansätzen je Versuchsbedingung. * Statistisch signifikanter Unterschied zur AICAR-negativen Probe ($p < 0,05$).

Nach Stimulation der Zellen mit Insulin kommt es zu einer Phosphorylierung des Insulinrezeptor-Substrates-1 an Serin 312.

Die Inkubation der Zellen mit AICAR vor der Insulinstimulation führte zu einem signifikant gesteigerten Phosphorylierungszustand des Insulinrezeptor-Substrates-1 an Serin 312 im Vergleich zu den nur mit Insulin stimulierten Proben. Der Anstieg betrug bei einer AICAR-Konzentration von 1 mM 23 %.

AICAR moduliert die Phosphorylierung der Insulinsignalkaskade auch unterhalb des Insulinrezeptors. Dies konnte beispielhaft anhand der Phosphorylierung des IRS-1 an Serin 312 dargestellt werden.

3.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Zellmodell kommt es nach Insulinstimulation zu einer Zunahme des Phosphorylierungszustandes der untersuchten Komponenten der Insulinsignalkaskade. Dieser Effekt wurde im Verlauf der Insulinsignalkaskade an folgenden ausgewählten Beispielproteinen gemessen:

- Insulinrezeptor (IR) an Tyrosin pY 1162/1163
- IRS-1 an Serin 312
- PKB/AKT an Serin 473
- GSK-3 an Serin 9.

Bei einer Vorbehandlung der Zellen mit AICAR vor der Insulinstimulation konnte eine signifikante Zunahme des Phosphorylierungszustandes im Vergleich zu den AICAR-negativen Proben gemessen werden.

Dieser Effekt war konzentrationsabhängig, wobei der Phosphorylierungszustand positiv mit der eingesetzten AICAR-Dosis korrelierte.

Die maximale Zunahme des Phosphorylierungszustandes durch die AICAR-Vorbehandlung lag bei allen untersuchten Proteinen der Insulinsignalkaskade zwischen 20 % und 40% im Vergleich zu den nur mit Insulin stimulierten Proben.

Die oben beschriebenen Experimente wurden mit H4-II-E-Zellen durchgeführt. Die oben beschriebenen Effekte ließen sich exemplarisch an der PKB auch mit Hep-G2-Zellen nachweisen.

Weiter konnten die ELISA-Ergebnisse ebenfalls beispielhaft an der PKB mit dem Western-Blot-Verfahren bestätigt werden.

4 Diskussion

4.1 Effekt von AICAR auf die Insulinsignalkaskade

Die Versuche dieser Arbeit belegen eindrucksvoll, dass AICAR den gesamten Verlauf der Insulinsignalkaskade moduliert.

In der Literatur wird AICAR als direkter Aktivator der AMPK beschrieben, der analog zu Stoffwechszuständen wie Nährstoffmangel, Hormonmangel oder Hypoxie (z. B. im Rahmen muskulärer Arbeit) eine Phosphorylierung der AMPK an Threonin 172 hervorruft [52]. Es ist daher davon auszugehen, dass die hier gemessenen Effekte von AICAR auf die Insulinsignalkaskade durch eine Phosphorylierung und damit Aktivierung der AMPK hervorgerufen werden.

Eine positive Korrelation des Phosphorylierungszustandes der Insulinsignalkaskade mit der eingesetzten Konzentration von Insulin wurde bereits in der Literatur beschrieben und konnte in den hier durchgeführten Messungen bestätigt werden [17, 24, 53].

Die durch Stimulation der H4-Rattenhepatomazellen mit Insulin hervorgerufene Phosphorylierung des Insulinrezeptors an Tyrosin 1162/1163 konnte signifikant gesteigert werden, wenn der Insulinstimulation eine Inkubation der Zellen mit AICAR vorausging. Der Effekt war konzentrationsabhängig und steigerte den Phosphorylierungszustand um maximal ca. 35 % im Vergleich zu einer alleinigen Stimulation mit Insulin.

Eine AICAR-abhängige Steigerung des Phosphorylierungszustandes des Insulinrezeptors konnte von Chopra et al. in Muskelzellen nachgewiesen werden [54].

Die positive Korrelation zwischen eingesetzter AICAR-Konzentration und Phosphorylierungszustand konnte in weiteren Versuchsabläufen in nahezu gleichem Umfang an weiteren Schlüsselstellen im Verlauf der Insulinsignalkaskade nachgewiesen werden.

