

Bedeutung von Rab11a und seinen Effektoren im insulininduzierten Vesikeltransport

Inaugural-Dissertation

zur

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

vorgelegt von

Robert Wolfgang Schwenk

aus Stuttgart

März 2007

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

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

Referent: Prof. Dr. Jürgen Eckel

Korreferent: Prof. Dr. Frank Wunderlich

Tag der mündlichen Prüfung: 29.05.2007

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

Düsseldorf, den 16.03.2007

Robert Schwenk

Meinen Eltern

1. Einleitung	
1.1 Glucosemetabolismus in insulin sensitiven Geweben	1
1.2 Diabetes mellitus	2
1.2.1 Die verschiedenen Formen des Diabetes mellitus	3
1.2.2 Epidemiologie des Diabetes mellitus	6
1.3 Signalwege des Insulinrezeptors	7
1.3.1 Aktivierung des Insulinrezeptors	7
1.3.2 Der PI3-Kinase-Signalweg	9
1.3.3 Der Cbl/CAP-Signalweg	12
1.4 Glucose-Transportproteine	15
1.4.1 Na ⁺ -abhängige Glucosetransporter der SGLT-Familie	16
1.4.2 Na ⁺ -unabhängige Glucosetransporter der GLUT-Familie	16
1.5 Der insulin sensitive Glucosetransporter GLUT4	18
1.5.1 Intrazelluläre Speicherkompartimente und Exozytose des GLUT4	19
1.5.2 Rolle des Zytoskeletts in der GLUT4-Translokation	21
1.5.3 Anlagerung und Fusion von GLUT4-Vesikeln mit der Plasmamembran	23
1.5.4 Endozytose von GLUT4	24
1.6 Transport von langkettigen Fettsäuren	25
1.6.1 Allgemeines zur Aufnahme von langkettigen Fettsäuren	25
1.6.2 Der Fettsäuretransporter FAT/CD36	26
1.7 Die Familie der Kleinen Rab-GTPasen	27
1.7.1 Biochemischer Mechanismus und Regulation der Ras-GTPasen	27
1.7.2 Rab-GTPasen und Vesikeltransport	29
1.8 Regulation des GLUT4-Transports durch Rab-GTPasen	32
1.8.1 Rab4	32
1.8.2 Rab5	32
1.8.3 Rab11a	33
1.9 Spezifische Effektorproteine der Rab-GTPasen	34
1.9.1 Allgemeine Bedeutung der Rab-Effektorproteine	34
1.9.2 Effektorproteine des Rab11a	34
1.10 Ziel der Arbeit	38

2. Material und Methoden	
2.1 Material	39
2.1.1 Chemikalien, Fertigprodukte und Kits	39
2.1.2 Puffer und Medien	42
2.1.3 Enzyme	45
2.1.4 Antikörper	45
2.1.5 Zellen	46
2.1.6 Geräte	46
2.2 Molekularbiologische Methoden	48
2.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)	48
2.2.2 Gerichtete-Mutagenese-PCR	49
2.2.3 Ligation von PCR-Fragmenten mit linearisierten Vektoren	50
2.2.4 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien	50
2.2.5 Aufreinigung von Plasmid-DNA	51
2.2.6 Aufreinigung von DNA-Fragmenten	52
2.2.7 Restriktionsanalyse	52
2.2.8 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	53
2.2.9 Bestimmung von DNA- bzw. RNA-Konzentrationen	54
2.2.10 Agarose-Gelelektrophorese	54
2.2.11 Aufreinigung von RNA aus H9c2-hIR Zellen	55
2.2.12 Formalaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese	55
2.2.13 Reverse Transkription von mRNA	55
2.2.14 Real-Time-PCR	56
2.3 Zellbiologische Methoden	58
2.3.1 Kultivierung von H9c2-hIR-Zellen	58
2.3.2 Bestimmung der Zellzahl	59
2.3.3 Transfektion	59
2.3.4 Translokations-Messungen	61
2.3.5 Rab11a-GTP-Beladung	62
2.4 Proteinanalytische Methoden	63
2.4.1 Zellyse	63
2.4.2 Proteinbestimmung nach Bradford	64
2.4.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	64
2.4.4 Western Blotting (Semi-Dry-Verfahren)	65
2.4.5 Antikörperhybridisierung und ECL-Detektion	66

3. Ergebnisse	
3.1 Expressionsanalysen	67
3.1.1 Expressionsanalysen von Rab11a, Rab11-FIP2 und Rip11	67
3.1.2 Expressionsvergleich von Rab11a und Rab11b in H9c2-hIR	68
3.2 Insulinabhängige Aktivierung von Rab11a	71
3.2.1 Klonierung pCMV-HA-Rab11a	71
3.2.2 Expression von HA-Rab11a in H9c2-hIR-Zellen und Immunopräzipitation	73
3.2.3 Elektroporation von H9c2-hIR-Zellen	75
3.2.4 Insulinkinetik der Rab11a-Aktivierung	77
3.2.5 Hemmung der PI3-Kinase und Rab11a-Aktivierung	79
3.2.6 Genrepression Akt und Rab11a-Aktivierung	80
3.3 Die Regulation der GLUT4- und FAT/CD36-Translokation durch Rab11a und seine Effektoren	82
3.3.1 Transiente Genrepression von Rab11a, Rip11 und Rab11-FIP2	82
3.3.2 Überexpression GLUT4myc und FAT/CD36	83
3.3.3 GLUT4myc-Translokation nach Genrepression	88
3.3.4 FAT/CD36-Translokation nach Genrepression	90
4. Diskussion	
4.1 Expressionsvergleich Rab11a vs. Rab11b	95
4.2 Insulinabhängige Aktivierung von Rab11a	97
4.2.1 Überexpression und Elektroporation	99
4.2.2 GTP-Beladung von Rab11a	100
4.3 Translokation von GLUT4myc und FAT/CD36	104
4.3.1 Genrepression von Rab11a, Rip11 und Rab11-FIP2	104
4.3.2 Translokation von GLUT4myc unter Einfluss der Genrepression	106
4.3.3 Translokation von FAT/CD36 unter Einfluss der Genrepression	110
5. Zusammenfassung/Summary	113/114
6. Literaturverzeichnis	115
7. Anhang	
7.1 Abbildungsverzeichnis	144
7.2 Tabellenverzeichnis	145
8. Danksagung	146

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung(en)
ADA	Amerikanische Diabetes-Gesellschaft
AS	Aminosäure(n)
BMI	Körpermassenindex (Body mass index)
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
DDG	Deutsche Diabetes-Gesellschaft
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco´s modifiziertes Eagle-Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosid-5´-triphosphat
dsRNA	doppelsträngige RNA (double stranded RNA)
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N´,N´-tetraessigsäure
engl.	englisch
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	und andere (lat.)
etc.	und so weiter (lat.)
FCS	Fötale Kälberserum
GAP	GTPasen-aktivierendes Protein
GDP	Guanosin-5´-diphosphat
GSV	GLUT4-Speichervesikel
GTP	Guanosin-5´-triphosphat
HA	Hämagglutinin
HBS	HEPES-gepufferte Salzlösung
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N´-(2-ethansulfonsäure)
IgG	Immunglobulin G
Kap.	Kapitel
konz.	konzentriert
lat.	lateinisch
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LCFA	langkettige Fettsäure (long chain fatty acid)
max.	maximal
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure

mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger RNA)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBS-T	Phosphat-gepufferte Salzlösung + Tween 20®
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RIPA	Radioimmunpräzipitationsassay
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription - Polymerase-Kettenreaktion
SC	Spezialisiertes Kompartiment
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	small interfering RNA
SSO	Sulfo-N-Succinimidyleat
ssRNA	einzelsträngige RNA (single stranded RNA)
Tab.	Tabelle(n)
TAE	Tris / Acetat - Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
TBS	Tris-gepufferte Natriumchlorid-Lösung
TBS-T	Tris-gepufferte Natriumchlorid-Lösung + Tween 20®
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
Tris / HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolett

1. Einleitung

1.1 Glucosemetabolismus in insulinensitiven Geweben

Die kontinuierliche Versorgung des Organismus mit Glucose ist essentiell für die normale Funktion und den Erhalt der Organe. Während Hypoglykämie (geringer Zuckergehalt des Blutes) zum Zelltod führt, kann auch eine chronische Hyperglykämie (überhöhter Zuckergehalt des Blutes) zu Beschädigung von Organen führen. Aus diesem Grund ist im gesunden Menschen der Blutzuckergehalt auf einen Bereich um 5-7 mM reguliert (Saltiel, 2001).

Das Gleichgewicht zwischen Glucoseverbrauch und -produktion wird hauptsächlich über zwei antagonistische Hormone reguliert, Insulin und Glukagon. Als Antwort auf eine erhöhte Konzentration an Zucker und Aminosäuren im Blut, beispielsweise nach einer Mahlzeit, wird Insulin von den β -Zellen der Langerhans'schen Inseln im Pankreas freigesetzt (Zawalich & Rasmussen, 1990). Über den Glucosetransporter GLUT2 gelangt Glucose in die β -Zellen. GLUT2 besitzt eine relativ geringe Affinität gegenüber Glucose, so dass mit der Fluktuation des Blutzuckerspiegels die Rate des Glucosetransportes in die β -Zellen verändert wird. Die β -Zellen enthalten eine spezifische Glucokinase, welche nicht durch Produktbildung gehemmt wird und daher über einen weiten Konzentrationsbereich der Glucose aktiv ist. Nach der Phosphorylierung wird die Glucose oxidiert und ATP gebildet. Das erhöhte ATP/ADP-Verhältnis verursacht das Schließen der Kalium-Kanäle und damit eine Depolarisation der Zellen. Dies resultiert in der Öffnung der ladungssensitiven Calcium-Kanäle, was wiederum die Fusion der Insulin enthaltenden sekretorischen Vesikel mit der Plasmamembran stimuliert und zur Ausschüttung von Insulin führt (Matschinsky, 1990). Während einer Hungerphase oder bei körperlicher Betätigung sinkt der Blutzuckerspiegel, woraufhin Glukagon von den α -Zellen der Langerhans'schen Inseln sekretiert und Glykogen zu Glucose abgebaut wird (Saltiel, 2001).

Die primären Ziele des Insulins sind Skelett- und Herzmuskel, Fettgewebe und Leber. Dort stimuliert Insulin durch die Erhöhung der Konzentration einer spezifischen Glucosetransporter-Isoform, dem GLUT4, an der Zelloberfläche die Aufnahme von Glucose um ein zehn- bis vierzigfaches des Basalwertes (Holman & Cushman, 1994). Nach Eintritt in die Muskelzelle wird Glucose durch Hexokinasen phosphoryliert und entweder durch die

Aktivierung der Glykogen-Synthase als Glykogen eingelagert oder zur ATP-Synthese oxidiert (Saltiel, 2001). In den Adipozyten wird Glucose primär als Fett gespeichert. Hier verhindert Insulin durch indirekte Inhibition einer hormonsensitiven Lipase zudem die Lipolyse (Londos et al., 1999). Die meisten der insulinabhängigen Veränderungen der Aktivität unterschiedlicher Enzyme werden als Folge von Protein-Kinase-Inhibition und Phosphatasen-Aktivierung über deren Phosphorylierungszustand reguliert.

Eine weitere Funktion des Hormons ist die Inhibition der Produktion und Freisetzung von Glucose infolge der Gluconeogenese und Glykogenlyse durch die Leber. Neben der Kontrolle diverser Stoffwechsellzyme durch Phosphorylierung oder Dephosphorylierung reguliert Insulin auch die Transkription einiger hepatischer Enzyme, wie beispielsweise der Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (PEPC). Die Menge des Enzyms bestimmt den Grad der Gluconeogenese. Glukagon hat die exakt gegensätzliche Wirkung bezüglich der Regulation dieser Stoffwechsellzyme durch Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung und Transkriptionsregulation. Erhöhung des hepatischen cAMP-Spiegels durch Glukagon erhöht auch die Expressionsrate der PEPC-Gene während einer Hypoglykämie (O'Brien & Granner, 1991). Die Aktivität vieler Stoffwechsellzyme spiegelt daher die Summe der Signale von Insulin- und Glukagon-Rezeptoren wider und ändert sich ständig als Antwort auf Veränderungen des Blutglucosespiegels (Saltiel, 2001).

1.2 Diabetes mellitus

Wird die Glucose nicht oder unvollständig verwertet, steigt der basale Blutzucker sowie der postprandiale Blutzucker an: Der Blutzuckergehalt kann dabei Werte von über 40 mM erreichen. Es kommt zu deutlich spürbarem Harndrang, weil der Körper ab einem Wert von ungefähr 10 mM einen Teil des überschüssigen Blutzuckers mit dem Urin über die Nieren ausscheidet. Glucose kann nur in Wasser gelöst ausgeschieden werden, dadurch wird dem Gewebe wiederum sehr viel Flüssigkeit entzogen. Harndrang und häufiges Wasserlassen sind die Folge. Der Körper versucht dieses Flüssigkeitsdefizit auszugleichen und signalisiert starken Durst. Da Glucose ein wichtiger und vor allem schneller Energielieferant ist, werden die Zellen schlechter mit Nahrungsenergie versorgt, ein direktes Resultat hiervon sind Leistungsabfall, Konzentrationsstörungen oder Müdigkeit.

Zum Ausgleich dieses Energiedefizits baut der Körper zuerst Glykogen, danach Depotfett ab. Beim Fettabbau entstehen als Stoffwechselprodukte Ketonkörper (Aceton). Diese verursachen

eine Übersäuerung des Blutes (Ketoazidose). Vor allem beim Typ 1-Diabetes entsteht bei lange anhaltenden, zu hohen Blutzuckerwerten ein typischer Acetongeruch. Die Folgen der Zuckerkrankheit sind zahlreich. In Industrieländern stellt der Diabetes mellitus die viert häufigste Todesursache dar, außerdem die Hauptursache von Erblindungen und schweren Sehstörungen bei Erwachsenen. Diabetes ist die häufigste Ursache für Amputationen, die nicht durch Verletzungen bedingt sind. Das Risiko für eine Beinamputation ist bei Diabetikern 15- bis 40-mal höher als bei der Gesamtbevölkerung. Die primäre Todesursache in Industrieländern sind Herz-Kreislauf-Erkrankungen, das Risiko einer solchen Erkrankung ist bei Diabetikern 2- bis 4-mal höher als bei Menschen ohne Diabetes mellitus.

1.2.1 Die verschiedenen Formen des Diabetes mellitus

Beim Diabetes kann der Glucosetransport in die Zellen an zwei Stellen gestört sein: Diabetes mellitus resultiert entweder aus einem Mangel an Insulin (IDDM, insulin-dependent diabetes mellitus, Typ 1-Diabetes) oder der Unfähigkeit des Körpers auf normale Konzentrationen des Insulins im Blut zu reagieren (NIDDM, non-insulin-dependent diabetes mellitus, Typ 2-Diabetes) (White, 1997).

Typ 1-Diabetes

Diese Diabetes-Form wird zu den Autoimmunkrankheiten gezählt. Das Abwehrsystem kann körpereigene Stoffe oder Zellen nicht mehr als körpereigen identifizieren und produziert Antikörper gegen sie. Früh nachweisbare Antikörper im Blut geben einen ersten Hinweis auf eine solche Autoimmunreaktion.

Beim Typ 1-Diabetes zerstören Immunzellen die Insulin produzierenden pankreatischen β -Zellen. Ist der überwiegende Teil der β -Zellen zerstört, ist ein absoluter Insulinmangel die Folge und der Blutzucker steigt kontinuierlich weiter an. Durch den Insulinmangel ist ab Behandlungsbeginn eine exogene Insulingabe notwendig. Es wird vermutet, dass Krankheitserreger wie Röteln- oder Grippe-Viren, umweltbedingte Faktoren und genetische Prädispositionen eine Rolle spielen. Da die betroffenen Personen meist im Kindesalter erkranken, wird der Typ 1-Diabetes auch als „juvener“ Diabetes mellitus bezeichnet. Die Symptome sind u.a. Polyurie, Polydipsie und die Ketoazidose. Der LADA-Diabetes (latent autoimmune diabetes in adults) ist eine Form des Typ 1-Diabetes, der gewöhnlich nach dem 30. Lebensjahr bis ins hohe Alter auftreten kann. Bei dieser Form ist meist eine Restfunktion

der β -Zellen erhalten, sodass die Symptome schwächer ausgeprägt sind. Diese Form des Typ 1-Diabetes wird häufig zuerst für einen Typ 2-Diabetes gehalten, nur 5 % aller Diabetiker sind Typ 1-Diabetiker.

Typ 2-Diabetes

Der Typ 2 stellt die häufigste Diabetes-Form dar, 90 % aller Diabetiker sind an dieser Form erkrankt. Da sich nach dem klassischen Erkrankungsbild ein Typ 2-Diabetes erst nach dem 40. Lebensjahr manifestiert, wird hierbei auch vom „Altersdiabetes“ gesprochen. Er tritt meist bei übergewichtigen Personen auf, oftmals kombiniert mit dem metabolischen Syndrom, oder ist erblich bedingt (Hoffbauer, 2005). Da inzwischen immer mehr Jugendliche an Übergewicht leiden, ist die Zahl der an „Altersdiabetes“ Erkrankten in dieser Altersgruppe stark gestiegen.

Bei dem metabolischen Syndrom handelt es sich um Symptome, die besonders für Wohlstandsgesellschaften typisch sind. Ein starkes Übergewicht gehört dazu, sowie eine Fettstoffwechselstörung mit Hypertriglyceridämie (Reaven et al., 1967; Olefsky et al., 1974) und erniedrigten Hochdichte-Lipoprotein-Cholesterin (HDL-Cholesterin) (Haller, 1977; Singer et al., 1977), Hypertonie (Modan et al., 1985; Ferrannini et al., 1987) und gestörte Glucosetoleranz bzw. Insulinresistenz (Reaven, 1988). Als Kenngrößen für das metabolische Syndrom nennt die Weltgesundheitsorganisation (WHO) eine Glucoseintoleranz, Diabetes mellitus und/oder Insulinresistenz gepaart mit mindestens zwei der folgenden Komponenten: (1.) eine gestörte Glucosehomöostase oder Diabetes, (2.) eine Insulinresistenz, (3.) einen Blutdruck von 140/90 mmHg oder höher, (4.) eine Serum-Triglyceridkonzentration von 1,7 mM oder höher und/oder eine HDL-Cholesterinkonzentration von weniger als 0,9 mM (Männer) bzw. 1,0 mM (Frauen), (5.) eine zentrale Adipositas mit einem Taille/Hüft-Verhältnis von mehr als 0,9 (Männer) bzw. 0,85 (Frauen) und/oder einem BMI von über 30 kg/m² und (6.) eine Mikroalbuminurie mit einer Exkretionsrate von mehr als 20 μ g/min oder einem Albumin/Kreatinin-Verhältnis von über 30 mg/g (WHO, 1999). Als Auslöser des metabolischen Syndroms wird die Insulinresistenz angesehen, also das verminderte Ansprechen der Zellen auf Insulin. Die Insulinresistenz wiederum ist meist Folge von Überernährung, Übergewicht und Bewegungsmangel. Das metabolische Syndrom stellt ein hohes Risiko für eine frühe Entwicklung einer Arteriosklerose und deren Folgen wie Myokardinfarkt, Schlaganfall und der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit dar (Hoffbauer, 2005).

Die mit dem metabolischen Syndrom einhergehende Fettstoffwechselstörung zeigt sich in einem starken Übergewicht. Dabei steigt mit zunehmendem Übergewicht das Risiko, einen Typ 2-Diabetes zu entwickeln, um das 5- bis 10-fache. Bei Übergewicht und verminderter körperlicher Aktivität verliert Insulin seine Wirkung. Die β -Zellen des Pankreas kompensieren normalerweise die Insulinresistenz durch eine erhöhte basale Insulinsekretion (Hyperinsulinämie), was wiederum zu einer Verstärkung der Insulinresistenz führt. Ab einem gewissen Punkt können die β -Zellen den Defekt nicht mehr kompensieren und es kommt letztendlich zur Verschlechterung der Glucosehomöostase und der Entwicklung der Glukoseintoleranz (Saltiel, 2001).

Der ständig erhöhte Blutzucker erzeugt einen starken osmotischen Druck. Der daraus resultierende Wasserverlust von Nervenzellen führt zu Bewusstseinsstörungen bzw. Bewusstlosigkeit. Hinzu kommt, dass über die Niere überschüssige Glucose ausgeschieden wird und damit eine große Menge Flüssigkeit verloren geht. Der Flüssigkeitsmangel kann zu Nierenversagen bzw. dem diabetischen Koma führen. Auf lange Sicht führt der erhöhte Blutzuckerspiegel zu Schäden an Blutgefäßen, Nerven und verschiedenen Organen.

Die unzureichende Effektivität des Insulins die Glucoseaufnahme in die Zelle zu stimulieren, ist ein wesentlicher Defekt des Typ 2-Diabetes. In bestimmten Fettdepots führt außerdem die spätere Resistenz gegen die antilipolytischen Effekte des Insulins zu erhöhter Lipolyse und Freisetzung von Fettsäuren. Diese Fettsäuren attenuieren die Fähigkeit des Insulins die Gluconeogenese in der Leber zu unterdrücken und verursachen eine kontinuierliche Erhöhung der insulinstimulierten Fettsäuresynthese. Insgesamt beschleunigt die Deregulierung des Kohlenstoff- und Fettstoffwechsels daher das Fortschreiten der Insulinresistenz.

Weitere Formen des Diabetes

Eine heute sehr beachtete Form des Diabetes ist der sogenannte MODY (maturity onset diabetes of the young, „Erwachsenendiabetes bei Jugendlichen“), von dem zwei Prozent aller Diabetiker betroffen sind. Die früher als Variante des Typ 2-Diabetes betrachtete Diabetesform beruht auf einem genetischen Defekt, der sich meist vor dem 25. Lebensjahr manifestiert. Die Patienten bleiben normalgewichtig und werden nicht insulinpflichtig. Beim MODY sind keine Antikörper gegen Inselzellen nachweisbar. Im Gegensatz zu LADA-Patienten, kommen in Familien von MODY-Patienten gehäuft Diabetesfälle vor. Soweit heute bekannt, beruht die Erkrankung auf Mutationen in sechs verschiedenen Genen, fünf davon betreffen HNF-Transkriptionsfaktoren (HNF: hepatic nuclear factor) (Fehmann et al., 2004). Mutationen in diesen Genen in β -Zellen verursachen eine Verminderung der Insulinsekretion.

Eine Schwangerschaft kann auf Grund des veränderten Hormonhaushalts die Entstehung eines Diabetes begünstigen. Nach der Geburt normalisiert sich der Stoffwechsel meist wieder, nur bei etwa vier Prozent bleibt der Diabetes bestehen. Frauen, die einen Schwangerschaftsdiabetes hatten, haben im Verlauf des Lebens ein sehr hohes Risiko, einen Typ 2-Diabetes zu entwickeln.

Eher selten vorkommende Diabetes-Formen haben als Ursache genetische Defekte der β -Zell-Funktion, genetische Defekte der Insulinwirkung, Erkrankungen der Bauchspeicheldrüse (Entzündungen, Karzinome), Erkrankungen des Hormonsystems (Schilddrüsenüberfunktion, Cushing-Syndrom), Medikamente oder Chemikalien (Kortison, Schilddrüsenhormone) und Infektionen.

1.2.2 Epidemiologie des Diabetes mellitus

Im Jahr 2003 wurde die Zahl der weltweit an Diabetes mellitus leidenden Menschen auf mehr als 194 Millionen geschätzt, diese Zahl entspricht 5,1 Prozent der erwachsenen Bevölkerung. Von diesen Erkrankten leben ca. zwei Drittel in Entwicklungsländern. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) und die internationale Diabetes-Vereinigung (IDF) rechneten im Jahr 2003 mit einem Anstieg bis zum Jahr 2025 um 72 Prozent auf 333 Millionen Diabetiker weltweit (IDF Diabetes Atlas, 2003). Aktuellere Prognosen aus dem Jahr 2004 rechnen mit 366 Millionen Diabetikern für das Jahr 2030. In der Bundesrepublik Deutschland sind ca. fünf Millionen Fälle diagnostiziert, die absolute Zahl wird allerdings auf 6,3 Millionen geschätzt. Die meisten Diabetiker leben in Ländern wie Indien (35,5 Millionen), China (23,8 Millionen), USA (16 Millionen), Russland (9,7 Millionen), sowie Japan, Deutschland, Pakistan und Brasilien.

Die geschätzte prozentuale Häufigkeit aller Diabetesfälle in der Gesamtbevölkerung ist besonders hoch in Nauru (30,2 %), den Vereinigten Arabischen Emiraten (20,1 %), Bahrain (14,9 %), Kuwait (12,8 %) und Singapur (12,3 %), aber auch in Deutschland (10,2 %) und Spanien (9,9 %). Die prognostische Entwicklung der Zahl der weltweit an Diabetes mellitus leidenden Menschen sieht für das Jahr 2025 in Afrika, dem östlichen Mittelmeer, mittleren Osten und in Südafrika eine Verdreifachung voraus. In Nord- und Südamerika und im West-Pazifik wird sich die Zahl verdoppeln und in Europa um ca. 50 % zunehmen. Zur Behandlung des Diabetes und seiner Folgeerkrankungen werden bereits je nach Nation 5 bis 10 % des jeweiligen nationalen Gesundheitsbudgets verwendet.

1.3 Signalwege des Insulinrezeptors

1.3.1 Aktivierung des Insulinrezeptors

Wird Insulin von den β -Zellen des Pankreas ausgeschüttet, bindet es an den Insulinrezeptor (White, 1997). Der Insulinrezeptor ist in nahezu allen Gewebearten von Vertebraten vorhanden. Die größte Anzahl des Rezeptors ist an der Oberfläche von Adipozyten und Hepatozyten zu finden (ca. 200.000/Zelle) (White, 1997). Er besteht aus zwei α -Untereinheiten, die an jeweils eine β -Untereinheiten durch Disulfidbrücken gebunden sind (Kasuga et al., 1982; Ullrich & Schlessinger, 1990). Eine weitere Disulfidbrücke verbindet beide α -Untereinheiten miteinander. Beide Untereinheiten werden durch proteolytische Spaltung eines singulären Prorezeptors erhalten, das komplette Heterotetramer besitzt in einer SDS-PAGE ein apparentes Molekulargewicht von 300-400 kDa. Die α -Untereinheiten sind im extrazellulären Raum lokalisiert und tragen jeweils zwei Insulin-Bindestellen. Die β -Untereinheiten ist in eine Protein-Tyrosin-Kinase (Insulinrezeptor-Kinase IRK, auch katalytische Domäne), in eine Juxtamembrandomäne und eine C-terminale Domäne untergliedert (Ullrich et al., 1985; Ebina et al., 1985; Seino et al., 1990).

Jede α -Untereinheit enthält zwei Insulin-Bindedomänen, Domäne 1α und 2α , welche unabhängig voneinander zur Bindung des Insulin beitragen (De Meyts et al., 1995). Vor der Bindung des Insulins üben die α -Untereinheiten des Insulinrezeptors eine negative Wirkung auf die Kinase-Aktivität der β -Untereinheiten aus (Shoelson et al., 1988; Herrera et al., 1988; Villalba et al., 1989). Insulin selbst beinhaltet zwei spezifische Rezeptor-Bindedomänen, wodurch das Insulinmolekül bei der Bindung an den Rezeptor die bereits durch Disulfidbrücken kovalent gebundenen α -Untereinheiten zusätzlich quervernetzt (De Meyts, 1995). Durch diese Bindung an das durch die α -Untereinheiten gebildete Dimer kommt es zu einer Konformationsänderung der β -Untereinheiten (Shoelson et al., 1988) und der Aktivierung der Kinaseaktivität des Insulinrezeptors.

Diese Aktivierung führt zu einer Autophosphorylierung verschiedener Tyrosin-Reste in der Juxtamembrandomäne (Tyrosin 972), am C-terminalen Ende (Tyrosin 1328 und Tyrosin 1334) und der Tyrosin-Kinase in der katalytischen Domäne (Tyrosin 1158, Tyrosin 1162 und Tyrosin 1163) (Feener et al., 1993; White & Kahn, 1994). Durch die Autophosphorylierung aller drei Tyrosin-Reste in der katalytischen Domäne wird die Kinase 10-20 fach aktiviert, diese Aktivitätsteigerung ist entscheidend für die Signalweiterleitung.