Im weiteren Verlauf der Signalkaskade wurde der Einfluss von AICAR auf das IRS-1 untersucht. IRS-1 ist das Bindeglied zwischen dem Insulinrezeptor und dem PI3-Kinase-Signalweg, der in seinem Verlauf unter anderem zur Phosphorylierung der PKB führt [55]. IRS-1 wird durch den Insulinrezeptor unter anderem an Serin 312 phosphoryliert. Dieser Zusammenhang konnte in der vorliegenden Arbeit nach Stimulation der Zellen mit Insulin bestätigt werden. Korrespondierend zu den zuvor erhobenen Ergebnissen, konnte die Phosphorylierung des IRS-1 an Serin 312 durch eine Vorinkubation mit AICAR weiter gesteigert werden.

Greene et al. konnten zeigen, dass eine Phosphorylierung von IRS-1 an Serin 312 eine Ablösung des IRS-1 vom Insulinrezeptor bewirkt und damit das Insulinsignal gehemmt wird [56].

In der Literatur werden zudem AICAR-abhängige Phosphorylierungen von Serin 789 [57, 58] und Serin 636/639 [55] beschrieben, die die Insulin-abhängige Phosphorylierung der PI3-Kinase modulieren. Im Falle von Serin 636/639 wird die PI-3-Kinase gehemmt, im Falle von Serin 789 gibt es keine einheitliche Datenlage. Es existieren sowohl Berichte über fördernde [57] als auch über hemmende [58] Einflüsse dieser Phosphorylierung auf die Aktivität der PI3-Kinase.

Als zentrales Molekül der Insulinsignalkaskade gilt die PKB, die neben Stoffwechselprozessen auch das Wachstum, die Proliferation und den Zyklus der Zelle steuert [24]. Die Aktivierung der PKB erfolgt durch Phosphorylierung an Threonin 308 und Serin 473 [59].

Beispielhaft für die Aktivierung der PKB wurde in der vorliegenden Arbeit die Phosphorylierung an Serin 473 untersucht. Dabei zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Insulin-induzierten Phosphorylierung durch eine Vorinkubation der Zellen mit AICAR. Auch dieser Effekt des AICAR war konzentrationsabhängig. Diese Daten decken sich mit Angaben in der Literatur [54].

Zur Komplettierung der Ergebnisse wurde die GSK-3, als direktes Substrat der PKB untersucht. Sie wird an Serin 9 und 21 phosphoryliert. In der vorliegenden Arbeit führte eine Vorstimulation mit AICAR zu einer signifikanten Steigerung der beispielhaft ausgewählten Phosphorylierungsstelle Serin 9 im Vergleich zu

einer alleinigen Stimulation mit Insulin.

Diese Wirkung von AICAR auf die Signalkaskade unterhalb der PKB deckt sich mit den Ergebnissen von Longnus et al., die den gleichen Effekt an Herzmuskelzellen von Ratten nachweisen konnten [55].

Zusammenfassend zeigen die hier dargestellten Daten, dass AICAR den gesamten Verlauf der Insulinsignalkaskade moduliert und die durch Insulin hervorgerufenen Effekte verstärkt. Wie bereits beschrieben, ist davon auszugehen, dass dieser Effekt durch eine AICAR-induzierte direkte Aktivierung der AMPK hervorgerufen wird.

Damit stellt die AMPK in der Therapie des Diabetes mellitus einen interessanten Angriffspunkt dar. Durch eine gezielte Aktivierung der AMPK können die durch Insulin hervorgerufenen Effekte auf den Zellstoffwechsel verstärkt werden, um einer Insulinresistenz entgegenzuwirken.

Einschränkend sollte erwähnt werden, dass die in der vorliegenden Arbeit im Zellmodell verwendeten Konzentrationen von AICAR und Insulin nicht auf den menschlichen Organismus übertragen werden können.

Interessanterweise beruht der Effekt von Metformin ebenfalls auf einer Aktivierung der AMPK. Die Aktivierung erfolgt jedoch vermutlich indirekt und ist bis heute nicht abschließend geklärt. In der Literatur wird eine Hemmung des mitochondrialen Komplex-1 der Atmungskette beschrieben, die über einen Anstieg des AMP/ATP-Quotienten zur Aktivierung der AMPK führt [7]. Diese These wird durch Befunde gestützt, dass der AMP-Gehalt im Zytosol nach Zellstimulation mit Metformin zunimmt und der ATP-Gehalt abnimmt. Allerdings gibt es auch widersprüchliche Berichte von Autoren, die keine Veränderung des AMP/ATP-Quotienten nach Metformin-Stimulation messen konnten [32].