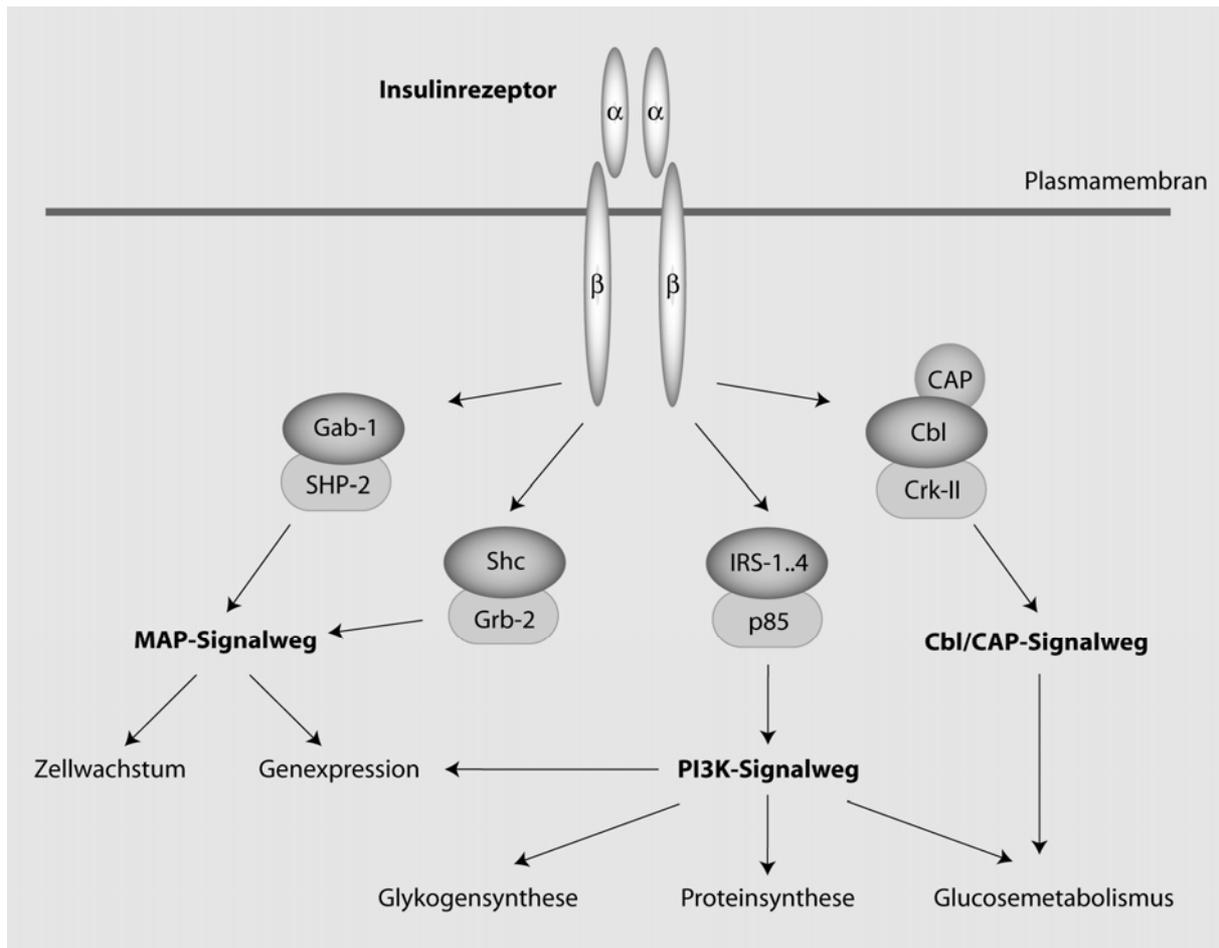


Abb. 1.1 : Schematische Darstellung der weiterführenden Signalwege des Insulinrezeptors (variiert nach Saltiel, 2001). Nach Aktivierung des Insulinrezeptors phosphoryliert dieser Proteine an Tyrosin-Resten, diese wiederum werden von Proteinen mit SH2-Domänen erkannt. Deren Aktivierung führt dann zur Einleitung verschiedener Signalwege (s. Text).

Mutationen an einem, zwei oder allen drei Tyrosin-Resten führen hingegen zu einem entsprechenden Verlust der Kinase-Aktivität (Vogt et al., 1991; Wilden et al., 1992). Auch Punktmutationen in der ATP-Bindestelle führen zum Verlust der Signalübertragung (Chou et al., 1987; McClain et al., 1987), diese auch natürlich auftretenden Mutationen werden mit schwerer Insulinresistenz assoziiert (Odawara et al., 1989; Moller et al., 1990). Ist der Insulinrezeptor aktiviert, phosphoryliert er Tyrosin-Reste einer Reihe von intrazellulären Substraten, unter anderem Mitglieder der Insulinrezeptor-Substrat Familie (IRS-1, 2, 3 und 4) (White, 1997; Sesti et al., 2001), Src-Homologie/Kollagen (SHC) Proteine (Giorgetti et al., 1994; Pessin & Saltiel, 2000), Gab-1 (Holgado-Madruga et al., 1996) und Cbl (Saltiel, 2001). Die phosphorylierten Tyrosin-Reste dieser Proteine dienen als Bindestellen für Proteine mit Src-Homologie 2 (SH2) -Domänen (Saltiel & Kahn, 2001). Diese SH2-Proteine dienen als Adaptermoleküle, wie beispielsweise die regulatorische Untereinheit der Phosphatidyl-

inositol-3-Kinase (PI3-Kinase, PI3K) p85, Grb-2 oder Crk-II (Abb. 1.1). Andere SH2-Proteine sind selbst wieder Enzyme, dazu zählen die Phospho-Tyrosin-Phosphatase SHP-2 und die zytoplasmatische Tyrosin-Kinase Fyn. Substrate, die an diese SH2-Proteine binden, können dadurch ihre Aktivität oder zelluläre Lokalisation regulieren.

Während die insulinstimulierte Glucoseaufnahme in Muskelzellen hauptsächlich über den PI3-Kinase –abhängigen Signalweg vermittelt wird (Tsakiridis et al., 1995; Terauchi et al., 1999), wird das Insulinsignal in Adipocyten über den Cbl/CAP-abhängigen Signalweg weitergeleitet (Ahmed et al., 2000; Liu et al., 2003; Baumann et al., 2001). Als einzige Ausnahme konnte eine aktuelle Studie allerdings eine insulinabhängige Aktivierung des Cbl/CAP-Signalweges auch in Herz- und Skelettmuskel zeigen (Gupte & Mora, 2006).

1.3.2 Der PI3-Kinase-Signalweg

Die PI3-Kinase spielt eine zentrale Rolle bei den metabolischen und mitogenen Effekten von Insulin und IGF-1 (IGF: insulin like growth factor) (Shepherd et al., 1995). Durch Inhibition der PI3-Kinase oder durch Überexpression von dominant negativen Varianten der PI3-Kinase werden die meisten metabolischen Effekte des Insulins, wie beispielsweise die Glucoseaufnahme und die Glykogen- und Lipidsynthese, blockiert (Okada et al., 1994; Sharma et al., 1998). Durch Überexpression einer konstitutiv aktiven Variante der PI3-Kinase können Insulineffekte wie Aufbau des Actin-Netzwerkes oder die Glucoseaufnahme nachgeahmt werden (Martin et al., 1996). Die PI3-Kinase besteht aus der katalytischen Untereinheit p110 und der regulatorischen Untereinheit p85, welche zwei SH2-Domänen besitzt. Diese können mit Tyrosin-phosphorylierten pYMXM- und pYXXM-Motiven von IRS-Proteinen interagieren (Myers et al., 1992). Von der regulatorischen Untereinheit p85 sind zahlreiche Isoformen identifiziert. Sie stammen von drei Genen (p85 α , p85 β und P55^{PI3K}) (Pons et al., 1995) und alternativem Splicen von p85 α zu AS53/p55 α und p50 α (Antonetti et al., 1996; Fruman et al., 1996). Während p85 α die PI3-Kinasen-Aktivität zu GLUT4-Vesikeln lenkt, stellt p85 β den Hauptregulator der durch IRS-1 und IRS-2 vermittelten PI3-Kinasen-Aktivierung dar (Kessler et al., 2001).

Durch die Aktivierung der PI3-Kinase werden zahlreiche Signale weitergeleitet. Die PI3-Kinase katalysiert die Phosphorylierung von Phosphoinositiden, wodurch Phosphatidylinositol-3-Phosphate, vor allem Phosphatidylinositol-(3,4,5)-tri-Phosphat (PIP₃), gebildet

werden. Diese wiederum binden Signalproteine mit Pleckstrin-Homologie-Domänen (PH-Domänen), wodurch deren Aktivität oder intrazelluläre Lokalisation verändert wird (Lietzke et al., 2000). Die PI3-Kinase besitzt auch eine Serin-Kinasen-Aktivität, darüber hinaus können sowohl die regulatorische als auch die katalytische Untereinheit mit unterschiedlichen Signalmolekülen interagieren.

Phosphatidylinositol-tri-Phosphate regulieren drei unterschiedliche Klassen von Signalmolekülen: die AGC-Familie der Serin/Threonin-Proteinkinasen (Peterson & Schreiber, 1999), Guaninnukleotid-Austauschproteine der Familie der Rho-GTPasen (Mackay & Hall, 1998) und die TEC-Familie der Tyrosinkinasen (Fruman, 2004).

Die am besten charakterisierte AGC-Kinase ist die Phosphoinositid-abhängige Kinase 1 (PDK1), welche eine der Serin-Kinasen darstellt, die die Serin/Threonin-Kinase Akt/PKB (PKB: Proteinkinase B) phosphoryliert und dadurch aktiviert (Alessi et al., 1997). Neben den drei Isoformen der Akt (Akt 1-3) werden die atypischen PKCs (PKC: Proteinkinase C) PKC λ und PKC ζ und Serum- und Glucokortikoid-regulierte Kinasen (SGKs) durch PDK1 aktiviert (Standaert et al., 1997; Mora et al., 2004). Darüber hinaus aktiviert die PI3-Kinase auch den mTOR/FRAP-Signalweg (mTOR: mammalian target of rapamycin) und könnte auch an der Regulation der Phospholipase D beteiligt sein. mTOR wurde inzwischen als Phosphoinositid-abhängige Kinase 2 (PDK2) identifiziert, welche Akt am Serin473 phosphoryliert (Sarbasov et al., 2005).

Sowohl Akt als auch die atypischen PKCs scheinen für den insulinstimulierten Glucosetransport benötigt zu werden. Akt besitzt selbst eine PH-Domäne, welche direkt mit Phosphatidylinositol-(3,4,5)-tri-Phosphaten interagiert. Durch die Bindung von PIP₃ wird Akt zur Plasmamembran verlagert und seine katalytischen Eigenschaften aktiviert (Corvera & Czech, 1998). Durch Überexpression einer membranständigen Akt-Form konnte die Glucoseaufnahme und die Translokation von GLUT4 zur Plasmamembran erhöht werden (Kohn et al., 1998; Kohn et al., 1996). Passend dazu konnte die insulinstimulierte GLUT4-Translokation durch Überexpression einer dominant-negativen Variante der Akt gehemmt werden (Wang et al., 1999; Cong et al., 1997). Sowohl Studien mit Knockout-Mäusen, als auch Transfektionen von 3T3-L1 Adipozyten mit gegen Akt1 gerichteter siRNA (siRNA: small interfering RNA) haben gezeigt, dass allein durch Genrepression der Akt1 keine Veränderung der Insulinsensitivität erreicht werden kann (Jiang et al., 2003). Durch Überexpression von inhibierten bzw. konstitutiv aktiven Formen der Akt konnten die Effekte des Insulins weder einheitlich inhibiert noch stimuliert werden (Brady et al., 1998).

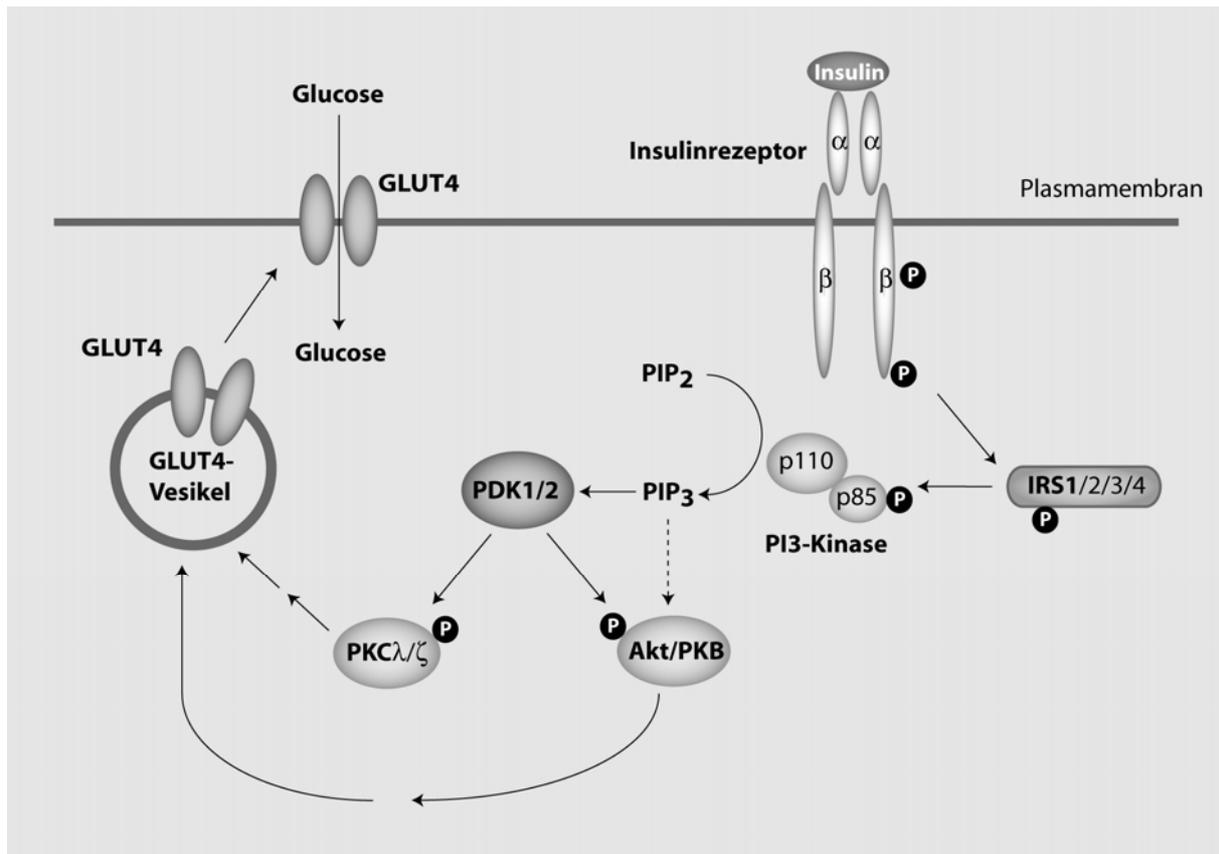


Abb. 1.2 : Schematische Darstellung des PI3-Kinase-Signalweges. Nach Aktivierung des Insulinrezeptors durch Insulin phosphoryliert dieser u.a. IRS1-4 an Tyrosin-Resten. Diese wiederum phosphorylieren die PI3-Kinase an ihrer regulatorischen Untereinheit p85, worauf die katalytische Untereinheit p110 PIP₂ zu PIP₃ phosphoryliert. PIP₃ wird von PDK1/2 und Akt/PKB gebunden, PDK1/2 phosphoryliert und aktiviert die untypischen PKCs PKC λ und PKC ζ , sowie Akt/PKB. Beide Signale führen über weitere, z.T. unbekannte Schritte zur Translokation von GLUT4 zur Plasmamembran.

Eine Deletion der Akt2 verursacht allerdings eine hepatische Insulinresistenz in Mäusen (Cho et al., 2001). Die metabolischen Effekte lassen sich verstärken, wenn man Akt1 und Akt2 gleichzeitig ausschaltet. Obwohl zahlreiche potentielle Substrate der Akt identifiziert worden sind, welche im Glucosetransport eine Rolle spielen könnten, sind nur wenige bisher näher charakterisiert worden. Ein viel beachtetes Substrat ist das Rab-GTPasen-aktivierende Protein (Rab-GAP) AS160. Dieses Rab-GAP mit einem apparenten Molekulargewicht von 160 kDa wird nach einem Insulinstimulus an mehreren Stellen durch Akt phosphoryliert (Sano et al., 2003). Überexpression einer AS160-Variante, die nicht durch Akt phosphoryliert werden kann, führt zur Hemmung der insulinstimulierten GLUT4-Translokation (Sano et al., 2003; Zeigerer et al., 2004).

Die eigentliche Funktion des AS160 ist die Zurückhaltung der GLUT4-Vesikel im basalen Zustand, Insulin führt durch die Phosphorylierung des AS160 zu dessen Inhibierung (Eguez et

al., 2005). In Studien mit Typ 2-Diabetikern wurde festgestellt, dass bei ihnen die insulinstimulierte AS160-Phosphorylierung reduziert ist (Karlsson et al., 2005). Als primäre Ziel-GTPasen von AS160 wurden Rab2a, Rab8a, Rab10 und Rab14 identifiziert (Mîinea et al., 2005).

Die Aktivität dieses Signalweges ist außerdem über Phosphatidylinositol-3-Phosphatasen und die SH2-Domänen-enthaltende Inositol-5-Phosphatase SHIP2 reguliert (Ogg & Ruvkun, 1998; Wada et al., 1999). Eine Überexpression dieser Enzyme führt zur Reduzierung von PIP₃. Dies könnte die Signaltransduktion durch die Phosphoinositide terminieren. Veränderungen in diesen Genen oder verminderte Expression dieser mRNAs führte in Mäusen zu erhöhter Insulinsensitivität (Clement et al., 2001).

Unabhängig der offensichtlichen Bedeutung des PI3K-Signalweges für die Glucoseaufnahme, ist eine direkte Aktivierung der PI3-Kinase nicht ausreichend, um die Insulineffekte nachzuahmen. Eine Stimulation der PI3-Kinase mit PDGF (PDGF: platelet-driven growth factor) oder Interleukin4 erhöht nicht die Glucoseaufnahme (Wiese et al., 1995; Isakoff et al., 1995). Auch die Zugabe eines membrangängigen PIP₃-Analoges konnte in 3T3L1 Adipozyten keine Glucoseaufnahme stimulieren (Jiang et al., 1998). Auch die Überexpression einer konstitutiv-aktiven Variante der PI3-Kinase konnte den Insulineffekt auf die GLUT4-Translokation nicht komplett nachahmen (Martin et al., 1996). Es scheint daher offensichtlich, dass alleine eine Aktivierung des PI3-Kinase-Signalweges nicht ausreichend ist, um die insulinabhängige Glucoseaufnahme maximal zu stimulieren.

1.3.3 Der Cbl/CAP-Signalweg

Ein weiterer Signalweg des Insulins zur Glucoseaufnahme führt über die Tyrosin-Phosphorylierung des Protoonkogens Cbl (Pessin & Saltiel, 2000; Ribon & Saltiel, 1997). Die Phosphorylierung von Cbl wird über das Adapterprotein APS, welches sowohl SH2- als auch PH-Domänen trägt, vermittelt (Kimura et al., 2002; Baumann et al., 2000). APS existiert als Homodimer und interagiert über seine SH2-Domäne mit den drei phosphorylierten Tyrosin-Resten der katalytischen Kinasedomäne des aktivierten Insulinrezeptors (Hu et al., 2003). Dabei bindet jeweils ein Teil des APS-Homodimers an eine β -Untereinheit des Insulinrezeptors.

Nach der Bindung an den Insulinrezeptor wird APS C-terminal an einem Tyrosin-Rest phosphoryliert, wonach Cbl über seine SH2-Domäne an das APS-Homodimer bindet (Liu et

al., 2002). Im folgenden Schritt wird Cbl selbst an drei Tyrosin-Resten phosphoryliert. In den meisten insulinsensitiven Zellen ist Cbl mit dem Adapterprotein CAP assoziiert. CAP bindet über seine C-terminale SH3-Domäne an PXXP-Motive in Cbl, wodurch beide Proteine konstitutiv assoziiert sind (Ribon et al., 1998). Vor allem während der Differenzierung von Adipozyten ist CAP hoch aktiv, seine Expression wird durch Insulin-sensitivierende PPAR γ -Agonisten (PPAR: Peroxisomaler Proliferations-aktivierter Rezeptor) erhöht (Ribon et al., 1998).

CAP gehört zu einer Familie von Adapterproteinen, welche drei SH3-Domänen und eine Region mit hoher Ähnlichkeit zu dem Peptid Sorbin, auch als Sorbin-Homologie-Domäne (SoHo-Domäne) bekannt, tragen (Kimura et al., 2001). Nach der Phosphorylierung durch den Insulinrezeptor transloziert der Cbl/CAP-Komplex zu Lipid-Raft-Domänen in der Plasmamembran (Baumann et al., 2000).

Lipid-Raft-Domänen sind spezialisierte Kompartimente der Plasmamembran, in denen unter anderem Cholesterin, Sphingolipide, lipidmodifizierte Signalproteine, Glycosylphosphatidylinositol(GPI)-verankerte Proteine und Glycolipide verstärkt vorkommen (Smart et al., 1999). Ein Teil des membranständigen Insulinrezeptors ist in diesen Mikrodomänen zu finden, wahrscheinlich wegen seiner Interaktion mit dem Raft-Protein Caveolin (Parpal et al., 2001; Kimura et al., 2002). Die Translokation des Cbl/Cap-Komplexes zur Plasmamembran wird durch die Interaktion der SoHo-Domäne von CAP mit dem Protein Flotillin gesteuert (Kimura et al., 2001; Liu et al., 2005). Die Expression einer dominant-negativen Variante von CAP, welche nicht an Cbl oder Flotillin binden kann, inhibiert die insulinstimulierte GLUT4-Translokation und Glucoseaufnahme. Allerdings beeinträchtigte die Expression dieser dominant-negativen Variante von CAP nicht die Aktivierung der PI3-Kinase, wodurch deutlich wird, dass der Cbl/CAP-Komplex eine wichtige Rolle in der insulinstimulierten Glucoseaufnahme über einen nicht-PI3K-abhängigen Signalweg in Adipozyten spielt (Baumann et al., 2000).

Widersprüchlich sind Ergebnisse aus verschiedenen Publikationen, welche die Bedeutung von APS, Cbl und CAP über siRNA-vermittelte Genrepression zu klären versuchten. Während die Arbeitsgruppe um Pillay durch Genrepression beider Proteine die insulinstimulierte Glucoseaufnahme inhibieren konnten (Ahn et al., 2004), fand die Arbeitsgruppe um Czech in ähnlichen Versuchen keine Veränderung des insulinstimulierten Glucosetransports (Mitra et al., 2004; Zhou et al., 2004). Während der Translokation des phosphorylierten Cbl bindet dieses das Adapterprotein CrkII über dessen SH2-Domäne (Chiang et al., 2001).

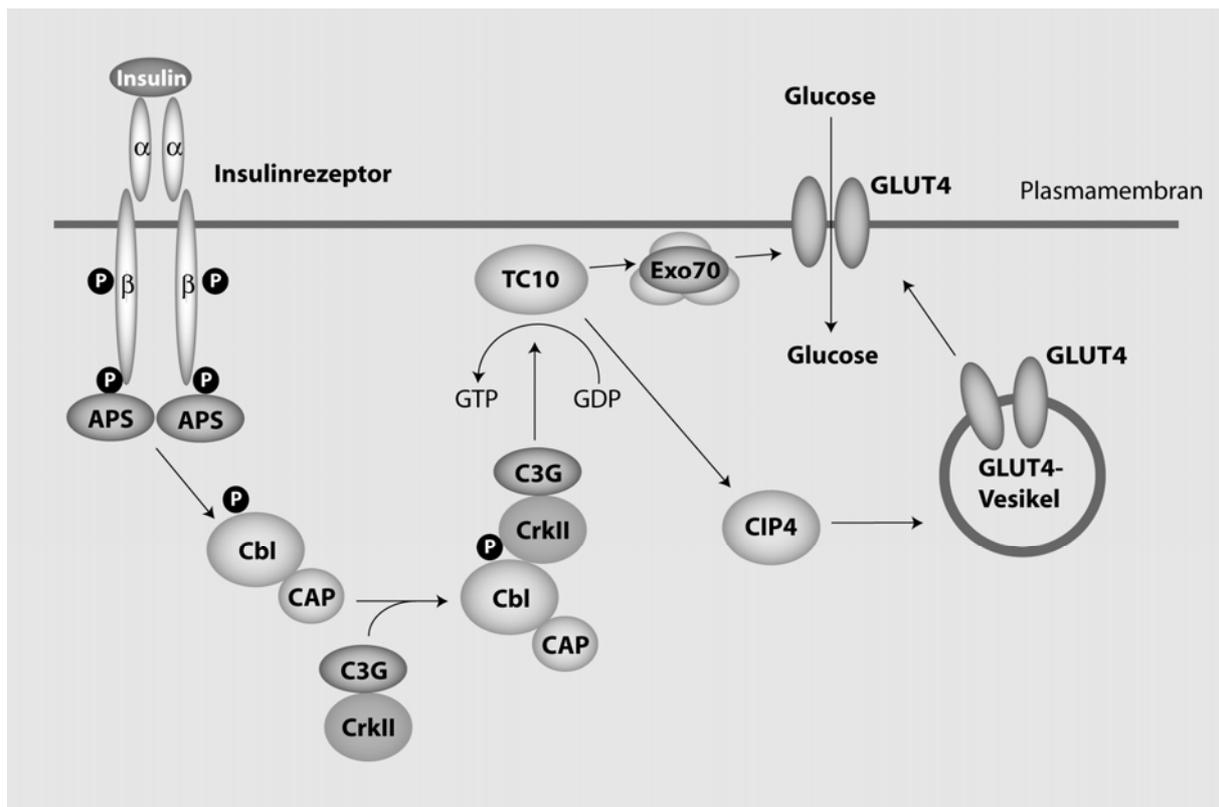


Abb. 1.3 : Schematische Darstellung des Cbl/CAP-Signalweges. Nach Aktivierung durch Insulin bindet APS an den Insulinrezeptor. Cbl mit assoziiertem CAP wird phosphoryliert und bildet mit C3G und CrkII einen Komplex. C3G katalysiert die Aktivierung von TC10. Diese GTPase stimuliert über CIP4 die Translokation und über Exo70 die Fusion von GLUT4 mit der Plasmamembran.

CrkII ist außerdem über SH3-Domäne konstitutiv mit dem Guaninnukleotid-Austauschprotein C3G komplexiert (Knudsen et al., 1994). Nachdem es zusammen mit CrkII in die Lipid-Rafts transloziert ist, katalysiert C3G den Nukleotidaustausch der G-Proteine TC10 α und TC10 β , wodurch diese aktiviert werden (Chiang et al., 2001; Chiang et al., 2002). Die Lokalisation von TC10 in den Lipid-Raft-Domänen der Plasmamembran ist essentiell für seine Aktivierung durch Insulin (Watson et al., 2001). Überexpression einer dominant-negativen TC10-Variante inhibiert die insulinstimulierte Glucoseaufnahme und GLUT4-Translokation (Chiang et al., 2001; Chiang et al., 2002).

Nach seiner Aktivierung interagiert TC10 mit zahlreichen potentiellen Effektormolekülen. Eines davon ist eine Splicevariante des Adapterproteins CIP4. CIP4 enthält eine FCH-Domäne, zwei Coiled-coil-Domänen und eine SH3-Domäne. Die FCH-Domäne interagiert mit Mikrotubuli, die zweite Coiled-coil-Domäne interagiert mit TC10 in einer GTP-abhängigen Weise. CIP4 ist im Basalzustand im intrazellulären Kompartiment lokalisiert und transloziert nach einem Insulinstimulus zur Plasmamembran (Chang et al., 2002). Die Überexpression einer mutanten CIP4/2-Variante, die nicht mit TC10 binden kann, inhibiert

die insulinstimulierte GLUT4-Translokation. Darüber hinaus interagiert TC10 nach seiner Aktivierung auch mit Exo70, einer Komponente des Exozysten-Komplexes (Inoue et al., 2003). Es wird vermutet, dass der Exozysten-Komplex im Ankoppeln von sekretorischen Vesikeln an der Plasmamembran beteiligt ist. Die Überexpression einer mutierten Variante von Exo70 inhibiert die insulinstimulierte Glucoseaufnahme dadurch, dass sie die Fusion von GLUT4-enhaltenden Vesikeln mit der Plasmamembran verhindert (Inoue et al., 2003). Überexpression von wildtyp Exo70 erhöht im Gegensatz dazu die insulinstimulierte Glucoseaufnahme. Zusätzlich verstärkt wird die insulinstimulierte Glucoseaufnahme durch Überexpression von sec6 und sec8, beide Proteine sind Komponenten des Exozysten-Komplexes (Ewart et al., 2005).

Inzwischen ist bekannt, dass sich der PI3-Kinase- und der Cbl/CAP-Signalweg überschneiden. Nach der Aktivierung der atypischen PKCs durch die PDK1 unterhalb der PI3-Kinase, werden PKC λ und PKC ζ zu Lipid-Raft-Domänen in der Plasmamembran transloziert (Kanzaki et al., 2004). Diese Translokation wird durch TC10 vermittelt und durch Par3- und Par6-Proteine verwirklicht. Die atypischen PKCs stellen daher eine Bindestelle zwischen beiden Signalwegen dar.

1.4 Glucose-Transportproteine

Glucose stellt eine primäre Energiequelle in Mammalia dar. Sie wird entweder durch Nahrung in Form von Di- und Polysacchariden, welche anschließend in Glucose hydrolysiert werden, aufgenommen oder durch Synthese aus anderen Substraten in Organen, wie beispielsweise der Leber, synthetisiert. Um die zirkulierende Glucose in die Zielzellen zu bringen, werden membranständige Transportproteine benötigt.

Diese Glucosetransporter lassen sich in zwei strukturell und funktionell divergierende Gruppen trennen: (1.) die Na⁺-abhängigen Glucosetransporter der SGLT-Familie (SGLT: sodium-dependent glucose transporter) (Wright, 2001) und (2.) die Na⁺-unabhängigen Glucosetransporter der GLUT-Familie (GLUT: glucose transporter) (Mueckler, 1994; Joost & Thorens, 2001).

1.4.1 Na⁺-abhängige Glucosetransporter der SGLT-Familie

Die SGLT-Proteine transportieren Glucose und Galactose mit unterschiedlichen Affinitäten über aktive Transportmechanismen. Der von der Na⁺/K⁺-ATPase geschaffene Na⁺-Gradient wird hierbei für den Transport von Glucose ins Zellinnere entgegen seines Konzentrationsgradienten genutzt (Hediger et al., 1989). Diese Form des Glucosetransports findet durch die luminale Membran von Zellen, welche am Dünndarm und den proximalen Tubuli der Niere liegen, statt (Wood & Trayhurn, 2003).

1.4.2 Na⁺-unabhängige Glucosetransporter der GLUT-Familie

Die Glucosetransporter der GLUT-Familie nutzen den Diffusionsgradienten von Glucose und anderen Zuckern zum Energie-unabhängigen Transport durch die Plasmamembran und zeigen unterschiedliche Substratspezifitäten, kinetische Eigenschaften und Expressionsprofile auf. Die Proteine dieser Familie besitzen zwölf transmembrane Regionen, sowohl der C- als auch der N-Terminus liegen intrazellulär. Die Aminosäuresequenzen der humanen GLUT-Proteine besitzen im Vergleich untereinander eine Homologie von 28 bis 65 % und tragen eine für GLUT-Proteine spezifische Signatur (Joost & Thorens, 2001). Diese besteht aus mehreren konservierten Glycin- und Tryptophan-Resten, von welchen man annimmt, dass sie essentiell für den erleichterten Transport von Glucose durch GLUT-Proteine sind. Basierend auf funktionellen und sequenzspezifischen Gemeinsamkeiten sind die GLUT-Proteine in drei Klassen unterteilt.

Klasse I der GLUT-Proteine

Die Klasse I der GLUT-Familie beinhaltet die Proteine GLUT1-4. GLUT1 ist ubiquitär, am stärksten aber im Gehirn, den Endothelzellen an der Blut-Hirn-Schranke, und Erythrozyten exprimiert (Mueckler et al., 1997; Vannucci et al., 1997). Eine geringe Expression findet in Fett- und Muskelgewebe und der Leber statt. Dort dient es der basalen Grundversorgung der Zelle mit Glucose (Mueckler et al., 1985; Birnbaum et al., 1986; Fukumoto et al., 1988). GLUT2 besitzt eine nur geringe Affinität gegenüber Glucose und wird hauptsächlich in den pankreatischen β -Zellen exprimiert, darüber hinaus noch in der Leber und den Nieren (Olson & Pessin, 1996). In β -Zellen dient GLUT2 als Glucose-Sensor, in der Leber ermöglicht es den bidirektionalen Transport von Glucose unter hormoneller Kontrolle.

Transporter	Expressionsort	Insulin-sensitivität	Substrate	Erstbeschreibungen
GLUT1	Erythrozyten, Gehirn, ubiquitär	Nein	Glucose	Mueckler, 1985; Gould, 1991
GLUT2	Leber, Pankreas, Darm, Nieren	Nein	Glucose < Fructose	Fukumoto, 1988; Gould, 1991
GLUT3	Gehirn	Nein	Glucose	Kayano, 1988; Gould, 1991
GLUT4	Herz- u. Skelettmuskel, weißes u. braunes Fettgewebe	Ja	Glucose	Fukumoto, 1989; James, 1989
GLUT5	Darm, Hoden, Nieren	Nein	Glucose << Fructose	Kayano, 1990; Davidson, 1992
GLUT6	Gehirn, Milz, Leukozyten	Nein	Glucose	Doege, 2000; Lisinski, 2001
GLUT7	unbekannt	unbekannt	unbekannt	Joost & Thorens, 2001
GLUT8	Hoden, Gehirn, Fettgewebe	Nein	Glucose	Doege, 2000; Lisinski, 2000; Ibberson, 2000
GLUT9	Leber, Niere	unbekannt	unbekannt	Phay, 2000
GLUT10	Leber, Pankreas	Nein	Glucose	Dawson, 2001; McVie-Wylie, 2001
GLUT11	Herz- u. Skelettmuskel	Nein	Glucose < Fructose	Doege, 2001; Sasaki, 2001
GLUT12	Herz- u. Skelettmuskel, Prostata Dünndarm, weißes Fettgewebe	Ja	unbekannt	Rogers, 2002
HMIT	Gehirn	unbekannt	H ⁺ -Myoinositol	Uldry, 2001

Klasse I
 Klasse II
 Klasse III

Tab. 1.1 : Klassifizierung der Na⁺-unabhängigen Glucosetransporter der GLUT-Familie (variiert nach Wood & Trayhurn, 2003).

GLUT3 besitzt eine starke Affinität für Glucose und ist hauptsächlich im Gehirn exprimiert. Zusammen mit GLUT1 ermöglicht GLUT3 den Glucosetransport durch die Blut-Hirn-Schranke in Neuronen (Vannucci et al., 1997). Der insulininsensitive Glucosetransporter GLUT4 ist in Herz- und Skelettmuskel, sowie im Fettgewebe stark exprimiert (Birnbaum, 1989; Charron et al., 1989; Fukumoto et al., 1989; James et al., 1989). Seine Funktion besteht darin, den postprandial erhöhten Glucosespiegel zu senken, indem es Glucose in insulininsensitive Zellen transportiert (Goodyear et al., 1991; Slot et al., 1991; Marette et al., 1992). Unter basalen Bedingungen ist GLUT4 hauptsächlich in spezialisierten intrazellulären Kompartimenten sequestriert (Bryant et al., 2002). Globale oder gewebspezifische GLUT4-Knockout-Modelle der Maus zeigen unterschiedlich starke Phänotypen, die dem Typ 2-Diabetes zugeordnet werden können (Katz et al., 1995; Stenbit et al., 1997; Abel et al., 2001).

Klasse II der GLUT-Proteine

Zu dieser Klasse gehören die Glucosetransporter GLUT5, GLUT7, GLUT9 und GLUT11. GLUT5 wird hauptsächlich im Dünndarm, Hoden und Nieren exprimiert. GLUT7 wurde bisher nur als Gen nachgewiesen, in welchen Geweben es exprimiert wird ist unbekannt (Joost & Thorens, 2001). GLUT9 wird in Leber und Niere exprimiert. Von GLUT11 sind

zwei Splicevarianten beschrieben worden, welche gewebsspezifisch exprimiert werden (Doege et al., 2001; Sasaki et al., 2001). Die Kurzform von GLUT11 besitzt eine geringe Affinität gegenüber Glucose und wird hauptsächlich in Herz- und Skelettmuskel exprimiert (Doege et al., 2001). Die Langform von GLUT11 ist nicht im Herz- und Skelettmuskel, dafür aber in Leber, Lunge und Gehirn exprimiert. Beide Isoformen besitzen eine hohe Affinität gegenüber Fructose, welches möglicherweise das Hauptsubstrat von GLUT11 darstellt.

Klasse III der GLUT-Proteine

Die dritte Klasse der GLUT-Proteine besteht aus GLUT6, GLUT8, GLUT10, GLUT12 und HMIT. Eine Charakteristik dieser Klasse ist die Lokalisation der typischen Glycosylierungsseite auf der neunten Schleife. Diese Glycosylierungsseite, welche in GLUT1 funktionslos ist (Asano et al., 1991), befindet sich in den beiden anderen Klassen auf der ersten Schleife. Die intrazelluläre Lokalisation von GLUT6 und GLUT8 wird über Dileucin-Motive nahe ihrer N-Termini reguliert, beide Proteine translozieren nach einem Insulinstimulus aber nicht zur Plasmamembran (Lisinski et al., 2001). GLUT6 wird in der Milz, Leukozyten und dem Gehirn exprimiert, GLUT8 in den Hoden, Gehirn und Fettgewebe (Doege et al., 2000; Ibberson et al., 2000). GLUT10 wird in insulinsensitiven Geweben wie Herz- und Skelettmuskel, der Leber und dem Pankreas exprimiert (Dawson et al., 2001; McVie-Wylie et al., 2001). GLUT12 wird im Herzmuskel, Dünndarm, Prostata und weiteren insulinsensitiven Geweben exprimiert (Rogers et al., 2002). HMIT (H⁺-gebundener Myo-Inositol-Transporter) wird hauptsächlich im Gehirn exprimiert (Uldry et al., 2001).

1.5 Der insulinsensitive Glucosetransporter GLUT4

Um den postprandial erhöhten Blutzucker wieder auf eine physiologische Konzentration zu senken, wird unter anderem im Skelettmuskel Glucose in die Zellen aufgenommen (DeFronzo et al., 1981). Mechanistisch geschieht dies durch eine insulinstimulierte verstärkte Translokation von GLUT4 zur Plasmamembran (Birnbaum, 1989; Charron et al., 1989; Fukumoto et al., 1989; James et al., 1989). Neben Skelettmuskel zählen auch Herzmuskel und das Fettgewebe zu den Geweben, welche nach Insulinausschüttung Glucose verstärkt in die Zellen aufnehmen (Cushman & Wardzala, 1980; Suzuki & Kono, 1980).

Insulin scheint dabei nicht nur die Translokation von GLUT4 zur Plasmamembran, sondern auch dessen intrinsische Transportaktivität zu regulieren (Furtado et al., 2002). Neben

GLUT4 wird in Skelettmuskelzellen auch GLUT1 exprimiert (Zorzano et al., 1996), in humanen Skelettmuskelzellen zusätzlich noch der Fructosetransporter GLUT5 (Hundal et al., 1992). GLUT4 ist ebenso der primäre Glucosetransporter in Skelettmuskelzellen der Spezies Ratte, nur 5 bis 10 % der gesamten Glucosetransporter ist hier GLUT1 (Marette et al., 1992). In diabetischen db/db-Mäusen, welche eine Mutation im für den Leptin-Rezeptor kodierenden Gen tragen, kann durch Überexpression des humanen GLUT4-Gens in Muskel- und Fettgewebe das Auftreten einer Insulinresistenz und eines Diabetes verhindert werden (Brozinick et al., 2001). Im Gegensatz dazu führt allerdings ein homozygotes Ausschalten des GLUT4-Gens in Mäusen nicht zwangsläufig zu einer Insulinresistenz (Katz et al., 1995). Die Tiere haben zwar eine verminderte Lebenserwartung, sind wachstumsgestört und zeigen Gewebsveränderung in Herz- und Fettgewebe, sie zeigen allerdings nur schwache Defekte in der Glucosehomöostase und sind nicht diabetisch.

Bei einem heterozygoten Ausschalten des GLUT4-Gens zeigt sich eine starke muskuläre Insulinresistenz, sowie Hyperinsulinämie und Hyperglykämie (Stenbit et al., 1997; Kubota et al., 2000). Es ist daher zu vermuten, dass in der homozygoten Knockout-Maus andere GLUT-Isoformen die Funktion des GLUT4 übernehmen (Wallberg-Henriksson & Zierath, 2001).

1.5.1 Intrazelluläre Speicherkompartimente und Exozytose des GLUT4

Unter basalen Bedingungen sind ca. 90 % des GLUT4 in intrazellulären Speicherkompartimenten lokalisiert, nur 4 bis 10 % befinden sich in der Plasmamembran (Satoh et al., 1993; Li & McNeill, 2001). Obwohl er konstitutiv zwischen der Plasmamembran und intrazellulären Membranen zirkuliert, wird dieses Verhältnis durch verstärkte Endozytose und nur geringer Exozytose beibehalten. Unter diesen Bedingungen ist GLUT4 in tubulovesikulären Strukturen in der perinukleären Region und in bestimmten Bereichen des Zytosols lokalisiert (Slot et al., 1991; Malide et al., 2000). Perinukleärer GLUT4 ist zum Teil mit Markerproteinen des endosomalen Recyclingkompartiments (ERC), dem Golgi-Komplex und dem *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) kolokalisiert (Bryant et al., 2002; Ploug & Ralston, 2002).

Man geht von zwei großen GLUT4-Speichern aus: der mit dem ERC-Marker Transferrin-Rezeptor (TfR) überlappende Speicher, der neben GLUT4 auch GLUT1 enthält, und der nicht mit dem ERC-überlappende GLUT4-Speicher, welcher zuerst von Insulin mobilisiert wird (Martin et al., 1996; Zeigerer et al., 2002; Kessler et al., 2000). Der von Insulin mobilisierbare

GLUT4-Speicher wird als Spezialisiertes Kompartiment (SC) oder GLUT4-Speichervesikel (GSV) bezeichnet. Nach einer Stimulation mit Insulin wird zum einen die Exozytose des GLUT4 aus dem SC/GSV zur Plasmamembran gesteigert (Bryant et al., 2002; Rudich & Klip, 2003), zum anderen aber auch die Endozytose leicht inhibiert (Jhun et al., 1992; Yang & Holman, 1993; Czech & Buxton, 1993). Die Steigerung der GLUT4-Exozytose führt zu einer 10- bis 20-fach erhöhten Präsenz des GLUT4 an der Plasmamembran. Im Vergleich zu anderen Proteinen, die nach einem Insulinstimulus vesikulär zur Plasmamembran verschoben werden, konnte gezeigt werden, dass die insulinsensitiven GLUT4-Speicher sich von diesen Vesikeln unterscheiden (Barr et al., 1997; Millar et al., 2000). Allerdings scheint GLUT4 noch in weiteren endosomalen Membranfraktionen zu finden zu sein (Kandror & Pilch, 1998).

Nach der insulinstimulierten Translokation zur Plasmamembran wird GLUT4 über endosomale Kompartimente und das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) in die insulinsensitiven Speicherkompartimente zurückgeführt (Watson et al., 2004). Der komplexe Zyklus des GLUT4 macht es schwer, zwischen insulinsensitivem Kompartiment und dem allgemeinen endosomalen Recyclingkompartiment als Speicherort für GLUT4 zu unterscheiden. Darüber hinaus scheinen noch weitere, zum Teil überlappende, insulinsensitive GLUT4-Speicherkompartimente zu existieren (Holman & Cushman, 1994; Ploug et al., 1998; Kupriyanova et al., 2002). Neben verschiedenen Proteinen, die mit GLUT4 in insulinsensitiven Speicherkompartimenten kolokalisieren, ist die insulinregulierte Aminopeptidase (IRAP) am besten untersucht (Mastick et al., 1994; Kandror et al., 1994; Keller, 2003). IRAP ist ein Typ II integrales Membranprotein, dessen N-Terminus ins Zytoplasma ragt und C-Terminus extrazellulär vorliegt. Die zytoplasmatische Region des IRAP beinhaltet Dileucin- und azidische Motive, die denen im C-Terminus des GLUT4 ähneln (Shewan et al., 2000). Nach einer Stimulation mit Insulin transloziert es zusammen mit GLUT4 zur Plasmamembran. Obwohl es offensichtlich die Retention von GLUT4-Vesikeln reguliert (Hosaka et al., 2005), kann es nicht einem bestimmten GLUT4-Speicher zugeordnet werden (Keller, 2003). Eine deutliche Verbindung zwischen IRAP und GLUT4 zeigen homozygote IRAP-Knockout-Mäuse auf. Die Tiere zeigen verringerte GLUT4-Expressionen in Skelett- und Herzmuskel sowie dem Fettgewebe, haben aber ansonsten eine normale Glucosehomöostase (Keller et al., 2002).

Die Lokalisation von GLUT4 in insulinsensitiven Kompartimenten wird über bestimmte Motive in der Aminosäuresequenz des GLUT4 bestimmt. Während GLUT4 im basalen Zustand zum Großteil in intrazellulären Speicherkompartimenten vorliegt, ist beispielsweise

GLUT1, dessen Aminosäuresequenz zu ca. 65 % identisch mit der des GLUT4 ist, hauptsächlich in der Plasmamembran zu finden. Diese Lokalisation des GLUT1 gilt sowohl im Basalzustand als auch im insulinstimulierten Zustand (Hudson et al., 1992). Beide Transporter unterliegen daher unterschiedlichen Zielausrichtungs- und Sortierprozessen.

Mutationen in einem N-terminalen FQQI-Motiv führen zu einer Akkumulation von GLUT4 an der Plasmamembran (Piper et al., 1993). Fügt man dieses Motiv jedoch in die Aminosäuresequenz von GLUT1 ein, wird dieses effizient von der Plasmamembran weg in intrazelluläre Kompartimente verschoben. Das Motiv ist daher offensichtlich wichtig für die Endozytose und Internalisierung des GLUT4 (Garippa et al., 1994; Al-Hasani et al., 2002). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass das FQQI-Motiv auch benötigt wird, um GLUT4 intrazellulär zu verschieben (Palacios et al., 2001; Melvin et al., 1999).

Zusätzlich zu dem N-terminalen FQQI-Motiv liegt C-terminal ein LL-Motiv, welches ebenso die Endozytose des GLUT4 steuert (Hudson et al., 1993; Garippa et al., 1996). Eine weitere Rolle spielt es beim Transport von GLUT4 aus dem TGN (Palacios et al., 2001; Subtil et al., 2000). Unterhalb des LL-Motivs liegt in GLUT4 ein TELEYLGP-Motiv, welches den Transport von GLUT4 von den Endosomen zu Unterdomänen des TGN steuert, welches erhöhte Mengen der t-SNARE-Proteine Syntaxin 6 und 16 enthält (Shewan et al., 2000; Shewan et al., 2003).

1.5.2 Rolle des Zytoskeletts in der GLUT4-Translokation

Es ist generell anerkannt, dass das Zytoskelett eine wichtige Rolle in der Translokation von Proteinen und der Fixierung von Organellen an bestimmten Punkten in der Zelle spielt (Terada & Hirokawa, 2000; Stammes, 2002; Schafer, 2002). Im Falle des GLUT4 konnte gezeigt werden, dass durch Zerstörung von Mikrotubuli oder Actin-Filamenten durch chemische Agenzien die Integrität von GLUT4-Speicherkompartimenten gestört (Guilherme et al., 2000; Patki et al., 2001) und die insulininduzierte Glucoseaufnahme sowie GLUT4-Translokation verschlechtert wird (Kanzaki & Pessin, 2001; Tong et al., 2001; Emoto et al., 2001). Darüber hinaus haben zahlreiche Studien die Bedeutung des Actin-Zytoskeletts für die akuten metabolischen Effekte des Insulins (Molero et al., 2001; Shigematsu et al., 2002) und den Einfluss der PI3-Kinase- und Cbl/CAP-Signalwege auf die Organisation des Zytoskeletts gezeigt (Martin et al., 1996; Kanzaki & Pessin, 2002).

Monomeres globuläres Actin (G-Actin) ist hoch konserviert und der größte Bestandteil des Zytoskeletts in Zellen von Vertebraten. G-Actin polymerisiert zu filamentartigem Actin (F-Actin) (Welch & Mullins, 2002). Zurzeit sind über 150 mit Actin interagierende Proteine identifiziert, welche die Organisation des Zytoskeletts direkt oder indirekt beeinflussen (Etienne-Manneville & Hall, 2002; Jeng & Welch, 2001; Qualmann & Kessels, 2002). Dazu zählen beispielsweise Wachstumsfaktoren wie Insulin. Räumliche und zeitliche Regulation der dynamischen Umstellungen des Actin-Zytoskeletts spielen wichtige Rollen in Zellfunktionen wie Motilität, Chemotaxis, Zytokinese, Phagozytose und intrazellulären Vesikeltransport, sowie in Zellpolarität und -differenzierung.

Wie oben bereits erwähnt, inhibieren Reagenzien, die die Polymerisation des Actin auflösen, die insulinstimulierte Glucoseaufnahme und GLUT4-Translokation. Bei beiden Prozessen spielt die von Insulin induzierte Neuorientierung der Actinfilamente eine entscheidende Rolle (Kanzaki & Pessin, 2001; Omata et al., 2000). Die Notwendigkeit der Actin-Dynamiken zeigen Beobachtungen des Motorproteins Myosin-Ic (Myo1c), welches für die insulinstimulierte GLUT4-Translokation benötigt wird (Bose et al., 2002). Überexpression von Myo1c verstärkt dabei die insulinabhängige GLUT4-Translokation, während eine dominant-negative Variante des Myo1c diesen Prozess inhibiert.

Ein weiteres Strukturprotein, dass an der GLUT4-Translokation beteiligt ist, ist das Tubulin (Guilherme et al., 2000; Patki et al., 2001; Emoto et al., 2001). Die Isoformen α - und β -Tubulin formen die Mikrotubuli, welche Organelle und Vesikel intrazellulär transportieren können (Rogers & Gelfand, 2000; Terada & Hirokawa, 2000). Inhibierung der Motorproteine von Mikrotubuli, dem Dynein und Kinesin, resultiert in verminderter GLUT4-Translokation (Guilherme et al., 2000; Emoto et al., 2001), unter den Kinesinen wurden in diesem Zusammenhang das KIF5b und KIF3 als Modulatoren der GLUT4-Exozytose identifiziert (Imamura et al., 2003; Semiz et al., 2003). In diesem Zusammenhang wurde außerdem festgestellt, dass Dynein zusammen mit der Rab-GTPase Rab5 einen Einfluss auf die Endozytose des GLUT4 ausübt (Huang et al., 2001).

GLUT4-Vesikel scheinen daher durch Motorproteine entlang des Actin-Zytoskeletts und der Mikrotubuli, welche sich nach Stimulation mit Insulin neu orientieren, an die Plasmamembran transportiert zu werden.

1.5.3 Anlagerung und Fusion von GLUT4-Vesikeln mit der Plasmamembran

In *in vitro* Experimenten zur Rekonstitution des Golgi-Transportes wurden unter anderem zwei zytosolische Proteine identifiziert, welche mechanistische Komponenten der Vesikelfusion darstellen. Dabei handelt es sich um das N-Ethylmaleimid-sensitive Fusionsprotein (NSF) und die löslichen NSF-Befestigungsproteine (SNAPs) (Calakos & Scheller, 1996). Ihre membrangebundenen Bindungspartner sind die SNAP-Rezeptoren (SNAREs). In Abhängigkeit der Lokalisation wird zwischen vesikulären v-SNAREs und in den Zielmembranen integrierten t-SNAREs unterschieden. GLUT4-Vesikel enthalten unter anderem das v-SNARE VAMP2 (Vesikel assoziiertes Membranprotein 2, auch Synaptobrevin 2) (Randhawa et al., 2000). Während der Anlagerung von GLUT4 an die Plasmamembran interagiert VAMP2 mit seinem Pendant in der Plasmamembran, dem t-SNARE Syntaxin 4 (Watson et al., 2004).

SNARE-assoziierte Proteine wie Munc18c, das Syntaxin 4-interagierende Protein (Synip) und NSF sind dabei an der Anlagerung und Fusion der GLUT4-Vesikel mit der Plasmamembran beteiligt und im Gegensatz zu den SNARE-Proteinen selbst auch Ziel insulinabhängiger Phosphorylierung (Thurmond & Pessin, 2000; Chen et al., 2005). Ein heterozygotes Ausschalten von Syntaxin 4 führt zu einer Inhibierung der insulinstimulierten GLUT4-Translokation (Yang et al., 2001).

Im Basalzustand ist Munc18c an den N-Terminus des t-SNAREs Syntaxin 4 gebunden und verhindert dadurch dessen Interaktion mit dem v-SNARE VAMP2 (Thurmond et al., 1998; Kanda et al., 2005). Durch einen Insulinstimulus wird Munc18c unter anderem durch die Bindung der PKC ζ vom Syntaxin 4 abgelöst (Hodgkinson et al., 2005) und Syntaxin 4 durch die Rab-GTPase Rab4 aktiviert (Li et al., 2001).

Unter dem Zusammenspiel mit weiteren Proteinen wie SNAP23, SNAP25 und Tomosyn können schließlich GLUT4-Vesikel mit der Plasmamembran fusionieren (Rea et al., 1998; Min et al., 1999; Widberg et al., 2003). Neben der Aktivierung und/oder Inhibierung bestimmter Proteine zur Fusion von GLUT4-Vesikeln mit der Plasmamembran, verringert Insulin auch die Geschwindigkeit, mit der GLUT4-Vesikel konstitutiv unter der Plasmamembran zirkulieren und erhöht auch dadurch die Anlagerungs- und Fusionsereignisse (Lizunov et al., 2005).

1.5.4 Endozytose von GLUT4

Während Insulin die Exozytoserate von GLUT4 steigert, verringert es gleichzeitig die Endozytoserate um den Faktor 2-3 (Czech, 1995; Holman & Cushman, 1994; Kandror & Pilch, 1996). Dieser zweite Effekt wird unter anderem auf die Inhibierung der Rab-GTPase Rab5 zurückgeführt (Huang et al., 2001). Es wird angenommen, dass GLUT4 über Clathrin-überzogene Membraneinstülpungen internalisiert wird; dies wurde sowohl durch Immunofluoreszenz- und Elektronenmikroskopie (Robinson et al., 1992; Slot et al., 1991), als auch durch Hemmung der Clathrin-vermittelten Endozytose gezeigt, welche die GLUT4-Internalisierung verhindert (Garippa et al., 1996; Nishimura et al., 1993).

Der Mechanismus, wie aus Clathrin-überzogenen Membraneinstülpungen freie Vesikel gebildet werden, ist unklar. Inzwischen weiß man, dass die GTPase Dynamin dabei eine Rolle spielt. Sie trägt N-terminal ihre GTPasen-Domäne, C-terminal eine Prolin-reiche Region und in der Mitte eine PH-Domäne (Muhlberg et al., 1997). Aus Studien in *D. melanogaster* ist bekannt, dass Dynamin die Ränder von Membraneinstülpungen vor der Vesikelbildung spiralförmig flankiert (van der Bliek & Meyerowitz, 1991). Das Einbringen einer Mutation in dieses Protein resultierte in der Inhibierung der Endozytose in einer späten Phase, in der die Membran durchtrennt und Vesikel freigesetzt werden (Kosaka & Ikeda, 1983; McNiven, 1998). Neben der Annahme, dass die Anlagerung des Dynamins funktionell das Durchtrennen der Membran zur Folge hat (McNiven et al., 2000), wird vermutet, dass Dynamin als GTPase akzessorisch Effektorproteine, wie beispielsweise Endophilin, bindet, welche dann die Formierung und Freisetzung von Vesikeln katalysieren (Ringstad et al., 1999).

Die Internalisierung des GLUT4 kann aber auch durch Überexpression einer Mutante des Caveolin-3 reduziert werden (Cohen et al., 2003). Dies zeigt, dass GLUT4 sowohl über Clathrin-überzogene Membraneinstülpungen, als auch über Kaveolen internalisiert wird. In Muskelzellen erreicht internalisiertes GLUT4 nach ca. zwei Minuten die frühen Endosomen (EE) und ca. 15 Minuten später das ERC (Dugani & Klip, 2005). Insulin beschleunigt die Transportrate von GLUT4 durch das ERC in einer Akt- und PIKfyve-abhängigen Weise (Foster et al., 2001; Berwick et al., 2004). Die Beschleunigung dieser Umsatzrate könnte die Verstärkung der GLUT4-Exozytose durch Insulin begründen.

Auch die Internalisierung des GLUT4 findet entlang des Zytoskeletts statt. Proteine mit Eps15-Homologie-Domäne (EHD-Proteine) oder EHD-Protein-bindende Proteine (EHDBP) spielen dabei eine wesentliche Rolle. EHD2 und sein Bindungspartner EHDBP1 kolokalisieren mit Actin-Filamenten, ein Ausschalten dieser Proteine verringert die

Endozytose von GLUT4 (Guilherme et al., 2004). Dass in der GLUT4-Endozytose, ähnlich wie bei der GLUT4-Exozytose, auch Rab-GTPasen eine funktionelle Rolle spielen, zeigt die Interaktion des Rab11a-Effektorproteins Rab11-FIP2 sowohl mit EHD1 als auch mit EHD3 (Naslavsky et al., 2006).