Sowohl Metformin als auch Insulin und AICAR führen letztlich zu einer verminderten Expression der G6Pase und damit zu einem sinkenden Blutglukosespiegel [60].

Ungeklärt bleibt, warum AICAR anders als Metformin die Insulinsignalkaskade auch oberhalb der PKB beeinflusst, obwohl beide Stoffe eine Phosphorylierung der AMPK an Threonin 172 bewirken [60].

4.2 Grenzen und Einordnung

Wie bereits oben erwähnt, wurden in der hier vorgelegten Arbeit für Insulin und AICAR Konzentrationen verwendet, die zwar in der Literatur für in-vitro Versuche in Zellmodellen üblich sind, jedoch nicht auf den menschlichen Organismus übertragen werden können.

H4-II-E-Zellen sind für die Untersuchung der Fragestellung der vorliegenden Arbeit gut geeignet, da sie über eine intakte Regulation glukoneogener Gene verfügen und daher eine ausreichende Insulinempfindlichkeit aufweisen. Jedoch ist eine direkte Übertragung der mit dem Zellmodell gewonnenen Ergebnisse auf den menschlichen Organismus aufgrund fehlender endokriner und parakriner Einflüsse nur eingeschränkt möglich.

5 Literaturverzeichnis

1. *Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation.* World Health Organ Tech Rep Ser, 2000. **894**: p. i-xii, 1-253.
2. Huang, E.S., et al., *Projecting the future diabetes population size and related costs for the U.S.* Diabetes Care, 2009. **32**(12): p. 2225-9.
3. *Economic costs of diabetes in the U.S. In 2007.* Diabetes Care, 2008. **31**(3): p. 596-615.
4. Tuomilehto, J., et al., *Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance.* N Engl J Med, 2001. **344**(18): p. 1343-50.
5. Knowler, W.C., et al., *Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin.* N Engl J Med, 2002. **346**(6): p. 393-403.
6. Owen, M.R., E. Doran, and A.P. Halestrap, *Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex I of the mitochondrial respiratory chain.* Biochem J, 2000. **348 Pt 3**: p. 607-14.
7. Turner, N., et al., *Berberine and its more biologically available derivative, dihydroberberine, inhibit mitochondrial respiratory complex I: a mechanism for the action of berberine to activate AMP-activated protein kinase and improve insulin action.* Diabetes, 2008. **57**(5): p. 1414-8.
8. Hubbard, S.R., et al., *Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor.* Nature, 1994. **372**(6508): p. 746-54.
9. Hubbard, S.R., *Crystal structure of the activated insulin receptor tyrosine kinase in complex with peptide substrate and ATP analog.* EMBO J, 1997. **16**(18): p. 5572-81.
10. Shimizu, Y. and T. Shimazu, *Effects of wortmannin on increased glucose transport by insulin and norepinephrine in primary culture of brown adipocytes.* Biochem Biophys Res Commun, 1994. **202**(2): p. 660-5.
11. Okada, T., et al., *Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin-induced glucose transport and antilipolysis in rat adipocytes. Studies with a selective inhibitor wortmannin.* J Biol Chem, 1994. **269**(5): p. 3568-73.
12. Sakae, H., et al., *Ras-independent and wortmannin-sensitive activation of glycogen synthase by insulin in Chinese hamster ovary cells.* J Biol Chem, 1995. **270**(19): p. 11304-9.
13. Shepherd, P.R., B.T. Nave, and K. Siddle, *Insulin stimulation of glycogen synthesis and glycogen synthase activity is blocked by wortmannin and rapamycin in 3T3-L1 adipocytes: evidence for the involvement of phosphoinositide 3-kinase and p70 ribosomal protein-S6 kinase.* Biochem J, 1995. **305 (Pt 1)**: p. 25-8.
14. Lin, T.A. and J.C. Lawrence, Jr., *Control of PHAS-I phosphorylation in 3T3-L1 adipocytes: effects of inhibiting protein phosphatases and the p70S6K signalling pathway.* Diabetologia, 1997. **40 Suppl 2**: p. S18-24.
15. Sutherland, C., R.M. O'Brien, and D.K. Granner, *Phosphatidylinositol 3-kinase, but not p70/p85 ribosomal S6 protein kinase, is required for the regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) gene expression by insulin. Dissociation of signaling pathways for insulin and phorbol ester regulation of PEPCK gene expression.* J Biol Chem, 1995. **270**(26): p. 15501-6.
16. Withers, D.J. and M. White, *Perspective: The insulin signaling system--a common link in the pathogenesis of type 2 diabetes.* Endocrinology, 2000.