1.6 Transport von langkettigen Fettsäuren

1.6.1 Allgemeines zur Aufnahme von langkettigen Fettsäuren

Die Aufnahme von langkettigen Fettsäuren (LCFAs, long chain fatty acids) ist essentiell für viele zelluläre Funktionen. Neben ihrer Bedeutung als Energiequelle werden LCFAs als strukturelle Komponente in verschiedenen Lipiden und Proteinen benötigt und spielen auch in Signalprozessen und der Gentranskription eine Rolle (Simopoulos, 2002; Yamashita et al., 1997; Pegorier et al., 2004; Grimaldi et al., 1992). In insulinresistenten, adipösen Zucker-Ratten ist die myokardiale Aufnahme von LCFAs erhöht (Coort et al., 2004; Luiken et al., 2001). Die erhöhte LCFA-Aufnahme ist dabei mit der erhöhten Präsenz des Fettsäuretransporters FAT/CD36 in der Plasmamembran verbunden. Darüber hinaus konnte in adipösen, in insulinresistenten und in Typ 2-Diabetikern gezeigt werden, dass Lipide im Herz akkumulieren (Zhou et al., 2000; Christoffersen et al., 2003; Atkinson et al., 2003).

Bei der Aufnahme von Fettsäuren lässt sich zwischen dem Transport über zelluläre Membrankompartimente und dem Transport durch Proteine unterscheiden (Eehalt et al., 2006). Bei den Membrankompartimenten handelt es sich um Mikrodomänen mit Lipidzusammensetzungen, die sich von der normalen Plasmamembran stark unterscheiden (Rietveld & Simons, 1998; Simons & Eehalt, 2002). Diese sogenannten Lipid-Rafts bestehen in der äußeren Schicht der Doppelmembran aus Sphingolipiden und Cholesterol und in der inneren Schicht aus Phospholipiden und Cholesterol. Durch die stärkere Sättigung der Sphingo- und Phospholipide sind diese Kompartimente dichter gepackt und stärker geordnet als die umgebende Plasmamembran (Brown & London, 1998).

Der Fettsäuretransporter FAT/CD36 ist hauptsächlich in Lipid-Rafts lokalisiert (Pfeiffer et al., 2001; Zeng et al., 2003; Pohl et al., 2005). Entfernung von Cholesterol durch Methyl- β -Cyclodextrin führt zu einer reversiblen Senkung der LCFA-Aufnahme (Pohl et al., 2004). Diese Reduktion ist genauso stark wie bei einer Inkubation mit Sulfo-N-Succinimidyloleat (SSO), einem spezifischen FAT/CD36-Inhibitor. Da der kombinierte Einsatz beider

Verbindungen keine additiven Effekte hat wird angenommen, dass es sich um den gleichen Mechanismus handelt (Pohl et al., 2005). Zusätzlich gibt es in Mammalia die Familie der Fettsäuren-Transportproteine (FATP, fatty acid transport protein), deren sechs Mitglieder gewebsspezifisch exprimiert werden (Stahl, 2004; Hirsch et al., 1998). FATP1 ist hauptsächlich in Fettgewebe und Herzmuskel zu finden, aber nicht in der Leber. Im Gegensatz dazu wird FATP5 hauptsächlich in der Leber exprimiert. FATP4 ist das einzige FATP-Mitglied, welches in Enterozyten exprimiert und daher als einziger intestinaler Fettsäuretransporter angesehen wird (Stahl et al., 1999). FATPs und FAT/CD36 sind in unterschiedlichen Membrankompartimenten zu finden (Pohl et al., 2005). Während FAT/CD36 hauptsächlich in den Lipid-Raft-Domänen zu finden ist, ist die Lokalisation der FATPs nicht eindeutig (Stahl et al., 2001; Watkins et al., 1999; Pei et al., 2004).

1.6.2 Der Fettsäuretransporter FAT/CD36

Die cDNA der Fettsäuren-Translokase (FAT) wurde 1993 erstmalig aus Ratten-Adipozyten isoliert (Abumrad et al., 1993). Da die Aminosäuresequenz zu 85 % identisch mit der des humanen Glycoproteins IV (CD36) ist, wird das Protein FAT/CD36 genannt. Die 472-AS lange Sequenz ergibt ein Protein von 53 kDa, durch starke Glycosylierung hat es aber ein apparentes Molekulargewicht von 88 kDa. Wie GLUT4 ist FAT/CD36 sowohl in intrazellulären Speicherkompartimenten als auch in der Plasmamembran lokalisiert (Glatz et al., 2001; Müller et al., 2002). In Kardiomyozyten wurde eine starke Korrelation der LCFA-Aufnahme mit der Anwesenheit von FAT/CD36 in der Plasmamembran festgestellt (Luiken et al., 2002).

Neben FAT/CD36 vermittelt auch das 43 kDa große Fettsäuren-Bindeprotein (FABPpm, fatty acid binding protein) den direkten Transport von LCFA durch Akkumulation in der Plasmamembran (Stremmel et al., 1985; Ibrahimi & Abumrad, 2002). Durch Inhibition mit einem spezifischen Antikörper gegen FABPpm kann der LCFA-Transport durch die Plasmamembran verringert werden (Luiken et al., 1999). Die Kombination des FAT/CD36 Inhibitors SSO mit einem anti-FABPpm Antikörper zeigt keine additiven Effekte, es wird daher angenommen, dass FAT/CD36 in Verbindung mit FABPpm den Mechanismus zur Aufnahme von LCFA darstellt. Ein Mechanismus, der FAT/CD36 aus intrazellulären Kompartimenten in die Plasmamembran verschiebt und die Aufnahme von LCFA erhöht, ist in Kardiomyozyten die Kontraktion (Luiken et al., 2001). Dieser Mechanismus konnte auch

für GLUT4 gezeigt werden (Till et al., 1997; Russell et al., 1999). Ein weiterer Mechanismus der beiden Metabolit-Transporter gemein ist, ist die insulinabhängige Translokation. Wie in Kapitel 1.6.1 für GLUT4 bereits beschrieben, führt dieser Stimulus in Abhängigkeit der PI3-Kinase auch zur Translokation von FAT/CD36 und damit verbundener LCFA-Aufnahme (Luiken et al., 2002).

1.7 Die Familie der Kleinen Rab-GTPasen

Die Rab-GTPasen sind eine von fünf Familien die der Superfamilie der Ras-GTPasen zugeordnet werden. Zu dieser Superfamilie gehören im Menschen über 150 Proteine mit einer Größe zwischen 20 und 40 kDa, von denen evolutionär konservierte Orthologe auch in *Drosophila*, *C. elegans* und anderen Arten gefunden wurden (Colicelli, 2004). Zu der Superfamilie der Ras-GTPasen gehören die zuerst beschriebenen und namensgebenden onkogenen Ras Proteine und die GTPasen der Rho-, Rab-, Ran- und Arf-Familie (Wennerberg et al., 2005). Kleine GTPasen besitzen einen biochemischen Mechanismus zur Umsetzung von GTP zu GDP und agieren in zahlreichen biologischen Prozessen in Funktion eines molekularen Schalters (Vetter & Wittinghofer, 2001) (s. Kapitel 1.7.1).

Rab-GTPasen (Rab: Ras-like proteins in the brain) stellen mit über 60 Mitgliedern die größte Familie der Ras-Superfamilie dar (Pereira-Leal & Seabra, 2001). Sie regulieren intrazellulären Vesikeltransport und den Transport von Proteinen zwischen verschiedenen Organellen der endozytotischen und sekretorischen Signalwege (Zerial & McBride, 2001). Dabei steuern sie die Bildung und Abtrennung von Vesikeln aus deren Donor-Kompartiment, ihren Transport zum Akzeptor-Kompartiment, sowie die anschließende Fusion damit. Die Lokalisation der Rab-GTPasen ist dabei spezifisch für ihre Funktion, abhängig vom GTP-Bindungsstatus und der Anwesenheit von Regulator- oder Effektorproteinen ändern sie ihre intrazelluläre Lokalisation und Funktion (Zerial & McBride, 2001).

1.7.1 Biochemischer Mechanismus und Regulation der Ras-GTPasen

Die Proteine der Superfamilie der Ras-GTPasen funktionieren als GTP/GDP-regulierte molekulare Schalter (Vetter & Wittinghofer, 2001). Alle haben fünf GDP/GTP-Bindungsmotive: G1 (GXXXXGKS/T), G2 (T), G3 (DXXGQ/H/T), G4 (T/NKXD) und G5 (C/SAK/L/T) (Bourne et al., 1991). Diese fünf G-Motive bilden zusammen eine G-Domäne

Familie	Mitglieder	Funktion	Referenz
Ras	u.a. Ras, Rap, Ral	Onkogenese, Genexpression und Zellproliferation, Tumor-Suppression	Repasky et al., 2004 Colicelli, 2004
Rho	u.a. RhoA, Rac1, CDC42	Aktin-Organisation, Zellzyklus und Genexpression, Exo- und Endozytose	Etienne-Manneville & Hall, 2002 Ridley, 2001
Rab	u.a. Rab4, Rab11, Ypt1	intrazellulärer Vesikel- und Proteintransport, Exo- und Endozytose	Pereira-Leal & Seabra, 2001 Zerial & McBride, 2001
Ran	Ran	RNA- u. Proteintransport zw. Nukleus und Zytosol	Weis, 2003
Arf	u.a. Arf1, Arf6, Sar1	Bildung von Vesikeln und Vesikeltransport	Memon, 2004

Tab. 1.2 : Familien der Ras-GTPasen-Superfamilie.

von ca. 20 kDa, deren konservierte Strukturen in allen Ras-Familien und auch anderen G-Proteinen zu finden sind (Wennerberg et al., 2005). Um in Membranen integrieren zu können, werden GTPasen spezifisch an der C-terminalen Membran-Zielsequenz posttranslational mit Lipidresten modifiziert. Dabei katalysieren die Farnesyltransferase und die Geranylgeranyltransferase I die kovalente Bindung von Farnesyl- bzw. Geranylgeranyl-Isoprenoid an das C-terminale Erkennungsmotiv CAAX (Cox & Der, 2002).

Rab-GTPasen werden an für diese Familie spezifischen cysteinhaltigen Erkennungsmotiven (CC, CXC, CCX, CCXX, CCXXX) durch die Geranylgeranyltransferase II modifiziert, andere GTPasen werden nicht mittels Lipiden modifiziert und sind dennoch membranständig, weitere werden weder modifiziert noch membranassoziiert (Wennerberg et al., 2005). Ras-GTPasen besitzen eine hohe Affinität gegenüber GDP und GTP, haben aber nur eine schwache intrinsische Aktivität zur Hydrolyse von GTP und zum GDP/GTP-Austausch. Der GDP/GTP-Zyklus wird von mehreren Regulatorproteinen gesteuert. Dabei katalysieren Guaninnukleotid-Austausch-Faktoren (GEFs, guanine-nucleotide-exchange factors) die Bildung der aktiven, GTP-gebunden Form (Schmidt & Hall, 2002) und GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) die Steigerung der intrinsischen GTPase-Aktivität zur Hydrolyse des GTP zur Bildung der inaktiven GDP-gebundenen Form (Bernards & Settleman, 2004).

GTPasen einer Familie haben dabei sowohl ubiquitäre als auch spezifische GAPs und GEFs. Rho- und Rab-GTPasen werden zusätzlich über Guaninnukleotid-Dissoziations-Inhibitoren (GDIs) reguliert, welche die Prenyl-Modifikation am C-Terminus verdecken und dadurch die zytosolische Verteilung dieser GTPasen fördern (Seabra & Wasmeier, 2004). Um dann einen Nukleotidaustausch zu ermöglichen, wird das GDI durch einen GDI-Dissoziations-Faktor (GDF) verdrängt (Soldati et al., 1994; Ullrich et al., 1994).

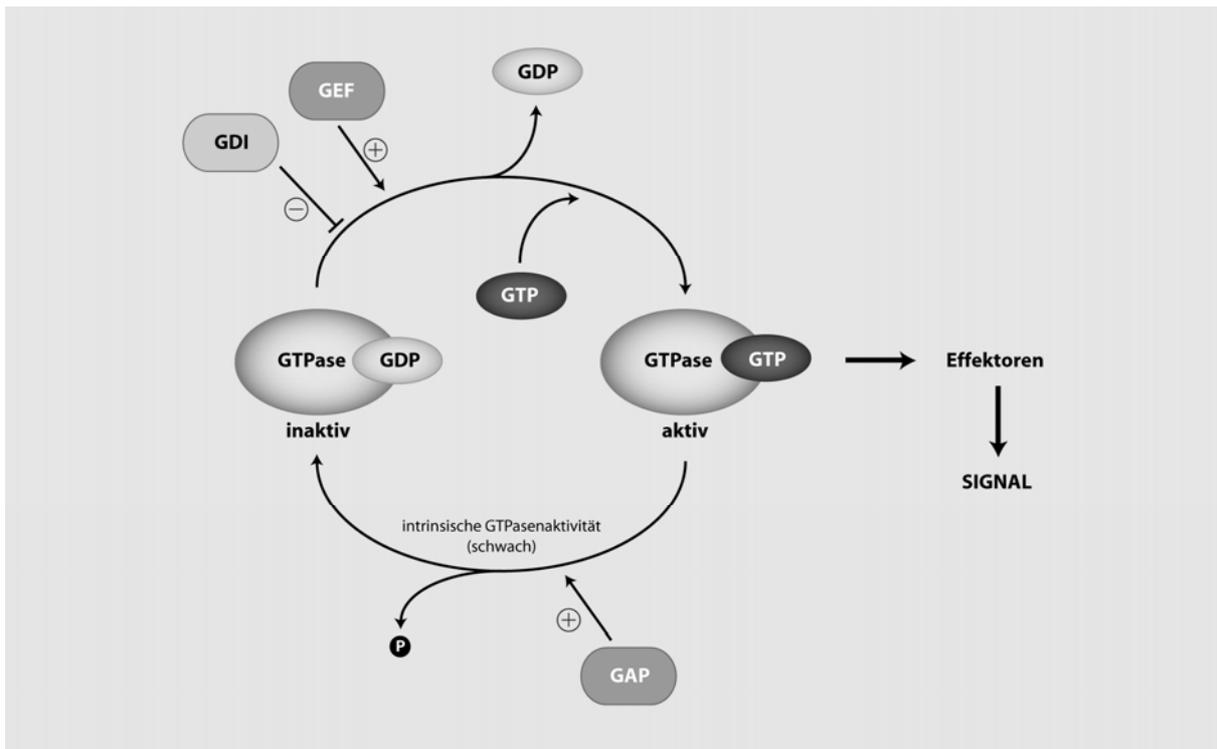


Abb. 1.5 : Regulation der Aktivität von Ras-GTPasen (variiert nach Cormont & Le Marchand-Brustel, 2001).

Damit neu synthetisierte Rab-GTPasen an Membranen angelagert werden können, benötigen sie mindestens eine C-terminale Geranylgeranyl-Gruppe (Seabra, 2000). Um für diese Modifikation durch die Rab-Geranylgeranyl-Transferase (RGGT) erkannt zu werden, muss das Rab-Protein mit einem Rab-Eskort-Protein (REP) assoziiert sein (Andres et al., 1993). Zusätzlich zu dieser Modifikation wird die Rab-GTPase durch das REP zur Zielmembran geführt (Alexandrov et al., 1994).

1.7.2 Rab-GTPasen und Vesikeltransport

Der Transport von Proteinen in Form von Vesikeln von einer zellulären Membran zu einer anderen lässt sich in vier Schritte unterteilen. Im ersten Schritt werden Vesikel oder Tubuli geformt, welche die zu transportierende Fracht tragen (Palade, 1975; Kartberg et al., 2005). Diese werden über Motorproteine entlang von Aktin-Filamenten oder Mikrotubuli im zweiten Schritt zu ihrer Zielmembran transportiert. Im dritten Schritt lagern sich die Vesikel über Interaktion mit Anlagerungsfaktoren an um im letzten Schritt durch SNARE-Proteine mit der Zielmembran zu fusionieren. An allen diesen Schritten sind Rab-GTPasen beteiligt (Grosshans et al., 2006).

Vesikelbildung an der Donormembran

Bereits im ersten Schritt des Vesikeltransports, der Vesikelbildung, spielen Rab-GTPasen eine Rolle. Während der Knospung von COPII-Vesikeln im ER vermittelt Rab1-GTP die Assoziation der Vesikel an einen SNARE-Komplex, welcher für die Anlagerung an die Zielmembran, dem Golgi-Komplex, benötigt wird (Allan et al., 2000).

Für Rab5 konnte gezeigt werden, dass es in permeabilisierten Zellen den Transferrin-Rezeptor (TfR) in Clathrin-überzogenen Membraneinstülpungen sequestriert, wo es dann zur Vesikelbildung und Internalisierung kommt (McLauchlan et al., 1998). Rab9 ist hauptsächlich in späten Endosomen lokalisiert, wo es zusammen mit seinem Effektor TIP47 den Transport von Mannose-6-Phosphat zum TGN reguliert (Diaz & Pfeffer, 1998; Lombardi et al., 1993). TIP47 bildet mit Rab9 und dem Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (MPR) einen ternären Komplex, welcher für den Transport zwischen Endosomen und TGN benötigt wird (Carroll et al., 2001). In diesem Komplex steigert Rab9 die Bindung von TIP47 an die Endosomen und die Assoziation des zu transportierenden MPR.

Bewegung entlang der Aktinfilamente und Mikrotubuli

Intrazellulärer Vesikeltransport wird über zwei Netzwerke vermittelt. Während über Aktinfilamente eher kurze und langsame Transportwege ablaufen, werden Vesikel über längere Distanzen in der Zelle schnell entlang von Mikrotubuli transportiert (Jordens et al., 2005). Transport entlang der Aktin-Filamente wird über Motorproteine der Myosin-Familie vermittelt (Tuxworth & Titus, 2000). Diese Motorproteine bestehen aus einer Schwanz-Domäne, welche die zu transportierende Fracht bindet und einem Motor-Kopf, welcher sich entlang der Filamente bewegen kann (Berg et al., 2001).

Das Rab-GTPasen auch die Bewegung von Vesikeln durch Motorproteine entlang des Aktin-Zytoskeletts regulieren, wurde zuerst für Sec4 und das Motorprotein Myosin-V gezeigt (Govindan et al., 1995; Wagner et al., 2002). Rab3d reguliert im exokrinen Pankreas den Vesikeltransport entlang des Aktin-Zytoskeletts an ihre Bindungsstelle in der apikalen Zelloberfläche (Valentijn et al., 2000).

Rab8 kann das Aktin-Zytoskelett reorganisieren und reguliert den Aktin-vermittelten Transport vom TGN zur Plasmamembran in polarisierten Epithelzellen (Peränen et al., 1996; Hattula & Peränen, 2000). Zusätzlich ist Rab8 zusammen mit Myosin-Vc am Transferrin-Recycling beteiligt (Rodriguez & Cheney, 2002). Ein weiteres nicht konventionelles Myosin, das Myosin-Vb, interagiert direkt mit Rab11, welches das Recycling von frühen Endosomen (EE, early endosome) reguliert (Lapierre et al., 2001). Es konnte in diesem Zusammenhang

gezeigt werden, dass die Überexpression einer dominant negativen Deletionsmutante des Myosin-Vb das Transferrin-Recycling inhibiert, was für eine Beteiligung von Rab11 am Aktin-vermittelten Recycling früher Endosomen spricht. Von mehreren Rab11-Effektoren konnte gezeigt werden, dass sie mit Myosin-Vb kolokalisieren (Hales et al., 2001; Prekeris et al., 2001), für Rab11-FIP2 konnte allerdings eine direkte Interaktion mit Myosin-Vb gezeigt werden (Hales et al., 2002). Rab11-FIP2 scheint dabei als Adapter zwischen dem Motorprotein und Rab11 zu fungieren. In pankreatischen β -Zellen ist Rab27 zusammen mit Granophilin an der Exozytose Insulin ausschüttender Granula beteiligt (Wang et al., 1999; Yi et al., 2002).

Die längeren Transportwege entlang der Mikrotubuli werden von Motorproteinen der Kinesin- und Dynein-Familie vermittelt. Der Transport früher Endosomen über Mikrotubuli wird unter anderem über Rab5 reguliert (Nielsen et al., 1999), Rab4 bindet an die zytoplasmatische leichte Kette von Dynein-Proteinen (Bielli et al., 2001). Am retrograden Vesikeltransport von frühen Endosomen über den Golgi-Komplex hin zum endoplasmatischen Retikulum ist beispielsweise Rab6a und sein Effektor Rabkinesin6 beteiligt (Mallard et al., 2002; White et al., 1999; Echard et al., 1998). Rab7 ist im späten endozytotischen Kompartiment, darunter auch in Lysosomen lokalisiert (Bucci et al., 2000; Chavrier et al., 1990). Neben der Regulation des Transports zwischen frühen und späten Endosomen (Feng et al., 1995; Press et al., 1998) wird angenommen, dass Rab7 die Fusion später Endosomen und Lysosomen reguliert (Bucci et al., 1994; Lebrand et al., 2002).

Anlagerung von Vesikeln an der Zielmembran

Ein Proteinkomplex in der Zielmembran erkennt, wenn ein spezifisches Transportvesikel die Membran erreicht (Pfeffer, 2001; Whyte & Munro, 2002). Nach der Erkennung wird das Vesikel durch den Proteinkomplex an die Zielmembran herangeführt. Obwohl SNARE-Proteine die Mediatoren der Membranfusion darstellen, legen experimentelle Daten nahe, dass sie nicht die Anlagerung regulieren. Zum einen sind SNARE-Proteine nicht in den Regionen konzentriert, in denen die Anlagerung stattfindet (Garcia et al., 1995), zum anderen verhindern Neurotoxine zwar die SNARE-Komplex-Bildung, aber nicht die Vesikel-Anlagerung (Broadie et al., 1995). Außerdem wird vermutet, dass die SNARE-Komplexe zu klein sind, um die Entfernung zwischen Vesikel und Zielmembran im initialen Schritt überbrücken zu können (Sutton et al., 1998). Einige der bisher identifizierten Anlagerungsfaktoren binden an Rab-Proteine wie Rab5 und Rab22 (Kauppi et al., 2002; Simonsen et al., 1998), sowie Rab5 und Rab4 (Nagelkerken et al., 2000; Vitale et al., 1998).

1.8 Regulation des GLUT4-Transports durch Rab-GTPasen

Wie bereits in Kapitel 1.6 beschrieben wurde, führt die Ausschüttung von Insulin dazu, dass in insulinempfindlichen Geweben der Glucosetransporter GLUT4 aus intrazellulären Speicherkompartimenten in die Plasmamembran verschoben wird. Generell basiert diese Verschiebung auf einer verstärkten Exozytose- und einer reduzierten Endozytoserate (Czech & Corvera, 1999; Olefsky, 1999; Pessin et al., 1999).

1.8.1 Rab4

Die GTPase Rab4 kolokalisiert mit GLUT4 in mikrosomalen Fraktionen geringer Dichte in Adipozyten und Myozyten (Cormont et al., 1993; Aledo et al., 1995) und wird nach einem Insulinstimulus mit GLUT4 an die Plasmamembran verschoben (Uphues et al., 1995). Die Arbeitsgruppe um Imamura identifizierte Rab4 als Hauptregulator der GLUT4-Exozytose (Imamura et al., 2003). In diesem Zusammenhang wurde festgestellt, dass GTP-beladenes Rab4 mit dem Kinesin KIF3b interagiert. Die in 3T3-L1 Adipozyten durchgeführten Versuche zeigten außerdem, dass Rab4 sowohl über die PI3-Kinase als auch über PKC γ aktiviert wird und dass diese Aktivierung die Bindung des KIF3b verstärkt. Insulin verstärkt zusätzlich in Abhängigkeit der PI3-Kinase und PKC γ die Bindung von KIF3b an Mikrotubuli; da die Mikrotubulus-Assoziation von KIF3b vermutlich über Phosphorylierung vermittelt wird, wird vermutet, dass KIF3b ein Substrat der erwähnten Kinasen ist (Reilein et al., 1998). Die insulinstimulierte GLUT4-Exozytose wird durch Überexpression von Rab4-Deletionsmutanten inhibiert (Knight et al., 2000; Shibata, 1996). Außerdem ist bekannt, dass Rab4 direkt mit Syntaxin4 interagiert und die SNARE-Interaktionen GTP-abhängig reguliert (Li et al., 2001).

1.8.2 Rab5

Eine Komponente der GLUT4-Endozytose ist Rab5 (Huang et al., 2001). Rab5 kann mit Dynein kopräzipitiert werden, nach einer Stimulation mit Insulin verringert sich die Menge an GTP-beladenem Rab5, es wird inaktiviert. Dies geht einher mit verringerter Dynein-Assoziation und Dynein-Mikrotubuli-Interaktion. Auch vom Dynein ist bekannt, dass es

Substrat für Kinasen ist; eine Phosphorylierung hat hier allerdings im Gegensatz zu KIF3b einen negativen Einfluss auf die Interaktion mit Mikrotubuli (Vaughan et al., 2002).

1.8.3 Rab11a

Rab11 spielt generell eine Rolle im Protein-Recycling von Endosomen zur Plasmamembran (Ullrich et al., 1996), darüber hinaus wurde Rab11 als Regulator von weiteren Prozessen wie der Phagozytose (Cox et al., 2000), des apikalen Transports in Epithelzellen (Wang et al., 2000) und des Proteintransports von frühen Endosomen zum TGN identifiziert (Wilcke et al., 2000). Aktuelle Daten zeigen, dass auch ACRP30, besser bekannt als Adiponektin, Rab11-abhängig von 3T3-L1-Adipozyten sezerniert wird (Clarke et al., 2006). Neben der α -Isoform des Rab11 sind des weiteren Rab11b und das nur in Epithelzellen exprimierte Rab25 als Rab11-Isoformen bekannt (Bock et al., 2001; Goldenring et al., 1996). Rab11a besteht aus 216 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 24 kDa.

In primären Kardiomyozyten konnte gezeigt werden, dass Rab11a ebenfalls mit GLUT4 in insulinsensitiven Kompartimenten kolokalisiert ist und nach einem Insulinstimulus zusammen mit dem Glucosetransporter an die Plasmamembran verschoben wird (Uphues et al., 1994; Kessler et al., 2000). Während die Menge des Rab4 an GLUT4-Vesikeln nach einem Insulinstimulus abnimmt (Cormont et al., 1993), ist die Assoziation von Rab11a an GLUT4-Vesikeln jedoch erhöht (Kessler et al., 2000).

Die beobachtete Translokation von Rab11a an die Plasmamembran ließ sich nicht in Kardiomyozyten aus insulinresistenten Ratten zeigen. Anhand von Überexpressionsexperimenten mit wildtyp Rab11a und einer dominant negativen Variante (N124I) wird angenommen, dass Rab11a sowohl die Exo- als auch die Endozytose des GLUT4 regulieren kann (Uhlig et al., 2005). Es wird zudem postuliert, dass Rab11a für den endosomalen Transport von GLUT4 in spezialisierte insulinsensitive Kompartimente benötigt wird (Zeigerer et al., 2002).

Parallel zu den GLUT4-Vesikeln wurde Rab11a auch in FAT/CD36-Vesikeln festgestellt (Müller et al., 2002). In dieser Vesikelpopulation führte ein Insulinstimulus allerdings weder zu einer erhöhten Rab11a-Assoziation noch zur Translokation in die Plasmamembran.

1.9 Spezifische Effektorproteine der Rab-GTPasen

1.9.1 Allgemeine Bedeutung der Rab-Effektorproteine

Wie bereits in Kapitel 1.7.1 erwähnt, besitzen die über 60 in Mammalia bekannten Rab-GTPasen eine hohe Homologie in ihren ca. 20 kDa großen G-Domänen, welche bei einer Gesamtgröße von durchschnittlich 25 kDa 80 Prozent ausmachen. Um die hohe Zahl von Rab-GTPasen dennoch spezifisch zu regulieren, müssen Effektorproteine eine hohe Spezifität gegenüber ihrer assoziierten Rab-GTPase besitzen.

Neben den bereits erwähnten Effektoren, welche den GTP/GDP-Zyklus steuern, werden weitere benötigt, welche die zelluläre Lokalisation steuern und damit die Funktion der Rab-GTPase und deren Interaktion mit weiteren Proteinen, wie z.B. Motorproteinen oder Anlagerungs-Faktoren, regulieren. Wie anhand von Röntgenstrukturanalysen und Bindungsversuchen gezeigt werden konnte, binden diese Effektorproteine hauptsächlich an den konservierten G-Domänen, wodurch ihre Spezifität gegenüber einer oder mehrerer Rab-GTPasen verdeutlicht wird (Ostermeier & Brunger, 1999; Fukuda, 2003). Welche Effektorproteine an eine Rab-GTPase binden, hängt vor allem von ihrem Nukleotid-Bindungsstatus ab (Peden et al., 2004).