- 141(6): p. 1917-21.
17. Gual, P., Y. Le Marchand-Brustel, and J.F. Tanti, *Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation*. *Biochimie*, 2005. **87**(1): p. 99-109.
 18. Vanhaesebroeck, B. and D.R. Alessi, *The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB*. *Biochem J*, 2000. **346 Pt 3**: p. 561-76.
 19. Lynch, D.K., et al., *Integrin-linked kinase regulates phosphorylation of serine 473 of protein kinase B by an indirect mechanism*. *Oncogene*, 1999. **18**(56): p. 8024-32.
 20. Persad, S., et al., *Regulation of protein kinase B/Akt-serine 473 phosphorylation by integrin-linked kinase: critical roles for kinase activity and amino acids arginine 211 and serine 343*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(29): p. 27462-9.
 21. Song, G., G. Ouyang, and S. Bao, *The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival*. *J Cell Mol Med*, 2005. **9**(1): p. 59-71.
 22. Belham, C., S. Wu, and J. Avruch, *Intracellular signalling: PDK1--a kinase at the hub of things*. *Curr Biol*, 1999. **9**(3): p. R93-6.
 23. Filippa, N., et al., *Mechanism of protein kinase B activation by cyclic AMP-dependent protein kinase*. *Mol Cell Biol*, 1999. **19**(7): p. 4989-5000.
 24. Alessi, D.R. and P. Cohen, *Mechanism of activation and function of protein kinase B*. *Curr Opin Genet Dev*, 1998. **8**(1): p. 55-62.
 25. Cross, D.A., et al., *Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B*. *Nature*, 1995. **378**(6559): p. 785-9.
 26. Summers, S.A., et al., *The role of glycogen synthase kinase 3beta in insulin-stimulated glucose metabolism*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(25): p. 17934-40.
 27. Barthel, A., et al., *Regulation of the forkhead transcription factor FKHR (FOXO1a) by glucose starvation and AICAR, an activator of AMP-activated protein kinase*. *Endocrinology*, 2002. **143**(8): p. 3183-6.
 28. Cheatham, B., et al., *Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation*. *Mol Cell Biol*, 1994. **14**(7): p. 4902-11.
 29. Towler, M.C. and D.G. Hardie, *AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling*. *Circ Res*, 2007. **100**(3): p. 328-41.
 30. Iseli, T.J., et al., *AMP-activated protein kinase subunit interactions: beta1:gamma1 association requires beta1 Thr-263 and Tyr-267*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(8): p. 4799-807.
 31. Sakamoto, K., et al., *Activity of LKB1 and AMPK-related kinases in skeletal muscle: effects of contraction, phenformin, and AICAR*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2004. **287**(2): p. E310-7.
 32. Hawley, S.A., et al., *Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade*. *J Biol*, 2003. **2**(4): p. 28.
 33. Schimmack, G., R.A. Defronzo, and N. Musi, *AMP-activated protein kinase: Role in metabolism and therapeutic implications*. *Diabetes Obes Metab*, 2006. **8**(6): p. 591-602.
 34. Hawley, S.A., et al., *Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase*. *Cell Metab*, 2005. **2**(1): p. 9-19.
 35. Hurley, R.L., et al., *The Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(32): p. 29060-6.
 36. Marsin, A.S., et al., *Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia*. *Curr Biol*, 2000.