1.9.2 Effektorproteine des Rab11a

Im Zusammenhang mit seiner Vielzahl an Funktionen wurden bereits zahlreiche Rab11-Effektorproteine identifiziert, welche die unterschiedlichen Funktionen des Rab11 regulieren (Meyers & Prekeris, 2002). Für den Transport des Transferrin-Rezeptors in die Recycling Endosomen (RE) durch Rab11 wurde Rab11BP/Rabphilin-11 als Effektorprotein des Rab11 identifiziert (Mammoto et al., 1999; Zeng et al., 1999).

Rab11BP/Rabphilin-11 scheint dabei bevorzugt GTP-Rab11 zu binden und kolokalisiert mit Rab11 im TGN und in Recycling-Endosomen. Weitere Rab11-Effektorproteine wurden in der Familie der Rab11-interagierenden Proteine (FIP, family of Rab11-interacting proteins) zusammengefasst (Wallace et al., 2002; Lindsay et al., 2002; Prekeris et al., 2001). Obwohl sie nur eine geringe Gesamthomologie besitzen, tragen sie alle am C-terminalen Ende eine konservierte Rab11-Bindedomäne (RBD) (Prekeris et al., 2001). Die 20 Aminosäuren

umfassende RBD bildet eine α -helikale Struktur, in der konservierte Aminosäuren eine hydrophobe, Rab11-bindende Tasche formen (Meyers & Prekeris, 2002; Peden et al., 2004). *In vitro* konkurrieren die FIPs um die Bindung von Rab11 und bilden *in vivo* definierte Komplexe mit Rab11. Die Bildung dieser exklusiven Komplexe reguliert letztendlich die intrazelluläre Lokalisation und die Bindungspartner des Rab11.

Anhand ihrer Sequenzhomologie werden die Mitglieder der Familie der Rab11-interagierenden Proteine in drei Klassen unterteilt (Peden et al., 2004). Die Mitglieder der Klasse-I-FIPs sind Rip11, RCP (Rab coupling protein) und Rab11-FIP2; sie stellen die am besten untersuchte FIP-Klasse dar und sind durch eine N-terminal liegende C2-Domäne gekennzeichnet. Zu den Klasse-II-FIPs gehören Rab11-FIP3/Eferin und Rab11-FIP4, diese Proteine tragen zwei EF-Domänen und eine Prolin-reiche Region. Die Klasse-III der FIPs hat bisher nur ein einziges Mitglied, Rab11-FIP1, welches keine Homologie zu bekannten Protein-Domänen besitzt. Kalorimetrische Messungen haben gezeigt, dass FIPs *in vitro* sowohl GDP- als auch GTP-beladenes Rab11 binden, die Bindungsaffinitäten zum Rab11-GDP allerdings so gering sind, dass sie *in vivo* nicht vorkommen (Junutula et al., 2004). Für die GTP-abhängige Bindung der FIPs an Rab11 ist neben der hydrophoben Tasche in der RBD bei Rip11 auch das Tyr⁶²⁸ von Bedeutung.

Es wird vermutet, dass FIPs Homodimere bilden, welche dann zwei Rab11-Moleküle binden und so ein Heterotetramer formen (Junutula et al., 2004). Die Interaktion zwischen den FIPs findet über ein ERM-Motiv (ERM: Ezrin-Radixin-Moesin) statt, welches auch die RBD beinhaltet (Wallace et al., 2002).

Die Phospholipid-bindende C2-Domäne der Klasse-I-FIPs ist bedeutend für deren Lokalisation (Lindsay & McCaffrey, 2004). Diese C2-Domäne ist unter anderem in der PI3-Kinase und in der Protein Kinase C vorhanden (Cho, 2001). Nach Stimulation mit Phosphatidylinositol-(3,4,5)-tri-Phosphat (PIP₃) oder Phosphatidsäuren werden Proteine der Klasse-I-FIPs durch ihre C2-Domäne aus perinuklearen Regionen der Zelle an die Plasmamembran verlagert, ein Verlust der C2-Domäne inhibiert diese Translokation (Lindsay & McCaffrey, 2004a).

Rip11

Rip11 (Rip: Rab11-interagierendes Protein) ist stark in polarisierten Epithelzellen exprimiert und in subapikalen Recycling-Endosomen lokalisiert (Prekeris et al., 2000). Rip11 kolokalisiert mit Rab11 an endosomalen Membranen, die Assoziation an die Membran findet

auch in diesem Fall über die C2-Domäne statt. Für Rip11 konnte allerdings gezeigt werden, dass die Membranassoziation auch mit einer Dephosphorylierung einhergeht. Zumindest *in vitro* konnte Rip11 nicht zwischen den Isoformen Rab11a und Rab11b unterscheiden, erst durch Genrepression beider Isoformen wird die Membranständigkeit von Rip11 inhibiert (Junutula et al., 2004).

Rab11-FIP2

Rab11-FIP2 reguliert u.a. das Recycling des Transferrin-Rezeptors (Lindsay & McCaffrey, 2002) und fungiert, wie bereits erwähnt, als Adapterprotein für eine direkte Interaktion von Rab11 mit dem Motorprotein Myosin-Vb (Hales et al., 2002). Myosin-Vb wird als Komponente des Plasmamembran-Recycling-Systems in nichtpolarisierten Zellen und des apikalen Recycling-Systems in polarisierten Zellen betrachtet (Lapierre et al., 2001). Der gleiche trimere Komplex aus Rab11, Rab11-FIP2 und Myosin-Vb ist auch an der Internalisierung des Chemokinrezeptors CXCR2 beteiligt (Fan et al., 2004). Die Bindung von Rab11 und damit verbundene Transportprozesse werden durch eine sterische Veränderung in der C-terminalen Region des Rab11-FIP2 ermöglicht (Wei et al., 2006).

Dass Rab11-FIP2 an den frühesten Schritten des endosomalen Transports beteiligt ist, zeigt seine Interaktion mit EHD-Proteinen (EHD: Eps15-Homologie-Domäne) (Naslavsky et al., 2006). EHD1 und EHD3 binden Rab11-FIP2 über dessen NPF-Motiv. Eine Genrepression von NHD3 verhindert nicht nur die Internalisierung des Transferrin-Rezeptors und den Transport früher Endosomen zum ERC, sondern verändert auch die intrazelluläre Lokalisation von Rab11 und Rab11-FIP2. EHD2 verbindet die von Clathrin vermittelte Endozytose mit dem Aktin-Zytoskelett (Guilherme et al., 2004) und interagiert auch direkt mit GLUT4-Vesikeln (Park et al., 2004).

RCP (Rab coupling protein)

Das Rab11-Effektorprotein RCP reguliert das Recycling von Phagosomen in Makrophagen und endosomale Sortierprozesse des Transferrin-Rezeptors vom degradierenden zum Recycling-Kompartiment (Damiani et al., 2004; Peden et al., 2004). Es bindet neben Rab11 auch an GTP-beladenes Rab4 (Lindsay et al., 2002), allerdings ist nur Rab11 in der Lage, die intrazelluläre Lokalisation von RCP im Recycling-Kompartiment zu regulieren (Lindsay & McCaffrey, 2004b). RCP trägt zwischen der C2-Domäne und der RBD drei PEST (Prolin-Glutamat-Serin-Threonin) –Motive (Marie et al., 2005). Diese Sequenzen sind Ziele calciumabhängiger Proteasen, Calpaine und des Proteasom-Komplexes in proteolytischen

Transportwegen (Dice, 1987; Fukuda & Itoh, 2004; Spencer et al., 2004). Bei Deletion des PEST-Motivs oder Inkubation mit Calpain-Inhibitoren ist RCP verstärkt an der Plasmamembran lokalisiert (Marie et al., 2005). Es wird daher angenommen, dass RCP nach dem Transport vom Recycling-Kompartiment an die Plasmamembran durch Calpain-regulierte Proteolyse inaktiviert wird.

Rab11-FIP3 und -FIP4

Die beiden Proteine Rab11-FIP3 und -FIP4 sind keine reinen Rab11-Effektoren. Als Arfophilin-1 bzw. Arfophilin-2 sind sie ebenso als Effektoren der Arf-GTPasen Arf4, Arf5 und Arf6 bekannt (Shin et al., 1999; Shin et al., 2001; Hickson et al., 2003).

Sowohl Rab11-FIP3 als auch Rab11-FIP4 spielen eine Rolle in der Zytokinese (Wilson et al., 2005). Rab11-FIP3 wird dabei von Rab11 an Endosomen konzentriert, die sich während der Telophase in der Furchenregion akkumulieren. Genrepression von Rab11-FIP3 inhibiert daher die Zytokinese (Fielding et al., 2005). Exo70p, eine Komponente des Exozysten-Komplexes, ko-immunopräzipitiert mit Rab11-FIP3 und -FIP4. Es wird daher angenommen, dass Rab11-FIP3 und -FIP4 im Komplex mit Rab11 den Vesikeltransport von Recycling-Endosomen zur Spaltfurche während der Zytokinese steuern.

1.10 Ziel der Arbeit

Von Rab11a ist seit über zehn Jahren bekannt, dass es insulinabhängig in GLUT4-Vesikeln akkumuliert und zur Plasmamembran verschoben wird. Allerdings konnte noch immer nicht eindeutig geklärt werden, ob Rab11a dabei die Exo- oder die Endozytose reguliert. Dazu gehört auch die Frage, ob Rab11a durch Insulin aktiviert, also mit GTP beladen wird. Aus diesem Grund war ein Ziel dieser Arbeit, eine solche potentielle GTP-Beladung in der intakten Muskelzelle nachzuweisen und zu klären, auf welcher Ebene des Insulinsignals eine Aktivierung des Rab11a einzuordnen ist.

Mit einem neuartigen Ansatz, der siRNA-vermittelten Genrepression, sollte zudem in dieser Arbeit die Funktion des Rab11a im GLUT4-Vesikeltransport genauer definiert werden. Da in den meisten Publikationen kein Unterschied zwischen der a- und b-Isoform gemacht wird, gehörte dazu auch die Frage, ob die Bedeutung für die GLUT4-Translokation spezifisch dem Rab11a zugeordnet werden kann.

Da inzwischen bekannt ist, dass Rab-GTPasen über spezifische Effektorproteine reguliert werden, war es ebenso Ziel zu untersuchen, ob die Rab11-Effektorproteine Rip11 und Rab11-FIP2 die GLUT4-Translokation im Komplex mit Rab11a regulieren können. Da Rab11a nicht nur in GLUT4- sondern auch in FAT/CD36-Vesikeln nachgewiesen wurde, sollte zudem geklärt werden, ob Rab11a auch diese Vesikelpopulation auf eine ähnliche Weise wie die der GLUT4-Vesikel reguliert.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Fertigprodukte und Kits

2.1.1.1 Chemikalien

Agarose SeaKem LE	Biozym, Oldendorf
5-Aminoimidazol-4-carboxamid-1- β -Ribosid (AICAR)	Calbiochem, Darmstadt
Aminohexansäure	Sigma-Aldrich, Seelze
Amoniumpersulfat	Sigma-Aldrich, Seelze
bovines Serumalbumin (BSA)	AppliChem, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Butanol	Merck, Darmstadt
Calciumchloriddihydrat	Merck, Darmstadt
Dithiotreitol	Sigma-Aldrich, Seelze
Ethylendiamintetraessigsäure, EDTA	Sigma-Aldrich, Seelze
Ethanol	AppliChem, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd	AppliChem, Darmstadt
Formamid	AppliChem, Darmstadt
Glucose	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Glycerol	AppliChem, Darmstadt
GTP-[γ]-Azidoanilid-Biotin-longchain-Hydrazon	ALT Corp, Lexington/USA
Hydroxyethylpiperazinethaneschwefelsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich, Seelze
Insulin (Schwein)	Sigma-Aldrich, Seelze
Isopropanol	AppliChem, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt

Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
LB-Agar (Lennox L Agar)	Invitrogen, Karlsruhe
LB-Broth base (Lennox L Broth base)	Invitrogen, Karlsruhe
LY294002	Biosource, Camarillo/USA
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt
Magnesiumchloridhexahydrat	AppliChem, Darmstadt
Magnesiumsulfatheptahydrat	Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol	AppliChem, Darmstadt
Morpholinpropanschwefelsäure, MOPS	Sigma-Aldrich, Seelze
Natriumacetat	AppliChem, Darmstadt
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich, Seelze
Natriumdodecylsulfat	Serva, Heidelberg
Natriumfluorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphatdihydrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumvanadat (Na_3VO_4)	Merck, Darmstadt
Nonidet P40	Fluka, Seelze
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	AppliChem, Darmstadt
D-Sorbitol	Sigma-Aldrich, Seelze
Tetramethylethyldiamin, TEMED	Roth, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Seelze
Trypan-Blau	Serva, Heidelberg
Tween 20	AppliChem, Darmstadt

2.1.1.2 Fertigprodukte

Bio-Rad Reagenz, Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad, München
Complete Proteasen-Inhibitor-Cocktail	Roche Diagnostics, Mannheim

DMEM mit 1 g/l D-Glucose, 25 mM HEPES	Invitrogen, Karlsruhe
DNA-Größenstandards (100 bp und 1 kb)	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
ExcelGel SDS Buffer Strips	GE Healthcare, Uppsala/SE
fötales Kalberserum (FCS)	Invitrogen, Karlsruhe
FuGene 6	Roche Diagnostics, Mannheim
G418	Calbiochem, Darmstadt
GelBond PAGfilm	GE Healthcare, Uppsala/SE
F-12 Nutrient Mixture (Ham)	Invitrogen, Karlsruhe
Lipofectamin 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA)	Invitrogen, Karlsruhe
dNTPs	BD Biosciences, Heidelberg
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Phosphat-gepufferte Saline, PBS	Invitrogen, Karlsruhe
PBS ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Invitrogen, Karlsruhe
Protein-Größenstandard (7-175 kDa)	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
RNA-Größenstandard	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
RPMI	Invitrogen, Karlsruhe
SOC-Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin/EDTA	Invitrogen, Karlsruhe
UptiLight HRP ECL-Substrat	KMF, Lohmar

2.1.1.3 Kits

EndoFree Plasmid Maxi Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden
Site-Directed Mutagenesis Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Omniscript Reverse Transcription Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick PCR-Purification Kit	QIAGEN, Hilden
QuantiTect™ SYBR Green Kit	QIAGEN, Hilden
Plasmid Mini Kit	QIAGEN, Hilden
RNeasy® Mini Kits	QIAGEN, Hilden

2.1.2 Puffer und Medien

2.1.2.1 Molekularbiologische Puffer und Medien

TAE-Puffer	40 mM	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
	0,11 % (v/v)	Essigsäure konz.
	1 mM	EDTA
		in H ₂ O gelöst
10x DNA-Probenpuffer	0,05 % (w/v)	Bromphenolblau
	1 % (w/v)	Natriumdodecylsulfat
	30 % (w/v)	Glycerol
		in TAE-Puffer gelöst
Ethidiumbromid-Färbelösung	2,5 µg/ml	Ethidiumbromid
		in H ₂ O gelöst
FA-Gelpuffer	20 mM	MOPS
	5 mM	Natriumacetat
	1 mM	EDTA
	0,74 % (v/v)	Formaldehyd
		pH 7,0, gelöst in RNase freiem H ₂ O
5x RNA-Probenpuffer	0,2 % (v/v)	Bromphenolblau, gesättigt
	4 mM	EDTA
	9,5 % (v/v)	Formaldehyd
	20 % (v/v)	Glycerol
	30 % (v/v)	Formamid
	40 % (v/v)	10x FA-Gelpuffer
		gelöst in H ₂ O

2.1.2.2 Zellbiologische Puffer und Medien

Kulturmedium H9c2-hIR 500 ml DMEM m. 1 g/l D-Glucose, 25 mM HEPES
100 U/ml Penicillin
100 µg/ml Streptomycin
1x nicht-essentielle Aminosäuren NEAA
10 % (v/v) FCS (inaktiviert)
0,6 mg/ml G418

Transportpuffer 134 mM NaCl
5,4 mM KCl
1,8 mM CaCl₂ · 2 H₂O
0,8 mM MgSO₄ · 7 H₂O
20 mM HEPES
0,2 % BSA
gelöst in H₂O

2.1.2.3 Proteinanalytische Puffer

TBS 10 mM Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
0,1 M NaCl
gelöst in H₂O, pH 7,4

TBS-T 0,25 % (v/v) Tween 20
gelöst in TBS, pH 7,4

PBS 138 mM NaCl
2,7 mM KCl
8 mM Na₂HPO₄ · 2 H₂O
1,5 mM KH₂PO₄
gelöst in H₂O, pH 7,4

Lysepuffer Triton	50 mM	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
	0,5 % (v/v)	Triton X-100
	2 mM	MgCl ₂ ·6H ₂ O
	150 mM	NaCl
	2 % (v/v)	Complete Proteasen-Inhibitor-Cocktail
	1 mM	Na ₃ VO ₄
	1 mM	NaF
	1 mM	DTT
		gelöst in H ₂ O
6x Laemmli	0,375 M	Tris-HCl, pH 6.8
	12 % (w/v)	Na-Dodecylsulfat
	47,5 % (v/v)	Glycerin
	15 % (v/v)	Mercaptoethanol (od. 0,6 M Dithiothreitol)
	0,3 % (w/v)	Bromphenolblau
Anodenpuffer I	300 mM	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
	20 %	Methanol
		gelöst in H ₂ O
Anodenpuffer II	25 mM	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
	20 %	Methanol
		gelöst in H ₂ O
Kathodenpuffer	40 mM	Aminohexansäure
	0,01 %	Natriumdodecylsulfat
	20 %	Methanol
		gelöst in H ₂ O
Blockier-Lösung	5 % (w/v)	Magermilchpulver od. BSA
		gelöst in TBS-T, pH 7,4

2.1.3 Enzyme

Restriktionsendonukleasen

<i>Bst</i> XI (CCANNNNN NTGG)	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
<i>Eco</i> RI (G AATTC)	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
<i>Hind</i> III (A AGCTT)	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
<i>Nco</i> I (C CATGG)	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
<i>Nhe</i> I (G CTAGC)	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
<i>Not</i> I (GC GGCCGC)	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
<i>Pac</i> I (TTAAT TAA)	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
<i>Sal</i> I (G TCGAC)	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
<i>Sma</i> I (CCC GGG)	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
<i>Xho</i> I (C TCGAG)	New England Biolabs, Frankfurt a.M.

Polymerasen

<i>PfuTurbo</i> Hotstart DNA Polymerase	Stratagene, Heidelberg
<i>HotStarTaq</i> DNA Polymerase	QIAGEN, Hilden

Weitere molekularbiologische Enzyme

Alkalische Phosphatase, Shrimp	Roche Diagnostics, Mannheim
Antarctic Phosphatase	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
Benzonase Nuclease	Novagen, Darmstadt
Omniscript Reverse Transcriptase	QIAGEN, Hilden
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
T4 Polynucleotide Kinase	New England Biolabs, Frankfurt a.M.

2.1.4 Antikörper

Primäre Antikörper

Akt (Kaninchen)	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
phospho-Akt (Ser473, Kaninchen)	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
Biotin (Kaninchen)	Acris, Hiddenhausen
GLUT4 (C-20, Ziege)	Santa Cruz, Santa Cruz/USA
c-Myc (9E10, Maus)	Calbiochem, Darmstadt

HA Affinity Matrix	Roche Diagnostics, Mannheim
Murine CD36 (Maus)	Cascade Biosciences, Winchester/USA
Rab11 (Maus)	BD Biosciences, Heidelberg
Rab11-FIP2 (Kaninchen)	Dr. Rytis Prekeris, Univ. of Colorado/USA
Rip11 (Kaninchen)	Dr. Rytis Prekeris, Univ. of Colorado/USA
α -Tubulin (Maus)	Calbiochem, Darmstadt

Sekundäre Antikörper

Kaninchen IgG-HRP (Ziege)	Promega, Mannheim
Maus IgG-HRP (Ziege)	Promega, Mannheim
Maus Ig, [¹²⁵ I]-markiert	GE Healthcare, München
Ziege IgG-HRP (Esel)	Promega, Mannheim

2.1.5 Zellen

Prokaryotische Zellstämme

<i>E.coli</i> Top10	Invitrogen, Karlsruhe
XL1-Blue	Stratagene, La Jolla/USA

Eukaryotische Zelllinie

H9c2-hIR	Ratten-Kardiomyoblasten-Zelllinie basierend auf H9c2-Zellen, in deren Genom cDNA für den humanen Insulinrezeptor stabil integriert wurde (Uhlig et al., 2005)
----------	---

2.1.6 Geräte

Blotting-Apparatur LKB-Novablot, Amersham Biosciences, Freiburg
Brutschrank 6000 Heraeus, Hanau
Elektroporator Gene Pulser II, BioRad
Filmremover LKB, Amersham Biosciences, Freiburg
Geldokumentationssystem, LTF, Wasserburg
Horizontal-Elektrophoresekammer Agagel Midi, Biometra, Göttingen
Horizontal-Elektrophoresekammer Multiphor II, Amersham Biosciences, Freiburg

Kippschüttler Duomax 1000, Heidolph, Schwabach

Lumi-Imager, Roche Diagnostics, Mannheim

PCR-System Trio-Thermoblock™, Biometra, Göttingen

Realtime-PCR-System ABI PRISM® 7700 Thermocycler

Schüttelinkubator KS-15, Bühler, Tübingen

Spektrophotometer DU 650 / DU 7400, Beckman, München

Überkopfschüttler Reax 2, Heidolph, Schwabach

Universal-Gamma-Zähler 1282 Compugamma CS LKB, Wallac, Turku (FIN)

Wärmeschrank, Heraeus, Hanau

Zentrifuge RC 5B plus (Rotor: GSA / SS34), DuPont, Bad Homburg v.d.H.

Zentrifuge RotantaR (Rotor: 5094), Hettich, Tuttlingen

Zentrifuge Universal 30 RF (Rotor: 1412), Hettich, Tuttlingen

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR, „polymerase chain reaction“) ist ein Verfahren für die Amplifikation von DNA-Abschnitten. Dabei gliedert sich ein Zyklus in drei Schritte; zuerst erfolgt die Denaturierung des DNA-Doppelstranges, an die so hergestellten Einzelstränge können sich zwei synthetische Oligonukleotide (Primer) anlagern, welche komplementär zu den 3'-Enden der Zielregion der DNA-Einzelstränge sind. Die Hybridisierungstemperatur liegt in etwa 2°C unter der Schmelztemperatur (T_m) der Primer, die anhand folgender Formel berechnet werden kann:

$$T_m = (4 \cdot [G + C] + 2 \cdot [A + T]) \text{ } ^\circ\text{C}$$

Hierbei geben A, T, G und C die Anzahl der jeweiligen im Primer enthaltenen Basen an. Um eine unterschiedliche Effizienz der Hybridisierung zu vermeiden, sollten beide Primer eine annähernd gleiche Schmelztemperatur besitzen. Nach der Hybridisierung erfolgt die Komplementärstrangsynthese durch eine thermostabile DNA-Polymerase. Der typische Reaktionsansatz einer PCR in einem Volumen von 50 µl ist in Tabelle 2.1 und der schematische Ablauf in Tabelle 2.2 dargestellt.

Komponente	Eingesetzte Menge oder Endkonzentration
10x Reaktionspuffer	1x
MgCl ₂	0,5 - 5 mM
dNTP-Mix	jew. 0,2 mM
Primer vorwärts	10 pmol
Primer rückwärts	10 pmol
Taq-DNA-Polymerase	0,5 - 2,5 U
Template-DNA	1 - 500 ng

Tab. 2.1 : Typischer Reaktionsansatz einer Polymerasekettenreaktion. U: Einheiten. (Variiert nach Gangolf Schrimpf, Gentechnische Methoden, 2002).

Schritt	Bezeichnung	Temperatur (°C)	Zeit (min)	
1	initiale Denaturierung	95	3 - 5	
2	Denaturierung	95	0,5 - 1	
3	Primer-Hybridisierung	$T_m - 5$	0,5 - 1	25 - 35 Zyklen
4	Polymerisation	72	0,5 - 2 pro kb	
5	abschließende Polymerisation	72	5 - 10	

Tab. 2.2 : Schematischer Ablauf einer Polymerasekettenreaktion. T_m : berechnete Schmelztemperatur (Variiert nach Gangolf Schrimpf, Gentechnische Methoden, 2002).

2.2.2 Gerichtete-Mutagenese-PCR

Um in einer Plasmid-DNA ein bestimmtes DNA-Segment um eine oder mehrere Basen zu verändern, bedient man sich der *in vitro* Mutagenese-PCR. Dabei enthält ein synthetisches, zur Matrizen-DNA komplementäres Oligonukleotidpaar die gewünschte Mutation. Diese Mutagenese-Primer dienen nun in einer PCR-Reaktion als Primerpaar zur Neusynthese der zirkulären Plasmid-DNA und generieren dadurch Kopien der Ausgangs-DNA, die die gewünschte Mutation enthalten. Die Endonuklease *DpnI* schneidet spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA und wird dazu benutzt, die Ausgangs-DNA zu zerstören und somit nur die neu synthetisierte, mutierte Plasmid-DNA zu hinterlassen. Die meisten *E. coli* Stämme methylieren die von ihnen amplifizierte Plasmid-DNA, wodurch die Matrizen-DNA üblicherweise durch *DpnI*-Restriktion abgebaut werden kann. Dazu wird den Mutagenese-PCR-Ansätzen 10 U *DpnI* zugegeben und ca. 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird zur Amplifikation der neu synthetisierten Plasmid-DNA 1 μ l des *DpnI*-Restriktionsansatzes in XL1-Blue Zellen transformiert (2.1.5).

Komponente	Eingesetzte Menge oder Endkonzentration
10x Reaktionspuffer	1x
dNTP-Mix	jew. 0,2 mM
Mutagenese Primer vorwärts	10 pmol
Mutagenese Primer rückwärts	10 pmol
<i>PfuTurbo</i> -DNA-Polymerase	2,5 U
Template-DNA	5 - 50 ng

Tab. 2.3 : Typischer Reaktionsansatz einer Mutagenese-PCR. U: Einheiten.

Schritt	Bezeichnung	Temperatur (°C)	Zeit (min)
1	initiale Denaturierung	95	0,5
2	Denaturierung	95	0,5
3	Primer-Hybridisierung	55	1
4	Polymerisation	68	1 pro kb

Tab. 2.4 : Schematischer Ablauf einer Mutagenese-PCR. kb:Kilobasen.

2.2.3 Ligation von PCR-Fragmenten mit linearisierten Vektoren

Die Ligation ist die Verknüpfung eines DNA-Fragmentes mit einer linearisierten Plasmid-DNA. Das verwendete Enzym ist die T4-DNA-Ligase (2.1.3), welches die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einer 5'-Phosphat- und einer 3'-OH-Gruppe katalysiert.

In einem 10 µl Ligationsansatz wurden 1 µl Ligasepuffer (10x), 1 µl T4-DNA-Ligase (400 U/µl), 50 ng linearisierte Plasmid-DNA und eine entsprechende Menge der einzufügenden cDNA gegeben und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Enzym durch eine Inkubation von 20 Minuten bei 65°C hitzeinaktiviert. Zur Berechnung der einzusetzenden Menge an cDNA in der Ligationsreaktion wurde folgende Formel verwendet:

$$cDNA [ng] = \frac{cDNA [bp]}{Vektor [bp]} \cdot 50 \text{ ng Vektor}$$

Zur Amplifikation der ligierten Plasmid-DNA wurden 1-5 µl der Ligationsreaktion in *E. coli* Top10 Zellen transfiziert (2.1.5).

2.2.4 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien

Das Einbringen von artfremder Plasmid-DNA in Bakterien wird Transformation genannt. Diese Technik wird angewandt, um Plasmid-DNA beispielsweise nach einer Ligationsreaktion zu amplifizieren und später aufzureinigen.

Transformation in E.coli Top10

Zur Transformation wurde ein 50 µl Aliquot *E.coli* Top10 Zellen (2.1.5) auf Eis aufgetaut und anschließend 1-5 µl der Ligationsreaktion zugegeben und gemischt. Der Ansatz wurde 30 Minuten auf Eis inkubiert, anschließend 30 Sekunden in ein Wasserbad mit 42°C gehalten und dann kurz auf Eis platziert. Danach wurden 250 µl vorgewärmtes SOC-Medium (2.1.1.2) zugegeben und eine Stunde unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Nach der einstündigen Inkubation wurden 10 und 90 % des Transformationsansatzes auf LB-Agar-Platten mit dem entsprechenden Selektionsmarker ausplattiert und zur Kolonienbildung 16 Stunden bei 37°C inkubiert.

Transformation in E.coli XL1-Blue

Diese Zellen wurden verwendet, um *DpnI*-behandelte Ansätze der Mutagenese-PCR (2.2.2) zu amplifizieren.

Zur Transformation wurde ein 50 µl Aliquot *E.coli* XL1-Blue Zellen (2.1.5) auf Eis aufgetaut und anschließend 1 µl des *DpnI*-Restriktionsansatzes zugegeben und gemischt. Der Ansatz wurde 30 Minuten auf Eis inkubiert, anschließend 45 Sekunden in ein Wasserbad mit 42°C gehalten und dann zwei Minuten auf Eis platziert. Danach wurden 500 µl vorgewärmtes SOC-Medium (2.1.1.2) zugegeben und eine Stunde unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Nach der einstündigen Inkubation wurden 10 und 90 % des Transformationsansatzes auf LB-Agar-Platten mit dem entsprechenden Selektionsmarker ausplattiert und zur Kolonienbildung 16 Stunden bei 37°C inkubiert.

2.2.5 Aufreinigung von Plasmid-DNA

Plasmid-Minipräparation

Um geringe Mengen an Plasmid-DNA zur Identifikation positiver Klone nach einer Transformation aufzureinigen, wurden mehrere Kolonien einer LB-Agar-Platte gepickt und in jeweils 5 ml LB-Medium (2.1.1.1) mit entsprechendem Selektionsmarker gegeben. Die Ansätze wurden 16 Stunden bei 37°C unter Schütteln inkubiert und anschließend die Zellmasse aus 2 ml Kultur durch fünf Minuten Zentrifugation mit 16.000 x g gewonnen. Die enthaltene Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des QIAprep® Spin Miniprep Kits (2.1.1.3) nach Herstellerangaben aufgereinigt und in 50 µl destilliertem H₂O aufgenommen. Die hieraus gewonnene Plasmid-DNA wurde mittels Restriktionsanalyse (2.2.7) analysiert und bei

Identifikation eines positiven Klones mit 10 µl der entsprechenden 5 ml Kultur größere Kulturmengen angimpft.

Plasmid-Maxipräparation

Die Plasmid-Maxipräparation dient zur Aufreinigung von Plasmid-DNA in Mengen von mehr als 300 µg aus 100 - 200 ml Kulturansätzen. Hierfür wurde 100 bzw. 200 ml LB-Medium (2.1.1.1) mit entsprechendem Selektionsmarker mit 10 µl einer 5 ml Vorkultur angeimpft und 16 Stunden bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Zellmasse 15 Minuten mit 6.000 x g bei 4°C abzentrifugiert und die Plasmid-DNA mit Hilfe des EndoFree® Plasmid Maxi Kits (2.1.1.3) nach Herstellerangaben aufgereinigt und in 400 µl endotoxinfreiem TE-Puffer resuspendiert. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

2.2.6 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Aufreinigung von PCR-Fragmenten

Für die Aufreinigung von PCR-Fragmenten oder DNA aus enzymatischen Reaktionsansätzen wurde das QIAquick® PCR Purification Kit (2.1.1.3) verwendet. Die aufgereinigte DNA wurde anschließend in einem adäquaten Volumen H₂O oder EB-Puffer eluiert und bei -20°C gelagert.

Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Aufreinigung linearisierter Plasmid-DNA oder DNA-Fragmenten nach einer restriktionsendonukleolytischen Spaltung (2.2.7), kann die DNA durch eine Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (2.2.10) und aus dem Gel aufgereinigt werden. Dies geschah mit Hilfe des QIAquick® Gel Extraction Kits (2.1.1.3). Die aufgereinigte DNA wurde anschließend in einem adäquaten Volumen H₂O oder EB-Puffer eluiert und bei -20°C gelagert.

2.2.7 Restriktionsanalyse

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die in Bakterien die Funktion haben, artfremde DNA durch sequenzspezifische Spaltung zu zerstören. Die eigene DNA wird aufgrund von Methylierung der DNA am Cytosin (5-Methylcytosin) oder Adenin (N6-Amino-

Methyladenin) in der Erkennungssequenz nicht gespalten. Je nach Enzym kann die Restriktionstelle innerhalb oder außerhalb der Erkennungssequenz liegen und führt zur Bildung von 5'- oder 3'-überhängenden oder glatten Enden der DNA.

Die Fähigkeiten von Restriktionsenzymen können *in vitro* dazu verwendet werden, an den Enden von PCR-Fragmenten Bindestellen zu schaffen oder Plasmid-DNA zu öffnen. Zudem werden die Enzyme zu Restriktionsanalysen verwendet, um Plasmide oder andere DNA zu charakterisieren. Ein prinzipieller Reaktionsansatz ist in Tabelle 2.5 dargestellt. Die Ansätze wurden eine Stunde bei der für die Restriktionsendonuklease optimalen Temperatur inkubiert und anschließend das Enzym durch Erhitzen auf 65°C 20 Minuten lang inaktiviert. Anschließend wurden die Restriktionsansätze entweder im Agarosegel aufgetrennt (2.2.10), für weitere Klonierungsarbeiten aufgereinigt (2.2.6) oder dephosphoryliert (2.2.8).

Komponente	Eingesetzte Menge oder Endkonzentration
10x Reaktionspuffer	1x
DNA	0,1 - 1 µg
BSA 10 µg/µl	0,1 µg/µl
Restriktionsendonuklease	2 - 10 U

Tab. 2.5 : Prinzipieller Reaktionsansatz für eine Restriktionsanalyse. BSA: bovines Serumalbumin, U: Einheiten

2.2.8 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Zur Dephosphorylierung der DNA nach einer endonukleolytischen Spaltung eines Plasmids oder eines PCR-Produkts wurde die Antarctic Phosphatase von NEB (2.1.3) verwendet. Für die Dephosphorylierungsreaktion wurde 10fach Antarctic Phosphatase Puffer zu einer Endkonzentration von 1fach zu 1 µg der DNA gegeben. Anschließend wurden 5 Einheiten der Antarctic Phosphatase zugegeben und 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde der Ansatz anschließend fünf Minuten lang auf 65°C erhitzt. Danach wurde die dephosphorylierte DNA entweder direkt in eine Ligationsreaktion (2.2.3) gegeben oder bei -20°C eingelagert.

2.2.9 Bestimmung von DNA- bzw. RNA-Konzentrationen

Durch die aromatischen Ringsysteme ihrer Basen besitzen Nukleinsäuren ein Absorptionsmaximum bei 260 nm, Proteine dagegen durch die Ringsysteme der aromatischen Aminosäuren, beispielsweise von Tryptophan, ein Maximum bei 280 nm. Zur Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen wurden Aliquote mit H₂O verdünnt und die Absorption bei 260 und 280 nm im Vergleich zu einer Referenzprobe ohne DNA bestimmt. Das Verhältnis der Absorption 260/280 nm ermöglicht eine Abschätzung der Reinheit der Probe. Bei einer proteinfreien DNA-Probe sollte der Wert einen Betrag zwischen 1,8 und 1,9 ergeben. RNA-Proben wurden in 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 verdünnt und auf die gleiche Weise vermessen, allerdings sollte hier das Verhältnis der Absorption 260/280 nm bei 1,9 bis 2,1 liegen.

2.2.10 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Moleküle wandern aufgrund ihrer negativen Nettoladung im elektrischen Feld zur Anode. Die Matrix von Agarosegelen erlaubt es, DNA-Moleküle unterschiedlicher Größe voneinander zu trennen, wobei der Grad der Auftrennung von der verwendeten Agarosekonzentration abhängt. Allgemein wandern dabei kleine DNA-Moleküle schneller durch die Gel-Matrix als größere.

Für 1-%ige Agarosegele wurden 1 g Agarose unter Erhitzen in 100 ml TAE-Puffer (2.1.2.1) gelöst, nach Abkühlen auf ca. 60°C mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in eine Gelkammer gegossen. Die DNA-Proben wurden 1:10 mit 10x DNA-Probenpuffer (2.1.2.1) versetzt und in die Probenaschen des Agarosegels gegeben. Zur Ermittlung von Fragmentgrößen wurden DNA-Größenstandards mit DNA-Fragmenten bekannter Länge aufgetragen. Der Gellauf erfolgte zunächst bei 100 V. Nach dem Einlaufen der Proben in das Gel wurde die Spannung auf 120 V erhöht und die Elektrophorese entsprechend der gewünschten Auftrennung durchgeführt. Als Laufpuffer diente TAE-Puffer.

2.2.11 Aufreinigung von RNA aus H9c2-hIR Zellen

Zur Aufreinigung von RNA aus H9c2-hIR Zellen wurden 7 Mio. Zellen mit 600 µl RLT-Puffer lysiert und mit Hilfe des RNeasy® Mini Kits (2.1.1.3) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die Elution der RNA erfolgte mit 50 µl RNase-freiem H₂O. Zur Bestimmung der RNA-Konzentration und Reinheit, wurden die Eluate 1:20 und 1:50 mit 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, verdünnt und die Absorption bei 260 und 280 nm gemessen (2.2.9).

2.2.12 Formalaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese

Um die Integrität und die Größenverteilung von isolierter Gesamt-RNA abschätzen zu können, wird eine Probe mittels denaturierender Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Entsprechend der Spezies sollten in diesem Gel die Banden der ribosomalen RNAs als distinkte Banden erscheinen. Dabei sollte zum Beispiel bei der Spezies Ratte die 28S rRNA mit einer circa doppelt so starken Intensität auftreten wie die Bande der 18S rRNA.

Zur Vorbereitung eines 1,2 %igen Formaldehyd-Agarose-Gels (FA-Gels) wurde 1,2 g Agarose durch Erhitzen in 100 ml FA-Gelpuffer (2.1.2.1) gelöst. Nach Abkühlen auf 65°C in einem Wasserbad wurden 1,8 ml einer 37 %igen Formaldehydlösung und 1 µl einer 1 %igen Ethidiumbromid-Lösung zugeben, gemischt und in eine Gelkammer gegossen. Bevor der Gellauf gestartet wurde, wurde das ausgehärtete Gel 30 Minuten in FA-Gelpuffer äquilibriert. Die RNA-Proben wurden mit 5x RNA-Probenpuffer (2.1.2.1) versetzt, drei bis fünf Minuten auf 65°C erhitzt und anschließend auf das FA-Gel aufgetragen. Die Auftrennung im FA-Gel erfolgte in einem elektrischen Feld bei fünf bis sieben Volt pro cm in 1x FA-Laufpuffer (2.1.2.1).

2.2.13 Reverse Transkription von mRNA

Mithilfe der Reversen Transkription lässt sich isolierte mRNA in cDNA umschreiben um in einem folgenden Schritt, beispielsweise mittels Real-Time-PCR, spezifisch amplifiziert zu werden. Die Reverse Transkription wurde mit Hilfe des Omniscript Reverse Transcription Kits (2.1.1.3) nach Herstellerangaben durchgeführt. Mit der dabei verwendeten Omniscript Reversen Transkriptase kann cDNA aus RNA-Mengen zwischen 50 ng und 2 µg amplifiziert

werden. Um aus der Gesamt-RNA selektiv alle mRNAs zu amplifizieren, wurde ein Oligo(dT)-Primer verwendet, der am Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende der mRNAs bindet. Zur Bestimmung der Konzentration der transkribierten DNA wurden Proben 1:50 verdünnt und die Absorption bei 260 und 280 nm gemessen (2.2.9).

Komponente	Eingesetzte Menge oder Endkonzentration
10x Reaktionspuffer	1x
dNTP-Mix	jew. 0,5 mM
oligo(dT)-Primer	1 μ M
RNase-Inhibitor	10 U
Omniscript Reverse Transkriptase	4 U
Template RNA	variabel
RNase-freies Wasser	ad 20 μ l

Tab. 2.6 : Reaktionsansatz einer Reversen Transkription mit Omniscript. (Variiert nach QIAGEN, Omniscript Reverse Transcription Handbook, 2004).

2.2.14 Real-Time-PCR

Die Real-Time-PCR ist eine Methode zur quantitativen Bestimmung der Ausgangsmenge einer spezifischen mRNA-Sequenz. Dazu wird die während der Reversen Transkription in RNA/DNA-Hybridstränge umgeschriebene mRNA in einer PCR-Reaktion eingesetzt und die Bildung neuer DNA-Stränge durch sequenzspezifische Fluoreszenzsonden oder DNA-bindende Fluoreszenzfarbstoffe quantitativ erfasst.

Primer Design

Um spezifisch nur cDNA von prozessierter mRNA und nicht genomische DNA zu amplifizieren, werden Primer für die Real-Time-PCR so entworfen, dass die eine Hälfte des Primers an das 3'-Ende eines Exons und die andere Primer-Hälfte an das 5'-Ende des angrenzenden Exons bindet. Der Primer kann so nicht an genomische DNA binden, da dort zwischen beiden Exons noch ein Intron eingelagert ist. Um passende Primer-Sequenzen in der Ziel-RNA zu finden, wurde die Software Primer Express 1.5 von ABI PRISM® verwendet. Dabei wurde darauf geachtet, einen GC-Gehalt von 40-60 %, eine Primer-Länge von 20-30 bp, einen gleichen Schmelzpunkt T_m und eine PCR-Produkt von ca. 100 bp Länge zu erhalten.

Gen	Primer	Name	Sequenz	GC (%)	T _m (°C)	Länge(b)
Rab11a	vorwärts	RS07	5'-AAAGGCACAGATATGGGACACA-3'	45	58	22
	rückwärts	RS08	5'-ACTGCTCCACGATAGTATGCAGAC-3'	50	58	24
PCR-Produkt: 75 bp Länge und Schmelztemperatur T _m von 81°C						
Rab11b	vorwärts	RS09	5'-ACCTATTCAAAGTGGTGCTTATTGG-3'	40	59	25
	rückwärts	RS10	5'-TCTCTAGGTTGAACTCGTTTCTGGT-3'	44	59	25
PCR-Produkt: 90 bp Länge und Schmelztemperatur T _m von 79°C						

Tab. 2.7 : Primer für Real-Time-PCR. Die Primer wurden mit Hilfe der Software Primer Express 1.5 von ABI PRISM® entworfen. Um die Amplifikation genomischer DNA zu vermeiden, wurde dabei darauf geachtet, dass mindestens ein Primer eines Paares auf zwei Exons der zu amplifizierenden mRNA liegt. b: Basen, T_m: berechnete Schmelztemperatur.

Real-Time-PCR mit DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoffen

Zur Einlagerung in doppelsträngige DNA während der Real-Time-PCR ist der hoch sensitive Farbstoff SYBR Green I besonders geeignet. Ein Nachteil ist, dass SYBR Green I an alle DNA-Doppelstränge bindet, also auch an Primer-Dimere oder nicht spezifische DNA-Produkte.

Aus diesem Grund wurde das QuantiTect™ SYBR Green Kit von QIAGEN (2.1.1.3) verwendet, dieses Kit enthält eine für die Hot-Start-PCR optimierte Taq-DNA-Polymerase (*HotStarTaq* DNA-Polymerase), die die Bildung von Primer-Dimeren und nicht spezifischen PCR-Produkten minimiert und dadurch die Spezifität der Reaktion erhöht. Alle Real-Time-PCRs wurden an einem ABI PRISM® 7700 Thermocycler durchgeführt.

Komponente	Eingesetzte Menge oder Endkonzentration
2x SYBR Green PCR Master Mix	1x
Primer vorwärts	0,3 µM
Primer rückwärts	0,3 µM
RNase freies Wasser	ad 20 µl

Tab. 2.8 : Einfacher Reaktionsansatz für die Real-Time-PCR. Um eine möglichst geringe Abweichung in den Reaktionsbedingungen zu erreichen, wurde für alle Ansätze eines Gens ein einzelner Mastermix vorbereitet. Für eine Messsituation wurden 60 µl des Mastermixes zu 15 µl einer cDNA-Verdünnung gegeben und davon dreimal 25 µl in die Reaktionsgefäße für die Real-Time-PCR aliquotiert.

Schritt	Bezeichnung	Temperatur (°C)	Zeit
1	initiale Denaturierung	95	15 min
2	Denaturierung	95	30 sek
3	Primer-Hybridisierung	55	30 sek
4	Polymerisation	72	45 sek
5		25	2 min
6	TempRamp	95	15 sek
7		50	20 sek
8	Denaturierung	95	15 sek
9		25	90 min

Tab. 2.9 : Schematischer Ablauf einer Real-Time-PCR mit TempRamp.

Reaktionsansätze und Real-Time-PCR-Lauf

Die Ansätze für die Real-Time-PCR wurden nach Herstellerangaben vorbereitet. Als Positivkontrolle wurde GAPDH amplifiziert und als Negativkontrolle für jedes Primerpaar ein Ansatz ohne cDNA vorbereitet. Alle Ansätze (mit und ohne cDNA) wurden in Dreifachmessungen amplifiziert; um die optimale Menge an Ausgangsmaterial zu bestimmen, wurden Ansätze mit 1, 50 und 250 ng cDNA gemessen. Um eine möglichst geringe Abweichung in den einzelnen Reaktionsansätzen zu erhalten, wurde für alle Ansätze eines Gens ein Mastermix vorbereitet. 60 µl des Mastermixes wurden zu 15 µl zu amplifizierender cDNA einer Konzentration gegeben und davon dreimal 25 µl in die Reaktionsgefäße für die Real-Time-PCR aliquotiert.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Kultivierung von H9c2-hIR-Zellen

Die Ratten-Kardiomyoblasten-Zelllinie H9c2-hIR geht aus der Zelllinie H9c2 hervor, in deren Genom die für den human Insulinrezeptor kodierende cDNA integriert wurde, wodurch dieser stabil überexprimiert wird. H9c2 selbst ist ein Subklon der ursprünglichen Zelllinie BD1X aus embryonischem Rattenherzgewebe.

Die Kultivierung zur Stammhaltung erfolgte in T175-Kulturflaschen in 30 ml H9c2-hIR-Kulturmedium (2.1.2.2) bei 37°C und 5 % CO₂. Zweimal pro Woche wurden die Zellen

passagiert, dazu wurden sie mit 13 ml PBS (2.1.1.2) gewaschen und über drei Minuten mit 6 ml Trypsin/EDTA (2.1.1.2) vom Flaschenboden gelöst. Die abgelösten Zellen wurden in 13 ml H9c2-hIR-Kulturmedium resuspendiert und anschließend fünf Minuten mit 800 rpm sedimentiert. Nachdem der Überstand abgesaugt worden war, wurde das Zellpellet in 5 ml H9c2-hIR-Kulturmedium resuspendiert und ein kleines Aliquot davon zur Zellzahlbestimmung abgenommen (2.3.2). Je nach Dauer bis zur nächsten Passagierung wurden 800.000 Zellen (bei vier Tagen) bzw. 1.200.000 Zellen (bei drei Tagen) in 30 ml H9c2-hIR-Kulturmedium resuspendiert und bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Zusätzlich fand bei einer Kultivierungsdauer von mehr als drei Tagen nach dem zweiten Tag ein Medienwechsel statt.

2.3.2 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde von den Zellen in Suspension ein kleines Aliquot abgenommen und davon 20 µl mit 20 µl Trypan-Blau-Lösung (2.1.1.1) versetzt. Nach einer kurzen Inkubation wurde gemischt, ca. 20 µl der Zellsuspension in Trypan-Blau auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen und vier Großquadrate ausgezählt. Um die Zellzahl pro Milliliter in Suspension zu erhalten, wurde die gezählte Zellzahl mal zwei multipliziert (Verdünnung in Trypan-Blau), durch vier geteilt (vier Großquadrate gezählt) und mal 10⁴ multipliziert (Volumen eines Großquadrates entspricht 0,1 µl).

2.3.3 Transfektion

Als Transfektion bezeichnet man das Einbringen von artfremder DNA bzw. RNA in eukaryontische Zellen. Übliche Methoden sind die Calciumphosphat-Transfektion, die Elektroporation und die Lipofektion. Bei der Lipofektion wird DNA bzw. RNA vor der Transfektion durch die Zugabe eines Lipid-Gemisches in Micellen komplexiert und kann damit leichter während des Transfektionsvorgangs in die Wirtszelle eingeschleust werden.

2.3.3.1 Transfektion von Plasmid-DNA

Für die Transfektion von Plasmid-DNA mittels Lipofektion in H9c2-hIR Zellen wurde das FuGene 6 Transfektions-Reagenz (2.1.1.2) verwendet. Transfiziert wurden Zellen, die zu 40

bis 60 % konfluent den Boden des Kultivierungsgefäßes bedeckten und über 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert waren. Zur Kultivierung der zu transfizierenden H9c2-hIR-Zellen wurden 6-Kavitäten-Platten mit 2 ml bzw. 12-Kavitäten-Platten mit 1 ml H9c2-hIR-Kulturmedium (2.1.2.2) pro Kavität verwendet. FuGene 6 wurde im Verhältnis 1:35 (v/v) mit DMEM (2.1.1.2) vorverdünnt und anschließend die Plasmid-DNA in einem Verhältnis von 1:3 (w/v) zum vorverdünnten FuGene 6 pipettiert und gemischt. Dabei wurde in einem 6-Kavitäten-Ansatz 1 µg Plasmid-DNA pro Kavität verwendet, bei einem 12-Kavitäten-Ansatz 0,5 µg. Der Ansatz wurde 15 Minuten lang inkubiert und anschließend 110 bzw. 55 µl tropfenweise zu den Zellen gegeben. Danach wurden die Zellen 16 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert und anschließend mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versorgt. 24 bis 72 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert bzw. weiter bearbeitet.

2.3.3.2 Transfektion von siRNA

Durch das Einbringen doppelsträngiger RNA-Oligonukleotide sowohl in eukaryontische als auch pflanzliche Zellen lässt sich die Expression eines oder mehrerer Proteine spezifisch hemmen. Dabei wird die eingebrachte dsRNA in einem ersten Schritt durch sogenannte Dicer-Enzyme in Oligonukleotide mit 19 bis 21 bp geschnitten um anschließend an einen Nukleasen-Komplex zu binden. In diesem Komplex wird die dsRNA in ssRNA entwunden wodurch der gesamte Komplex über die ssRNA spezifisch an eine komplementäre mRNA-Sequenz binden kann und diese ca. 12 Nukleotide abwärts des 3'-Endes der ssRNA schneidet. Der gesamte Prozess der posttranskriptionalen Genrepression wird RNA-Interferenz genannt, die für eine mRNA-Sequenz spezifische inhibitorische RNA, welche in die Zelle eingebracht wird, wird siRNA (small interfering RNA) genannt.

Doppelsträngige siRNA wurde mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamin 2000 (2.1.1.2) in H9c2-hIR-Zellen eingebracht. Transfiziert wurden Zellen, die zu 40 bis 60 % konfluent gewachsen und über 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert waren. Zur Kultivierung der zu transfizierenden H9c2-hIR-Zellen wurden 35.000 Zellen in 12-Kavitäten-Platten mit 1 ml H9c2-hIR-Kulturmedium (2.1.2.2) pro Kavität ausgesät. Zur Transfektion wurde die siRNA so in 125 µl DMEM (2.1.1.2) verdünnt, dass sie später in einem Gesamtvolumen von 1 ml eine Endkonzentration von 10 bis 50 nM hatte. Pro Ansatz wurden 2 µl Lipofectamin 2000 in 125 µl DMEM verdünnt und 5 min inkubiert. Danach wurde der siRNA-Ansatz mit dem Lipofectamin-Ansatz gemischt und 20 min inkubiert. Währenddessen wurde ein Medienwechsel mit 750 µl Antibiotika-freiem H9c2-hIR-Kulturmedium durchgeführt.

Anschließend wurde auf jede zu transfizierende Kavität 250 µl des siRNA-Lipofectamin-Komplexes gegeben und 16 h bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Anschließend fand ein Medienwechsel mit 1 ml Antibiotika-haltigem H9c2-hIR-Kulturmedium statt. 24 bis 72 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert bzw. weiter bearbeitet.

2.3.4 Translokations-Messungen

2.3.4.1 GLUT4myc-Translokation

Um in der Kardiomyoblastenzelllinie H9c2-hIR die insulinstimulierte Translokation des Glucosetransporters GLUT4 aus intrazellulären Speicher-Kompartimenten hin zur Plasmamembran untersuchen zu können, wurde in dieser Zelllinie ein GLUT4 überexprimiert, welches an der ersten extrazellulären Schleife ein humanes myc-Epitop (AEEQKLISEEDLLK) trägt. Durch dieses extrazelluläre myc-Epitop kann das in der Plasmamembran integrierte GLUT4myc detektiert werden.

Dazu wurden 35.000 Zellen pro Kavität in einer 12-Kavitäten-Platte ausgesät und 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Um die versuchsimmanente Streuung auszugleichen, wurden alle Situationen in Triplettansätzen durchgeführt. Pro Kavität wurden anschließend 0,5 µg pCMV-GLUT4myc bzw. pCMVβ als Kontrollvektor transfiziert (2.3.3.1). Die Zellen wurden nach der Transfektion noch weitere 48 h kultiviert und dann zweimal mit vorgewärmten PBS (2.1.1.2) gewaschen. Danach wurde FCS-freies DMEM mit 1 % BSA zugegeben und zwei Stunden lang bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Nachdem die Zellen zweimal mit Transportpuffer (2.1.2.2) gewaschen worden waren, wurde sie 30 min lang mit Transportpuffer ohne bzw. mit 1 µM Insulin bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit jeweils 2 %igem Paraformaldehyd 15 min lang fixiert und viermal mit PBS gewaschen. Zur Blockierung wurden die Zellen eine Stunde mit PBS mit 5 % Magermilchpulver inkubiert. Danach wurde 2 µg/ml anti-myc-Antikörper (2.1.4) in PBS mit 5 % Magermilchpulver zugegeben und zwei Stunden unter Schütteln inkubiert.

Um nicht gebundenen Primärantikörper zu entfernen, wurde viermal mit PBS mit 5 % Magermilchpulver gewaschen. Als Sekundärantikörper diente ein ¹²⁵Iod-markierter anti-Maus-Antikörper (2.1.4), welcher mit 0,1 µCi pro Kavität in PBS mit 5 % Magermilchpulver eine Stunde auf den Zellen inkubiert wurde. Nicht gebundener Zweitantikörper wurde durch intensives Waschen mit PBS mit 5 % Magermilchpulver, PBS und PBS mit 0,05 % Tween 20

entfernt. Zur Zellsolubilisierung wurde 1 %iges Natriumdodecylsulfat zugeben und eine weitere Stunde unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Zellsuspensionen in Sarstedt-Röhrchen überführt, die Kavitäten mit PBS nachgespült und der Überstand in die gleichen Sarstedt-Röhrchen gegeben. Die Messung der Gammastrahlung erfolgte in einem Gamma-Counter 1282 COMPUGAMMA CS (2.1.6).

2.3.4.2 FAT/CD36-Translokation

Die Messung der Translokation des Fettsäuretransporters FAT/CD36 erfolgte nach Modifikation des Protokolls zur GLUT4myc-Translokation. Durch die Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen murines CD36 (2.1.4) konnte allerdings an der Plasmamembran lokalisiertes FAT/CD36 in seiner endogenen Konformation detektiert werden, dennoch musste auch dieses zuvor überexprimiert werden. Dazu wurde nach demselben Schema wie oben pcDNA-FAT/CD36 bzw. pcDNA3.1(+) als Kontrollvektor in H9c2-hIR Zellen transfiziert und das Protein über 48 h exprimiert. Die Stimulation der Translokation erfolgte mit D-Sorbitol, fixiert wurde mit 2 %igem Paraformaldehyd. In den Lösungen zum Blockieren, Waschen oder zur Antikörperinkubation war anstelle von Magermilchpulver 1 % bovines Serum-Albumin (BSA, 2.1.1.1) enthalten. Zur Bindung an das membranständige FAT/CD36 wurde der monoklonale Antikörper gegen CD36 mit 2 µg/ml in PBS mit 1 % BSA auf den fixierten und blockierten Zellen inkubiert. Die Inkubation des Zweitantikörpers, das intensive Waschen, die Lyse und die Messung der Gammastrahlung erfolgte wie im Protokoll der GLUT4myc-Translokation.

2.3.5 Rab11a-GTP-Beladung

Rab11a steuert seine Aktivität über die Bindung und Hydrolyse von GTP. Dabei ist der GTP-gebundene Zustand der aktive, nach der Hydrolyse von GTP zu GDP wird Rab11a inaktiviert. Das Protokoll der Rab11a-GTP-Beladung ist eine Methode, um den Aktivitätszustand von Rab11a in der intakten Zelle messen zu können. Um zu diesem Zweck Rab11a nach der GTP-Bindung aus dem Zelllysate zu isolieren, wurde ein Rab11a überexprimiert, welches an seinem N-terminalen Ende ein Hämagglutinin-Epitop (HA, YPYDVPDYA) trägt.