- 10(20): p. 1247-55.
37. Kudo, N., et al., *High rates of fatty acid oxidation during reperfusion of ischemic hearts are associated with a decrease in malonyl-CoA levels due to an increase in 5'-AMP-activated protein kinase inhibition of acetyl-CoA carboxylase.* J Biol Chem, 1995. **270**(29): p. 17513-20.
 38. Minokoshi, Y., et al., *Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase.* Nature, 2002. **415**(6869): p. 339-43.
 39. Gadalla, A.E., et al., *AICA riboside both activates AMP-activated protein kinase and competes with adenosine for the nucleoside transporter in the CA1 region of the rat hippocampus.* J Neurochem, 2004. **88**(5): p. 1272-82.
 40. Corton, J.M., et al., *5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells?* Eur J Biochem, 1995. **229**(2): p. 558-65.
 41. Carling, D., M.J. Sanders, and A. Woods, *The regulation of AMP-activated protein kinase by upstream kinases.* Int J Obes (Lond), 2008. **32 Suppl 4**: p. S55-9.
 42. Bergeron, R., et al., *Effect of 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside infusion on in vivo glucose and lipid metabolism in lean and obese Zucker rats.* Diabetes, 2001. **50**(5): p. 1076-82.
 43. Zhou, G., et al., *Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action.* J Clin Invest, 2001. **108**(8): p. 1167-74.
 44. Viollet, B., et al., *Activation of AMP-activated protein kinase in the liver: a new strategy for the management of metabolic hepatic disorders.* J Physiol, 2006. **574**(Pt 1): p. 41-53.
 45. Krause, U., L. Bertrand, and L. Hue, *Control of p70 ribosomal protein S6 kinase and acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase and protein phosphatases in isolated hepatocytes.* Eur J Biochem, 2002. **269**(15): p. 3751-9.
 46. Reiter, A.K., et al., *Repression of protein synthesis and mTOR signaling in rat liver mediated by the AMPK activator aminoimidazole carboxamide ribonucleoside.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005. **288**(5): p. E980-8.
 47. Cheng, S.W., et al., *Thr2446 is a novel mammalian target of rapamycin (mTOR) phosphorylation site regulated by nutrient status.* J Biol Chem, 2004. **279**(16): p. 15719-22.
 48. Kakuma, T., et al., *Leptin, troglitazone, and the expression of sterol regulatory element binding proteins in liver and pancreatic islets.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(15): p. 8536-41.
 49. Shimomura, I., et al., *Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice.* Mol Cell, 2000. **6**(1): p. 77-86.
 50. Foretz, M., et al., *Short-term overexpression of a constitutively active form of AMP-activated protein kinase in the liver leads to mild hypoglycemia and fatty liver.* Diabetes, 2005. **54**(5): p. 1331-9.
 51. Horman, S., et al., *Insulin antagonizes ischemia-induced Thr172 phosphorylation of AMP-activated protein kinase alpha-subunits in heart via hierarchical phosphorylation of Ser485/491.* J Biol Chem, 2006. **281**(9): p. 5335-40.
 52. Zhang, L., et al., *Relationship between 5-aminoimidazole-4-carboxamide-ribose and AMP-activated protein kinase activity in the perfused mouse heart.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **290**(3): p. H1235-43.
 53. Kido, Y., J. Nakae, and D. Accili, *Clinical review 125: The insulin receptor and its cellular targets.* J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(3): p. 972-9.

54. Chopra, I., et al., *Phosphorylation of the insulin receptor by AMP-activated protein kinase (AMPK) promotes ligand-independent activation of the insulin signalling pathway in rodent muscle*. *Diabetologia*. **55**(3): p. 783-94.
55. Longnus, S.L., et al., *Insulin signalling downstream of protein kinase B is potentiated by 5'AMP-activated protein kinase in rat hearts in vivo*. *Diabetologia*, 2005. **48**(12): p. 2591-601.
56. Greene, M.W., et al., *Modulation of insulin-stimulated degradation of human insulin receptor substrate-1 by Serine 312 phosphorylation*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(10): p. 8199-211.
57. Jakobsen, S.N., et al., *5'-AMP-activated protein kinase phosphorylates IRS-1 on Ser-789 in mouse C2C12 myotubes in response to 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(50): p. 46912-6.
58. Qiao, L.Y., et al., *In vivo phosphorylation of insulin receptor substrate 1 at serine 789 by a novel serine kinase in insulin-resistant rodents*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(29): p. 26530-9.
59. Bellacosa, A., et al., *Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain*. *Oncogene*, 1998. **17**(3): p. 313-25.
60. Mues, C., et al., *Regulation of glucose-6-phosphatase gene expression by insulin and metformin*. *Horm Metab Res*, 2009. **41**(10): p. 730-5.

DANKSAGUNG

Bei Herrn Prof. Dr. med. Andreas Barthel möchte ich mich für die freundliche Überlassung des Themas der Dissertation bedanken. Durch seine fachliche Kompetenz und seine stets konstruktiven Verbesserungsvorschläge trug er maßgeblich zum Gelingen der Arbeit bei. Darüber brachte er mir die für diese Arbeit erforderlichen Methoden bei.

Herrn Prof. Dr. med. Werner A. Scherbaum, dem Direktor der Klinik für Endokrinologie, Diabetologie und Rheumatologie, danke ich für die Überlassung eines ausgezeichneten Arbeitsplatzes, der das Gelingen der Arbeit erst ermöglichte.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, die stets an das Gelingen der Arbeit geglaubt, mich unterstützt und aufgemuntert hat.

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und dass die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

| Dirk Oliver Karoß