In einem ersten Schritt wurde 24 h nach der Aussaat von 500.000 H9c2-hIR-Zellen pro 10cm-Schale 6 µg pCMV-HA-Rab11a pro Schale transfiziert (2.3.3.1). 48 h nach der Transfektion

wurden die Zellen trypsinisiert und zweimal mit Mg^{2+}/Ca^{2+} -freiem PBS (2.1.1.2) gewaschen. Pro Messpunkt wurden anschließend ca. eine Millionen Zellen in 400 μ l Mg^{2+}/Ca^{2+} -freiem PBS in Anwesenheit von 45 μ M GTP-[γ]-AA-Biotin-LC-Hydrazone (2.1.1.1) elektroporiert. Die Elektroporation erfolgte mit zwei direkt aufeinander folgenden Impulsen bei 250 V mit 500 μ F. Sofort nach der Elektroporation wurden die Zellen in H9c2-hIR-Kulturmedium (2.1.2.2) resuspendiert und eine Stunde bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert.

Nach der Stimulation der Zellen wurden diese noch vor Zugabe eines Lysepuffers (2.1.2.3) 45 sek lang mit 254 nm bestrahlt. An HA-Rab11a angelagertes GTP-[γ]-AA-Biotin-LC-Hydrazone bildet dadurch über seine Azidoanilidgruppe eine kovalente Bindung aus, wodurch HA-Rab11a auch noch nach der Lyse und den folgenden Schritten seine GTP-Bindung nicht verliert. Im Anschluss an die Lyse wurde HA-Rab11a mittels eines 1:2 mit Lysepuffer verdünnten immobilisierten Anti-HA-Antikörpers (2.1.1.2) bei 4°C über Nacht präzipitiert und nach mehrmaligem Waschen der Antikörper-beads mit 2x Laemmli-Puffer (2.1.2.3) eluiert. Die Eluate wurden mittels SDS-PAGE (2.4.3) aufgetrennt und die GTP-Beladung von HA-Rab11a über einen Anti-Biotin-Antikörper (2.1.4) im Western Blot (2.4.4) detektiert.

2.4 Proteanalytische Methoden

2.4.1 Zelllyse

Zur Lyse wurden die Zellen zuerst zweimal mit kaltem PBS (2.1.2.3) gewaschen und anschließend durch Zugabe eines detergenzhaltigen Lysepuffers (2.1.2.3) auf Eis fünf Minuten lang solubilisiert. Zur vollständigen Ablösung wurden die Zellen mithilfe eines Zellschabers vom Gefäßboden entfernt und danach in 1,5ml-Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurden die Rohlysate 30 bis 60 Minuten bei 4°C überkopf rotiert. Zur Abtrennung nicht gelöster Zellfragmente wurde die Rohlysate anschließend 15 Minuten lang mit 14.000 x g bei 4°C zentrifugiert und die Überstände abgenommen. Zur Proteinbestimmung wurden von den Überständen jeweils 20 μ l abgenommen und der Rest bei -20°C eingefroren.

2.4.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration nach dem Verfahren von Bradford erfolgt durch Messung der Extinktion einer Proteinlösung im Vergleich zu einer Eichreihe mit bovinem Serumalbumin (BSA) bekannter Konzentrationen. Diese gehorcht einer linearen Funktion (im Absorptionsbereich von 0 bis 0,6 Absorptionseinheiten) mit folgender Annäherungsformel:

$$c = (x - 0,0126) : 0,0501 \cdot VF$$

Dabei ist c die Proteinkonzentration in $\mu\text{g/ml}$, x die Absorption bei 595 nm und VF der Verdünnungsfaktor.

Zur Bestimmung der Konzentration einer Proteinprobe wurden 80 μl einer Vorverdünnung hergestellt und davon 10, 20 und 40 μl zu 790, 780 bzw. 760 μl H_2O gegeben, 200 μl Bradford-Reagenz hinzugegeben und gemischt. Nach fünf Minuten Inkubation wurde die Absorption bei 595 nm im Vergleich zu der Eichreihe gemessen und die Proteinmenge berechnet.

2.4.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Durch die Wechselwirkung von Proteinen mit Natriumdodecylsulfat (SDS) entstehen negativ geladene Komplexe, welche anhand ihrer unterschiedlichen Größe durch Elektrophorese in einer Polyacrylamidmatrix aufgetrennt werden können. Pro mol SDS werden 2 mol Aminosäuren gebunden und erhalten dadurch eine negative Ladung, wodurch die ursprüngliche Ladung des Proteins vernachlässigbar wird. Die Menge an gebundenem SDS ist daher proportional zur molaren Masse der Polypeptide. Die generelle negative Ladung der SDS-Protein-Komplexe lässt diese beim Einbringen in ein elektrisches Feld in die Richtung der Anode wandern.

Die SDS-PAGE wurde in einer Horizontal-Elektrophoresekammer (2.1.6, Multiphor II) mit 0,5 mm dicken, auf Folie fixierten SDS-Gelen durchgeführt. Verwendet wurden dabei entweder Gradientengele (7,5 bis 15 % SDS) oder homogene Gele (10 % SDS). Zwischen Kathode bzw. Anode und dem SDS-Gel waren Pufferstreifen (2.1.2.2) mit entsprechendem Ionengehalt aufgelegt. Um eine Erhitzung des Gels während des Laufs zu vermeiden, fand die SDS-PAGE wassergekühlt statt.

Zur Probenvorbereitung wurden Aliquote definierter Proteinmenge aus Zelllysaten mit 6x Laemmli-Probenpuffer (2.1.2.3) versetzt, mit H₂O auf gleiche Volumina gebracht. Anschließend wurden die Proben zur Denaturierung fünf Minuten lang bei 95°C erhitzt. Nach der Denaturierung wurden die Ansätze kurz abzentrifugiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Zur Ermittlung von Proteingrößen wurden parallel Größenstandards mit Proteinen bekannter Größe aufgetragen.

Die Elektrophorese wurde bei 50 mA mit maximal 600 V und 30 W bis zur optimalen Proteinauftrennung durchgeführt. Nach der Auftrennung der Proteine wurde diese durch Western Blotting (2.4.4) weiter analysiert.

2.4.4 Western Blotting (Semi-Dry-Verfahren)

Beim Western Blotting werden Proteine, die in einem SDS-Gel aufgetrennt wurden, auf eine Membran (z.B. PVDF [Polyvinylidendifluorid]) elektrophoretisch übertragen, auf der sie dann durch hydrophobe Wechselwirkungen gebunden werden. Zur Vorbehandlung wurde die PVDF-Membran 30 Sekunden in Methanol äquilibriert und danach bis zur Verwendung in Anodenpuffer II (2.1.2.3) geschüttelt. Das SDS-Gel wurde kurz mit Anodenpuffer II inkubiert. Die Blot-Apparatur wurde nach dem in Abb. 2.1 dargestellten Schema angeordnet und das Blotten 1,5 Stunden bei 150 mA und mit maximal 60 V und 30 W durchgeführt. Im Anschluss wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen eine Stunde bei Raumtemperatur in Blockier-Lösung (2.1.2.3) inkubiert.

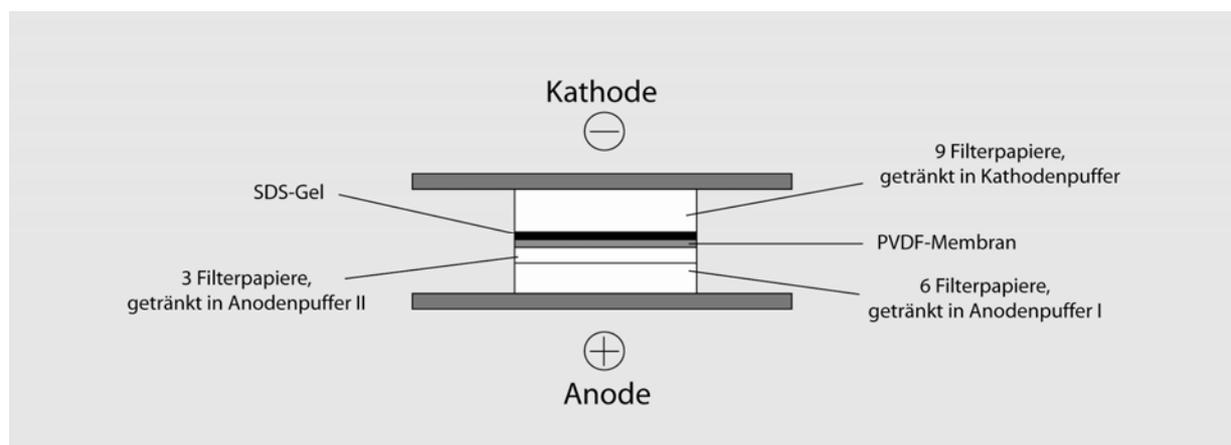


Abb. 2.1 : Schematische Darstellung des Western Blotting nach dem Semi-Dry-Verfahren. Die negativ geladenen Proteine wandern aufgrund des elektrischen Feldes aus dem SDS-Gel auf die PVDF-Membran.

2.4.5 Antikörperhybridisierung und ECL-Detektion

Beim Hybridisierungsverfahren bindet im ersten Schritt ein für eine bestimmte Aminosäuresequenz (Epitop) spezifischer Antikörper über Nacht bei 4°C an das auf die PVDF-Membran übertragene Protein. Nach intensivem Waschen mit TBS-T (2.1.2.3) erfolgt im Anschluss eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur mit einem sekundären Antikörper, welcher spezifisch an den ersten Antikörper bindet. Dieser zweite Antikörper trägt neben der Erkennungssequenz kovalent gebunden Meerrettich-Peroxydase. Danach wird wieder intensiv gewaschen. Während und nach der anschließenden einminütigen Inkubation der Membran in einem ECL-Substrat (ECL: „enhanced chemoluminescence“, enthält Luminol, 2.1.1.2), ist die Meerrettich- Peroxydase in der Lage, dieses Substrat unter Lichtemission zu oxidieren. Diese Emission ist mit dem Auge nicht sichtbar, kann jedoch mit einem Lumineszenz-Messgerät wie dem Lumi-Imager (2.1.6) detektiert und mithilfe der Software Lumi-Analyst ausgewertet werden.

3. Ergebnisse

3.1 Expressionsanalysen

3.1.1 Expressionsanalysen von Rab11a, Rab11-FIP2 und Rip11

Die intrazelluläre Lokalisation und die Bindungspartner von Rab11a werden durch diverse Rab11-Effektorproteine gesteuert. Zwei der am besten charakterisierten sind Rip11 und Rab11-FIP2. Um die Expression von Rab11a und dieser beiden Effektorproteine zu untersuchen, wurden Lysate verschiedener Zelllinien und Gewebe aus der Spezies Ratte hergestellt (2.4.1) und davon jeweils 10 µg Protein mittels SDS-PAGE (2.4.3) aufgetrennt. Anschließend wurde durch Western Blotting (2.4.4) und ECL-Detektion Rab11a, Rip11 und Rab11-FIP2 detektiert (Abb. 3.1).

Wie deutlich zu sehen ist, ist Rab11a in H9c2-hIR- und Ins-1-Zellen stark exprimiert. Genauso stark ist es in Niere und Kleinhirn exprimiert. Außerdem wird es in allen weiteren untersuchten Geweben, nämlich Herzmuskel, Lunge, Leber und Mittelhirn ebenfalls exprimiert. Rab11-FIP2 ist in H9c2-hIR-Zellen stark exprimiert, noch stärker sogar in Ins-1-Zellen. Detektiert werden kann es außerdem im Herzmuskel, der Niere, Lunge und dem Kleinhirn.

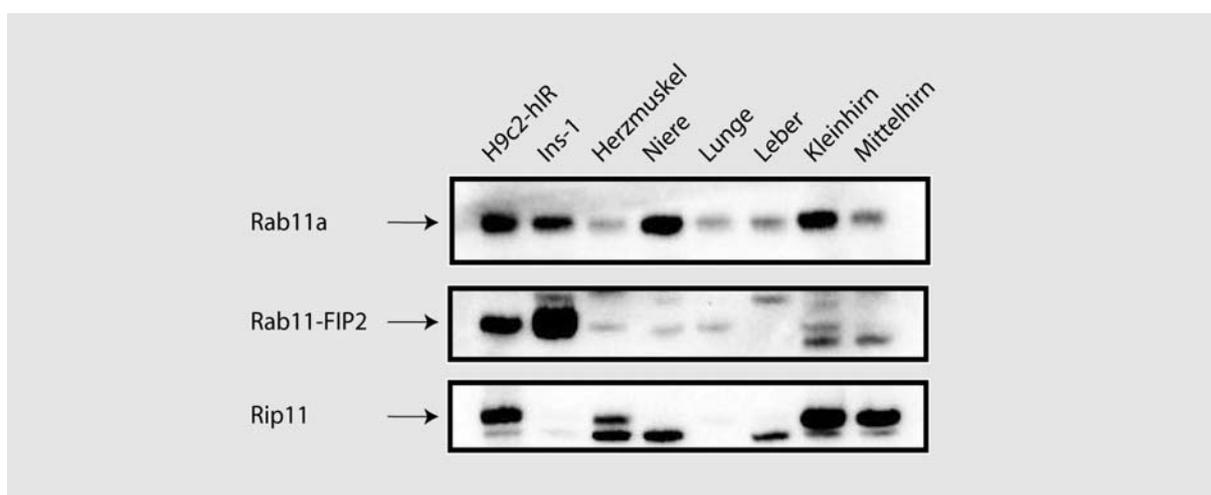


Abb. 3.1 : Expression von Rab11a, Rip11 und Rab11-FIP2 in verschiedenen Zelllinien bzw. Geweben der Spezies Ratte. SDS-PAGE mit Lysaten von 10 µg Gesamtprotein pro Spur. Detektion mittels spezifischer Antikörper gegen Rab11a, Rab11-FIP2 bzw Rip11.

In Leber und Mittelhirn ist es offensichtlich nicht exprimiert. Rip11 ist in H9c2-hIR-Zellen, dem Klein- und Mittelhirn stark exprimiert. Außerdem wird es im Herzmuskel exprimiert. In Ins-1-Zellen, Niere, Lunge und Leber ist es dagegen nicht zu detektieren.

3.1.2 Expressionsvergleich von Rab11a und Rab11b in H9c2-hIR

Wenn in einer der zahlreichen Veröffentlichungen von Rab11 gesprochen wird, ist in den meisten Fällen die Isoform Rab11a gemeint. Wenig untersucht ist dagegen die Isoform Rab11b, obwohl die Aminosäuresequenz beider Proteine zu 90 % identisch ist. Außerdem gibt es keinen kommerziellen Antikörper, der spezifisch nur die Isoform Rab11b bindet. Da die meisten Versuche dieser Arbeit in der kardialen Myoblastenzelllinie H9c2-hIR durchgeführt wurden, war es von Interesse beurteilen zu können, ob neben Rab11a auch Rab11b exprimiert wird, beziehungsweise in welchem Verhältnis beide Proteine exprimiert werden. Dies ist vor allem für Versuche von Interesse, in denen durch siRNA-vermittelte Genrepression (2.3.3.2) Rab11a ausgeschaltet wird und Rab11b potentiell kompensatorisch dem Verlust der Funktion von Rab11a gegensteuern könnte.

Um die Expression beider Isoformen in H9c2-hIR quantitativ zu bestimmen, wurde die Real-Time-PCR verwendet (2.1.1.4). Dazu wurden in einem ersten Schritt die Gesamt-RNA aus ca. sieben Millionen Zellen isoliert (2.2.11).

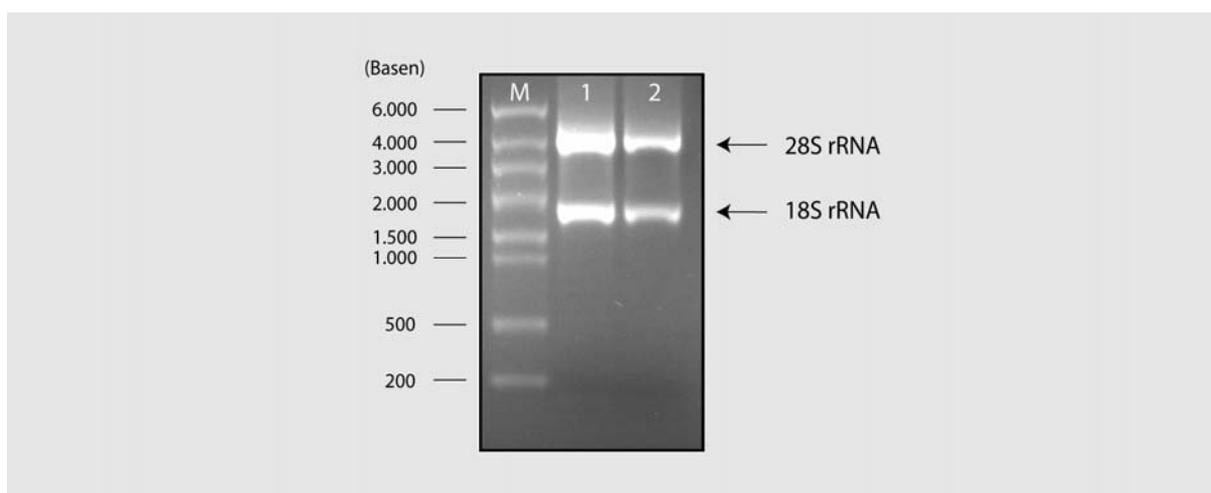


Abb. 3.2 : Gesamt-RNA aus H9c2-hIR-Zellen. Auftrennung der isolierten Gesamt-RNA aus H9c2-hIR-Zellen in einem 1,2 %igem Formaldehyd-Agarose-Gel. Parallel zu einem RNA-Größenstandard (M) wurden 1 µg der zwei RNA-Aufreinigungen vom 09.06.05 (1) und 12.07.06 (2) aufgetragen. Die 18S rRNA hat in Eukaryonten eine Größe von ca. 1,8 kb und die 28S rRNA eine Größe von ca. 4,8 kb.

Zur Überprüfung der RNA-Qualität wurden 1 μg mittels Formalaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese (2.2.12) aufgetrennt und die Banden der 18S und 28S rRNA detektiert (Abb 3.2). Mittels der Omniscript Reversen Transcriptase und oligo-dT-Primern wurden 2 μg der Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben (2.2.13). Mit 1, 50 und 250 ng der neu synthetisierten cDNA wurden Real-Time-PCR-Analysen zur Bestimmung der mRNA-Kopienzahl von Rab11a und Rab11b durchgeführt (Abb 3.4).

Zur relativen Quantifizierung der mRNA-Kopien von Rab11a und Rab11b werden die mittleren Z_M -Werte (Z_M : Zyklenzahl in der Mitte des linearen Amplifikationsbereiches) beider mRNAs in Abhängigkeit der eingesetzten cDNA miteinander verglichen (Abb 3.3). Dazu werden die Z_M -Werte in Abhängigkeit der logarithmierten cDNA-Mengen graphisch aufgetragen und für jede mRNA eine lineare Regression erstellt. In beiden Fällen ergab sich eine Gerade mit einer Steigung von $3,6 \pm 0,1$. Dies zeigt, dass beide Amplifikationen mit den getesteten Mengen von cDNA die gleiche Effizienz besitzen und damit direkt miteinander vergleichbar sind. Unabhängig der cDNA-Menge ergibt sich für die Real-Time-PCR-Läufe, dass Rab11a einen gegenüber Rab11b um $1,5 \pm 0,2$ erhöhten Z_M -Wert besitzt. Das bedeutet also, dass Rab11a erst $1,5 \pm 0,2$ Real-Time-PCR-Zyklen später die gleiche mRNA-Kopienzahl besitzt wie Rab11b und daher die Kopienzahl der Rab11b-mRNA um den Faktor $3,0 \pm 0,4$ gegenüber der Rab11a-mRNA in H9c2-hIR-Zellen erhöht ist.

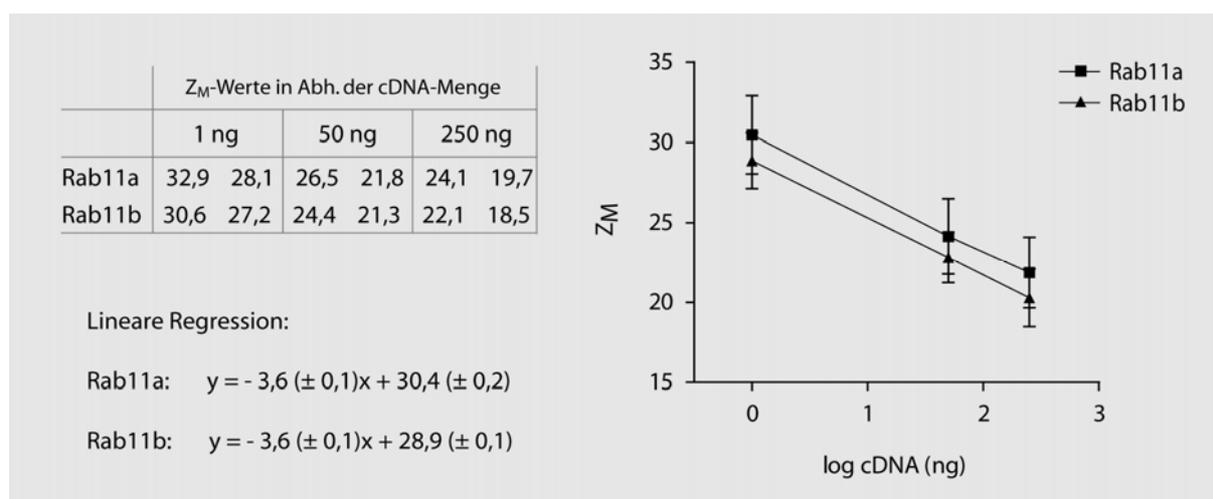


Abb. 3.3 : Auswertung der Z_M -Werte aus zwei Läufen. Die Z_M -Werte der Real-Time-PCR von Rab11a und Rab11b wurden in Abhängigkeit der eingesetzten cDNA-Menge aufgetragen und eine lineare Regression erstellt. Jeder einzelne Z_M -Wert stellt den Mittelwert einer Triplet-Messung dar.

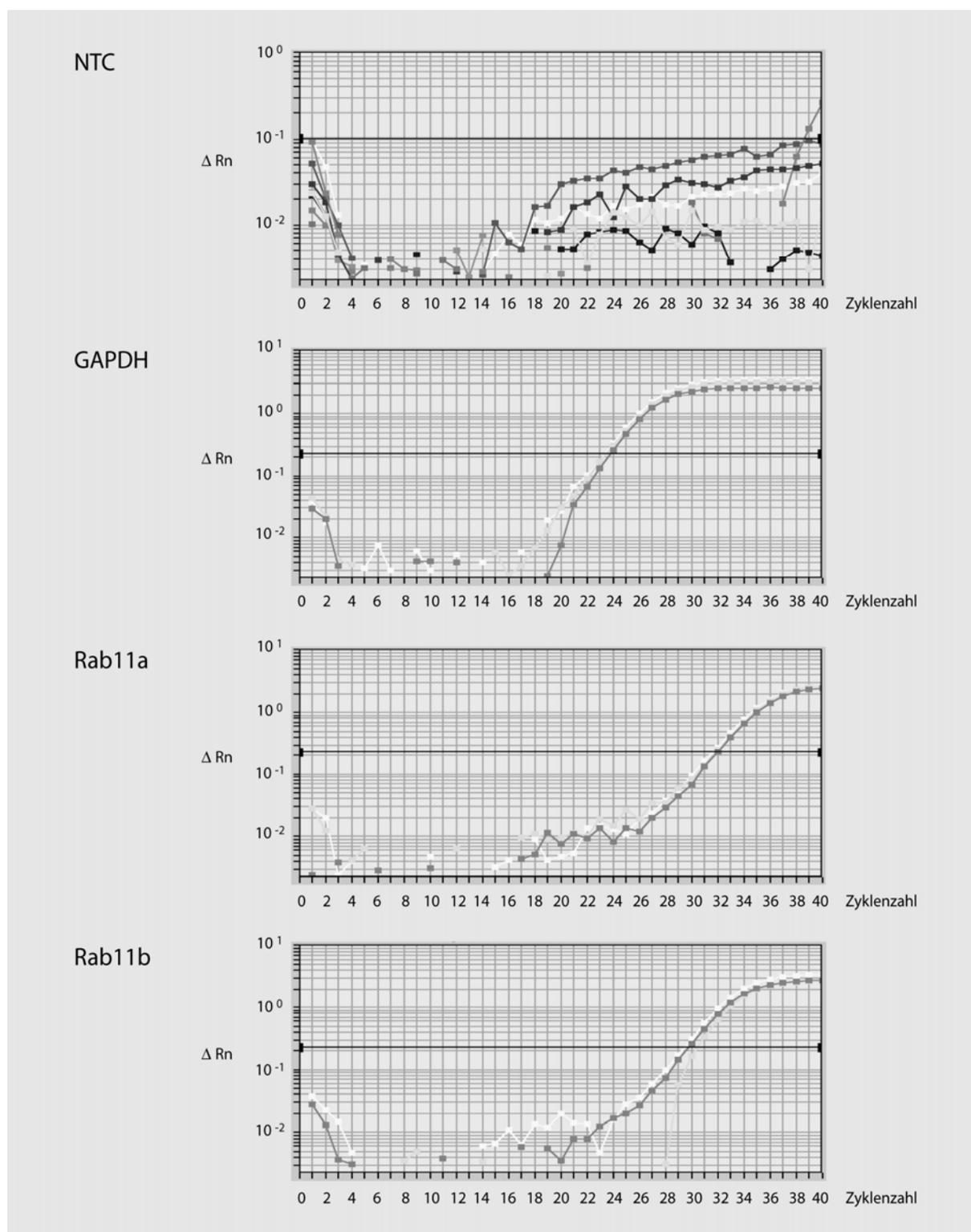


Abb. 3.4 : Amplifikation der mRNA von Rab11a und Rab11b durch Real-Time-PCR. Ausgenommen der Negativ-Kontrolle (NTC) wurde jeweils 1 ng der aus Gesamt-RNA neu synthetisierten cDNA aus H9c2-hIR-Zellen eingesetzt. Mittels Exon-Exon-überspannenden Primern wurden spezifisch die mRNAs von Rab11a und Rab11b amplifiziert, als endogene Positivkontrolle diente die Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH). Als Vergleichsgröße wurde die Zykluszahl Z_m bestimmt, die in der Mitte des linearen Amplifikationsbereiches liegt. Rn: normalisiertes Reportersignal. Darstellung eines repräsentativen Real-Time-PCR-Laufs.

3.2 Insulinabhängige Aktivierung von Rab11a

Es konnte gezeigt werden, dass Rab11a nach der Stimulation mit Insulin in GLUT4-enthaltenden Vesikeln akkumuliert und mit dem GLUT4 zur Plasmamembran verschoben wird (Kessler et al., 2000). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Rab11a in diesem Prozess der Translokation eine regulatorische Funktion einnimmt (Uhlig et al., 2005). Um zu klären, ob Rab11a dabei von Insulin aktiviert, also GTP-beladen wird, sollte Rab11a in H9c2-hIR-Zellen überexprimiert und *in vivo* die GTP-Beladung durch Insulin gemessen werden.

3.2.1 Klonierung pCMV-HA-Rab11a

Mit dem Ziel, Rab11a in H9c2-hIR-Zellen zu überexprimieren und nach einer Stimulation aus dem Lysat zu immunopräzipitieren, wurde ein Überexpressionsplasmid kloniert, welches strangaufwärts der cDNA für Rab11a eine für Hämagglutinin kodierende Sequenz trägt. Als Ausgangsmaterial diente ein modifizierter pCMV-Vektor, der von Dr. M. Stosik zur Verfügung gestellt wurde (Abb. 3.5).

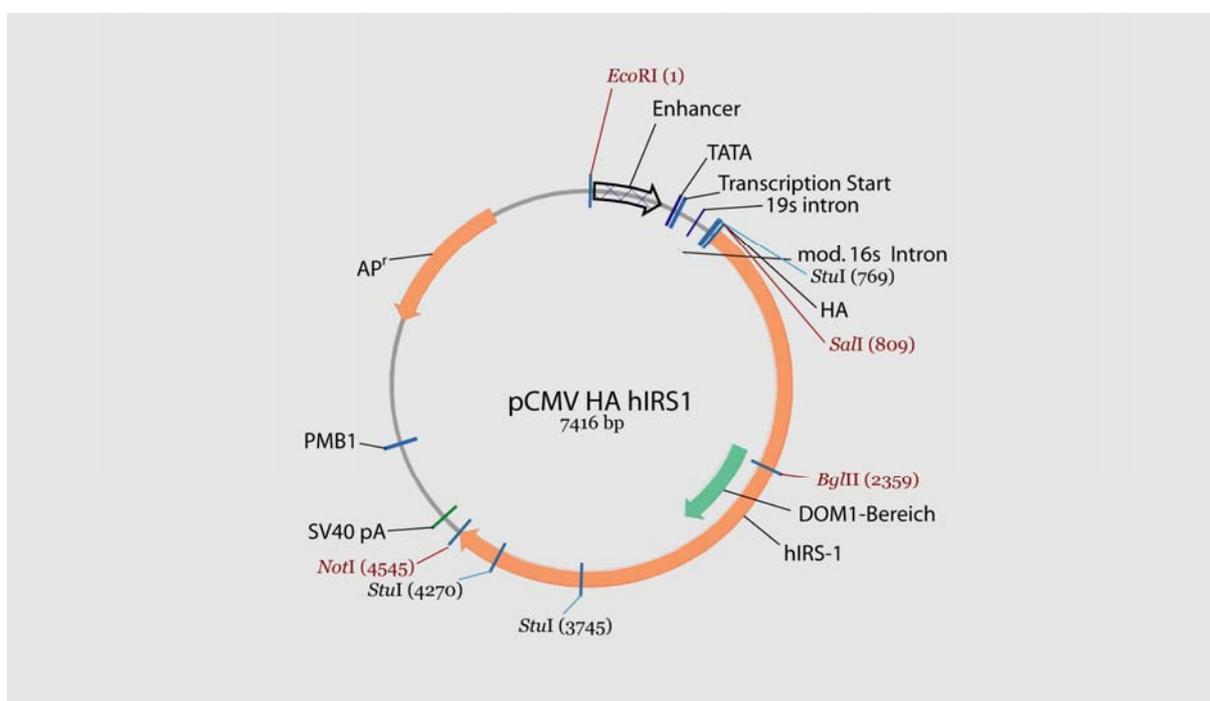


Abb. 3.5 : Vektorkarte pCMV-HA-hIRS1. Durch die strangaufwärts der hIRS1-cDNA insertierte HA-Box wird nach der Transfektion in eine eukaryontischen Zelllinie ein Protein exprimiert, welches am N-Terminus einen Hämagglutinin (HA) Rest trägt. Mit einem Antikörper gegen dieses HA-Epitop kann das Protein nach der Lyse immunopräzipitiert werden.

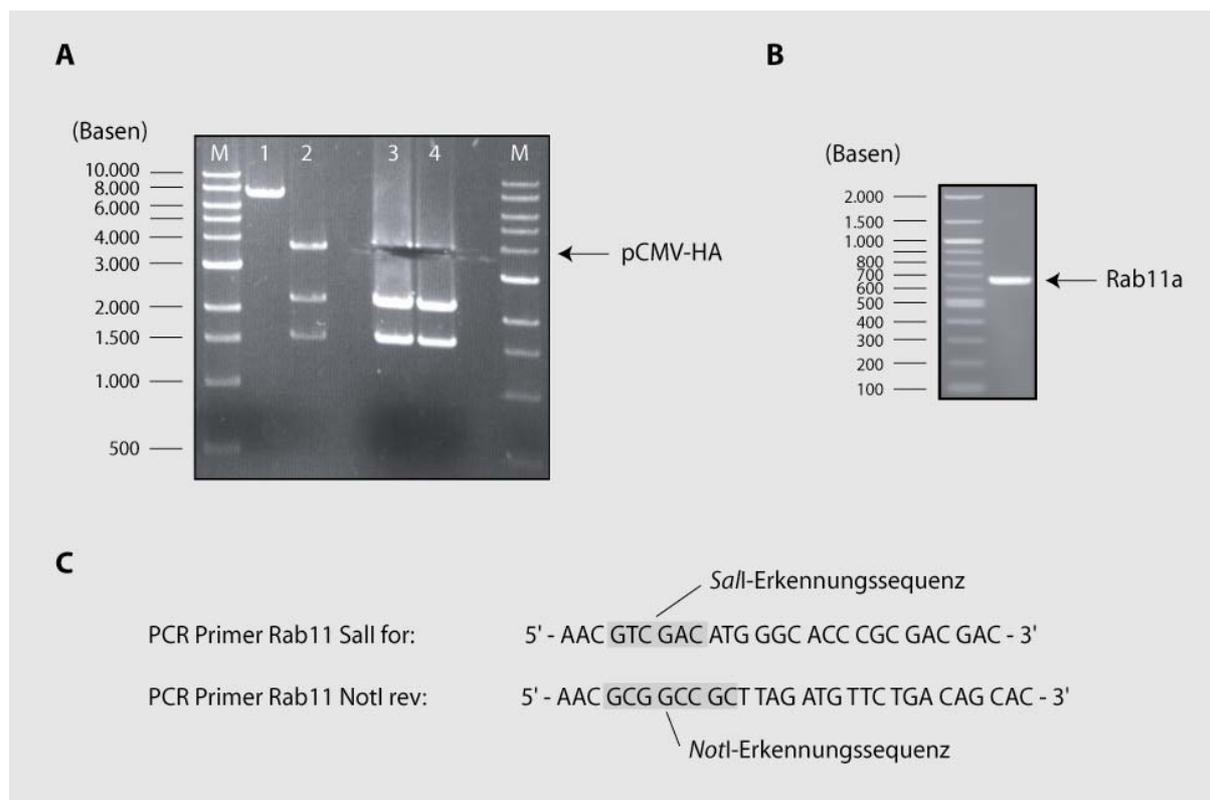


Abb. 3.6 : Aufreinigung Vektor pCMV-HA und PCR-Produkt Rab11a. (A) Nach der restriktionsendonukleolytischen Spaltung mit *BglII*, *SalI* und *NotI* wurde der Ansatz mit 3,5 μ g pCMV-HA-hIRS1 in einem 1,5 %igen Agarose-Gel aufgetrennt und die Bande mit dem Vektor-Rückgrat (3.680 bp) aufgereinigt. M: DNA-Größenstandard, 1: mit *NotI* linearisierter pCMV-HA-hIRS1, 2-4: mit *BglII*, *SalI* und *NotI* geschnittener pCMV-HA-hIRS1. (B) PCR-Produkt Rab11a aus pCMV-Rab11a. Das PCR-Produkt hat eine Länge von 660 bp, Auftrennung in einem 1,5 %igen Agarose-Gel. (C) PCR-Primer für Rab11a. Um das PCR-Produkt gerichtet in den linearisierten pCMV-HA-Vektor zu ligieren, tragen die PCR-Primer überhängende Erkennungssequenzen für *SalI* bzw. *NotI*.

Um in einem ersten Schritt die für hIRS1-kodierende cDNA zu entfernen, wurde mittels der Restriktionsendonukleasen *BglII* und *SalI* der 3,5 μ g des Vektors geöffnet (2.2.7) und nach der Aufreinigung (2.2.6) ein weiteres mal mit *NotI* geschnitten. Nach diesen endonukleolytischen Spaltungen des Vektors müssen Fragmente der Größen 1.550, 2.186 und 3.680 bp entstanden sein, dabei stellt das Fragment der Größe von 3.680 bp das Rückgrat des Vektors dar, welches für die Klonierung des HA-Rab11a-Konstruktes benötigt wird. Nach der Auftrennung der Fragmente im Agarosegel (2.2.10) wurden die Bande mit der Größe von 3.680 bp daher ausgeschnitten und aufgereinigt (2.2.6, Abb. 3.6, A).

Die für Rab11a der Spezies Ratte kodierende cDNA stammte aus dem Plasmid pCMV-Rab11a von Dr. M. Uhlig. Um die cDNA gerichtet in den mit *SalI*- und *NotI*-Enden linearisierten Vektor pCMV-HA zu ligieren, wurden zur Amplifikation der Rab11a-cDNA mittels PCR (2.2.1) überhängende Primer verwendet, welche die Erkennungssequenzen für

die entsprechenden Restriktasen tragen (Abb 3.6, B-C). Nach der restriktionsendonukleolytischen Spaltung des PCR-Produktes und der anschließenden Aufreinigung, konnte das erhaltene Fragment gerichtet in den linearisierten pCMV-HA-Vektor ligiert werden (2.2.3).

Direkt im Anschluss an die Ligation wurden *E. coli* Top10-Zellen mit 1 μ l des Ligationsansatzes transformiert (2.2.4). Nach dem Picken mehrerer Klone und DNA-Minipräparationen (2.2.5) wurden positive Klone über Restriktionsanalysen mit *Xba*I identifiziert. Mit einem der positiven Klone wurden dann DNA-Maxipräparationen durchgeführt (2.2.5). Um sicherzustellen, dass das Expressionsprodukt im eukaryontischen Zellsystem ausschließlich das HA-gekoppelte Rab11a ist und nicht zusätzlich ungekoppeltes Enzym exprimiert wird, wurde das Startcodon ATG (Met) der cDNA von Rab11a im Plasmid pCMV-HA-Rab11a durch Mutagenese-PCR (2.2.2) in CTG (Leu) umgeschrieben.

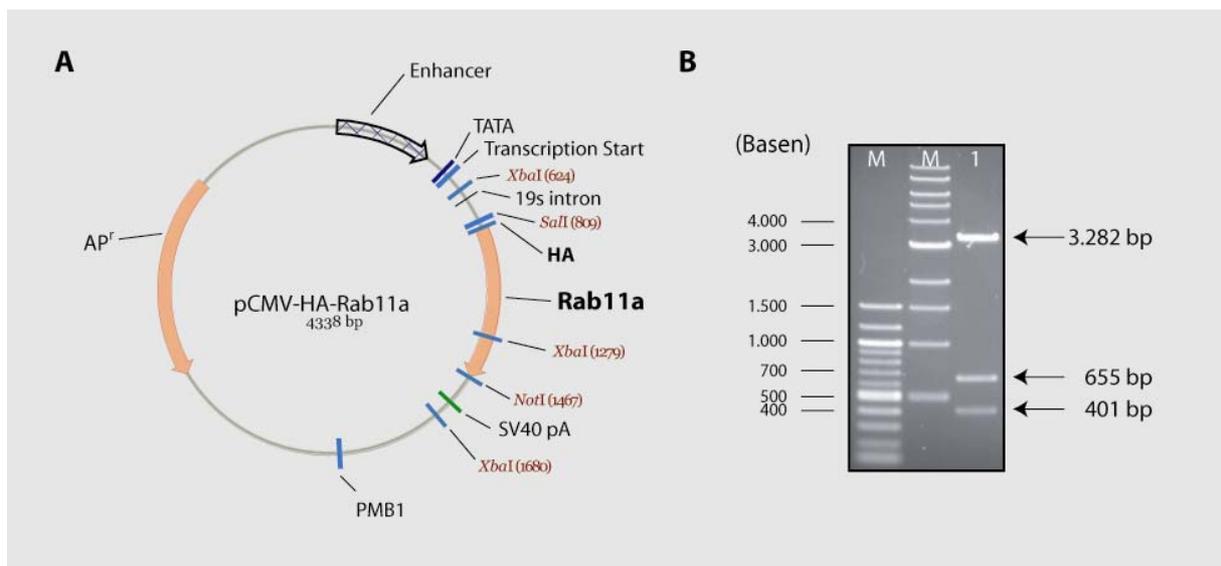


Abb. 3.7 : Vektorkarte pCMV-HA-Rab11a und Restriktionsanalyse. (A) Die cDNA für Rab11a wurde über *Sal*I und *Not*I in den pCMV-HA-Vektor ligiert. (B) Die Restriktion mit *Xba*I ergibt drei Fragmente mit den Längen 401, 655 und 3.282 bp. Auftrennung in einem 1,5 %igem Agarose-Gel. bp: Basenpaare.

3.2.2 Expression von HA-Rab11a in H9c2-hIR-Zellen und Immunopräzipitation

Das Plasmid pCMV-HA-Rab11a wurde mittels FuGene6-Transfektion in H9c2-hIR-Zellen transfiziert (2.3.3.1). Als Kontrollvektor diente das kommerziell erhältliche Ausgangsplasmid pCMV β . Die Zellen wurden nach der Transfektion 24 - 72 h kultiviert und anschließend lysiert (2.4.1). 10 μ g der Lysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt (2.4.3) und über

Western-Blot-Analyse (2.4.4) mit einem spezifischen Antikörper gegen Rab11a detektiert (2.4.5). Die maximale Überexpression von HA-gekoppeltem Rab11a im Vergleich zum endogenen Rab11a wurde nach 48 h mit einem Faktor von $16,7 \pm 0,7$ erreicht (Abb. 3.8). Trotz des Basenaustausches im Startcodon von Rab11a wurde neben dem HA-gekoppeltem Rab11a auch ungekoppeltes Protein um den Faktor $4,6 \pm 0,9$ gegenüber der untransfizierten Kontrolle überexprimiert.

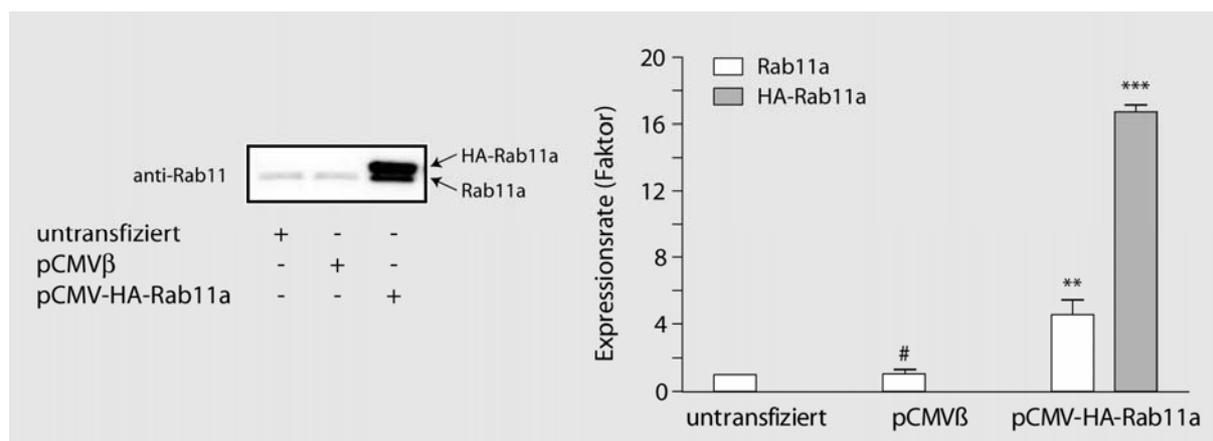


Abb. 3.8 : Überexpression HA-Rab11a in H9c2-hIR-Zellen. pCMV-HA-Rab11a wurde mittels FuGene6 in H9c2-hIR-Zellen transfiziert und über 48 h exprimiert. Als Kontrolle diente die Transfektion mit pCMVβ. Auftrennung der Lysate durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse mittels spezifischer Antikörper. Darstellung eines repräsentativen Blots (# $P > 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ SEM im Vergleich zur untransfizierten Kontrolle, $n=4$).

Mittels eines immobilisierten anti-HA-Antikörpers konnte das HA-Rab11a aus dem Lysat immunopräzipitiert werden (2.3.5). Dabei wurde das HA-gekoppelte Rab11a vollständig aus dem Lysat entfernt (Abb. 3.9).

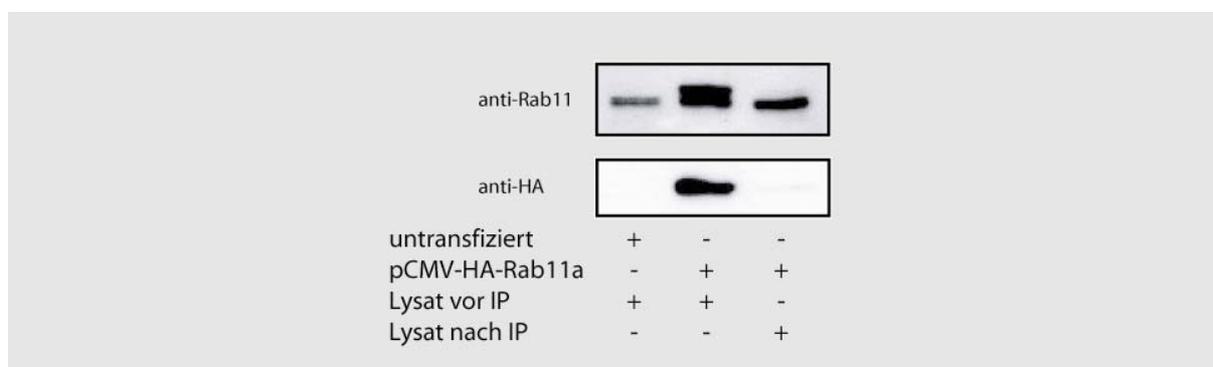


Abb. 3.9 : Immunopräzipitation HA-Rab11a. Das überexprimierte, HA-gekoppelte Rab11a wurde mittels eines immobilisierten anti-HA-Antikörpers vollständig aus dem Lysat immunopräzipitiert. Auftrennung der Lysate durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse mittels spezifischer Antikörper. Darstellung eines repräsentativen Blots.

3.2.3 Elektroporation von H9c2-hIR-Zellen

Mit dem Ziel, eine Aktivierung, das heißt eine GTP-Beladung von HA-Rab11a in der intakten Zelle zu beobachten, musste ein GTP-Analogon in H9c2-hIR-Zellen eingebracht werden. Das verwendete Analogon war das GTP- $[\gamma]$ -AA-Biotin-LC-Hydrazon (Abb. 3.10, A). Zum einen trägt es eine photoaktive Azidoanilid-Gruppe am γ -Phosphat, welche durch UV-Bestrahlung mit 254 nm eine kovalente Bindung zu einem angelagerten Protein bildet, zum anderen kann es durch seinen Biotin-Rest mittels Western-Blot-Analyse und einem anti-Biotin-Antikörper spezifisch detektiert und quantifiziert werden.

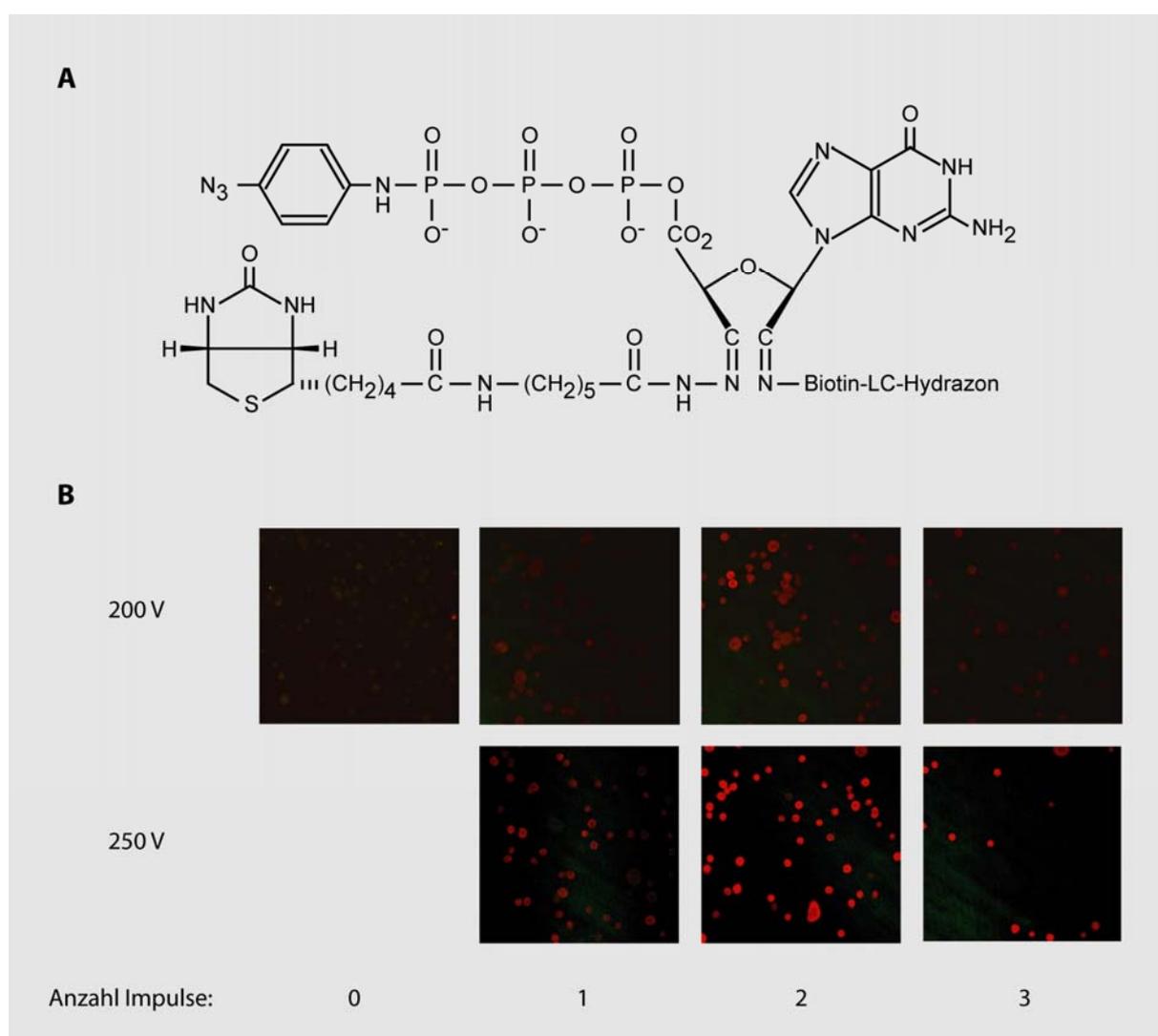


Abb. 3.10 : Elektroporation von H9c2-hIR-Zellen. (A) Das GTP-Analogon GTP- $[\gamma]$ -AA-Biotin-LC-Hydrazon trägt zur kovalenten Bindung eine photoaktive Gruppe am γ -Phosphat und einen Biotin-Rest zur Detektion. (B) Die Zellen wurden in Anwesenheit von 10 $\mu\text{g/ml}$ Propidiumiodid elektroporiert. Um die optimalen Elektroporationsbedingungen zu bestimmen, wurden die Spannung und die Zahl der Impulse bei konstanter Kapazität variiert und die Inkorporation von Propidiumiodid mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert.

Um das GTP-Analogon in die Zellen zu transportieren, mussten diese elektroporiert werden. Die optimalen Bedingungen für die Elektroporation am Gene Pulser II wurden über die Inkorporation von Propidiumiodid mittels Fluoreszenzmikroskopie bestimmt (Abb 3.10). Variiert wurden dabei die Spannung und die Anzahl der Impulse bei konstanter Kapazität von 500 μF . Als optimale Elektroporationsbedingungen für H9c2-hIR-Zellen wurden 250 V mit 500 μF und zwei Impulsen bestimmt.

Für die Stimulation mit Insulin werden H9c2-hIR-Zellen üblicherweise ein bis zwei Stunden vor der Stimulation mit FCS-freiem Medium gehungert. Um die Zeit zwischen Elektroporation und Stimulation möglichst gering zu halten, musste entschieden werden, die Zellen direkt nach der Elektroporation in Komplettmedium zu resuspendieren und nur kurz FCS-frei zu setzen oder die Zellen direkt in FCS-freiem Medium zu resuspendieren.

Es zeigte sich allerdings, dass die Zellen nach der Elektroporation in Kulturmedium resuspendiert werden müssen, da ansonsten nur ca. 10 % der Zellen nach einer Stunde wieder adhären wurden (Abb. 3.11, A). Ausserdem konnte gezeigt werden, dass eine anschließende Hungerphase von nur 15 Minuten ausreicht, um eine hochsignifikante insulinstimulierte Aktivierung der Akt in H9c2-hIR-Zellen zu erreichen (Abb. 3.11, B).

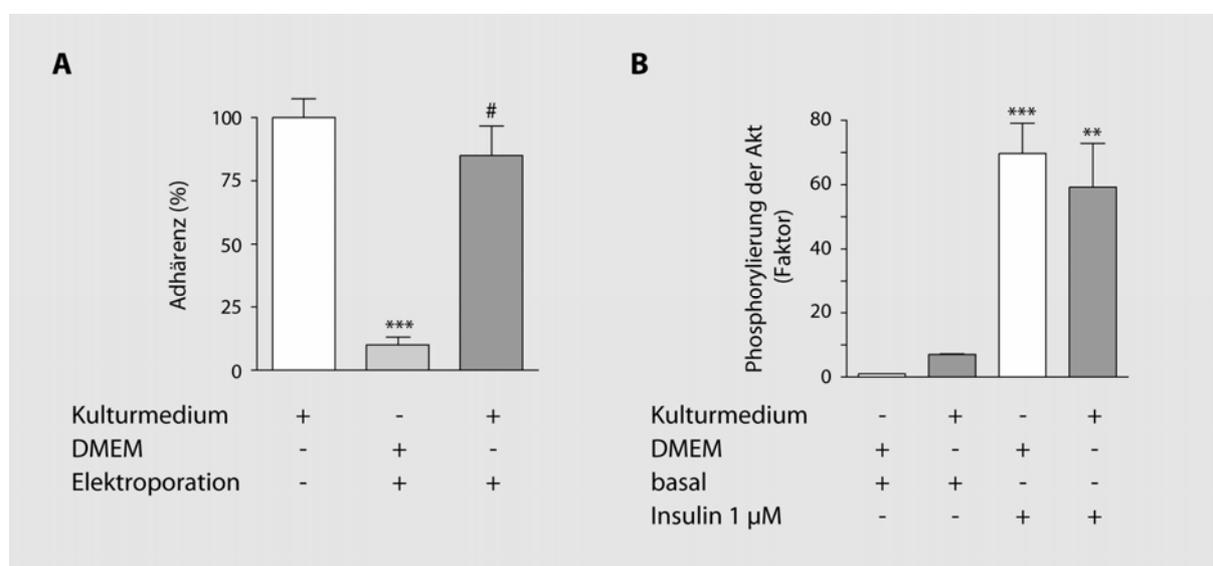


Abb. 3.11 : Adhärenz und Akt-Aktivierung nach der Elektroporation. (A) Nach der Elektroporation wurden die Zellen in Kulturmedium bzw. FCS-freiem DMEM resuspendiert und die Adhärenz 1 h später bestimmt. (B) Zur Bestimmung der Akt-Aktivierung wurden die Zellen nach der Elektroporation 1 h in Kulturmedium bzw. DMEM resuspendiert, 15 Minuten in DMEM gehungert und anschließend fünf Minuten lang mit 1 μM Insulin stimuliert. Auftrennung der Lysate durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse mittels spezifischer Antikörper (# $P > 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ SEM im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle, $n=3$).

Hierfür wurden die Zellen nach 15minütiger Inkubation mit DMEM fünf Minuten lang mit 1 μ M Insulin stimuliert und anschließend lysiert (2.4.1). 10 μ g der Lysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt (2.4.3) und über Western-Blot-Analyse (2.4.4) mit einem spezifischen Antikörper gegen phospho-Akt (Ser₄₇₃) detektiert (2.1.4).

3.2.4 Insulinkinetik der Rab11a-Aktivierung

Zur Bestimmung einer zeitabhängigen GTP-Beladung von Rab11a wurden H9c2-hIR-Zellen 24 h nach Aussaat mit pCMV-HA-Rab11a transfiziert (2.3.3.1) und 48 h nach der Transfektion in Anwesenheit von 45 μ M GTP-[γ]-AA-Biotin-LC-Hydrazon elektroporiert (3.2.3). Nach der Reinkultivierungs- und Hungerphase wurden die Zellen mit 1 μ M Insulin stimuliert und nach diskreten Zeitpunkten die Stimulation terminiert. Dazu wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen, gebundenes GTP-[γ]-AA-Biotin-LC-Hydrazon durch UV-Strahlung (254 nm) fixiert und die Zellen durch Zugabe von Lysepuffer lysiert (2.4.1).

Die Lysate wurden auf gleiche Proteinmenge in 1 ml Lysepuffer eingestellt und das HA-Rab11a immunpräzipitiert (2.3.5). Anschließend wurden die Lysate zusammen mit den Immunpräzipitaten mittels SDS-PAGE aufgetrennt (2.4.3). Durch Western-Blot-Analyse (2.4.4) mit anschließender ECL-Detektion (2.4.5) wurden über spezifische Antikörper Rab11a und das Biotin des GTP-[γ]-AA-Biotin-LC-Hydrazon nachgewiesen (Abb. 3.12). Zur Quantifizierung wurde das Biotin-Signal auf die Menge an immunpräzipitierten HA-Rab11a normiert.

Dabei zeigte sich, dass die maximale GTP-Beladung von HA-Rab11a um den Faktor 2,3 (\pm 0,3) gegenüber dem Basalwert erhöht ist ($P < 0,05$, $n = 5$). Dieses Maximum wird nach circa vier Minuten erreicht und geht in den folgenden Minuten wieder auf den Basalwert zurück. Dabei folgt der Zeitverlauf der GTP-Bindung von HA-Rab11a der insulinstimulierten Ser₄₇₃-Phosphorylierung der Akt mit einer Verzögerung von circa 1,5 Minuten. Im Gegensatz zur HA-Rab11a-Aktivierung bleibt die Aktivierung der Akt in Anwesenheit von Insulin allerdings konstant maximal. Dies zeigt deutlich, dass Rab11a nach der Aktivierung durch einen circa vierminütigen Insulinstimulus unabhängig der Präsenz von Insulin und der Aktivierung der Akt wieder inaktiviert wird.

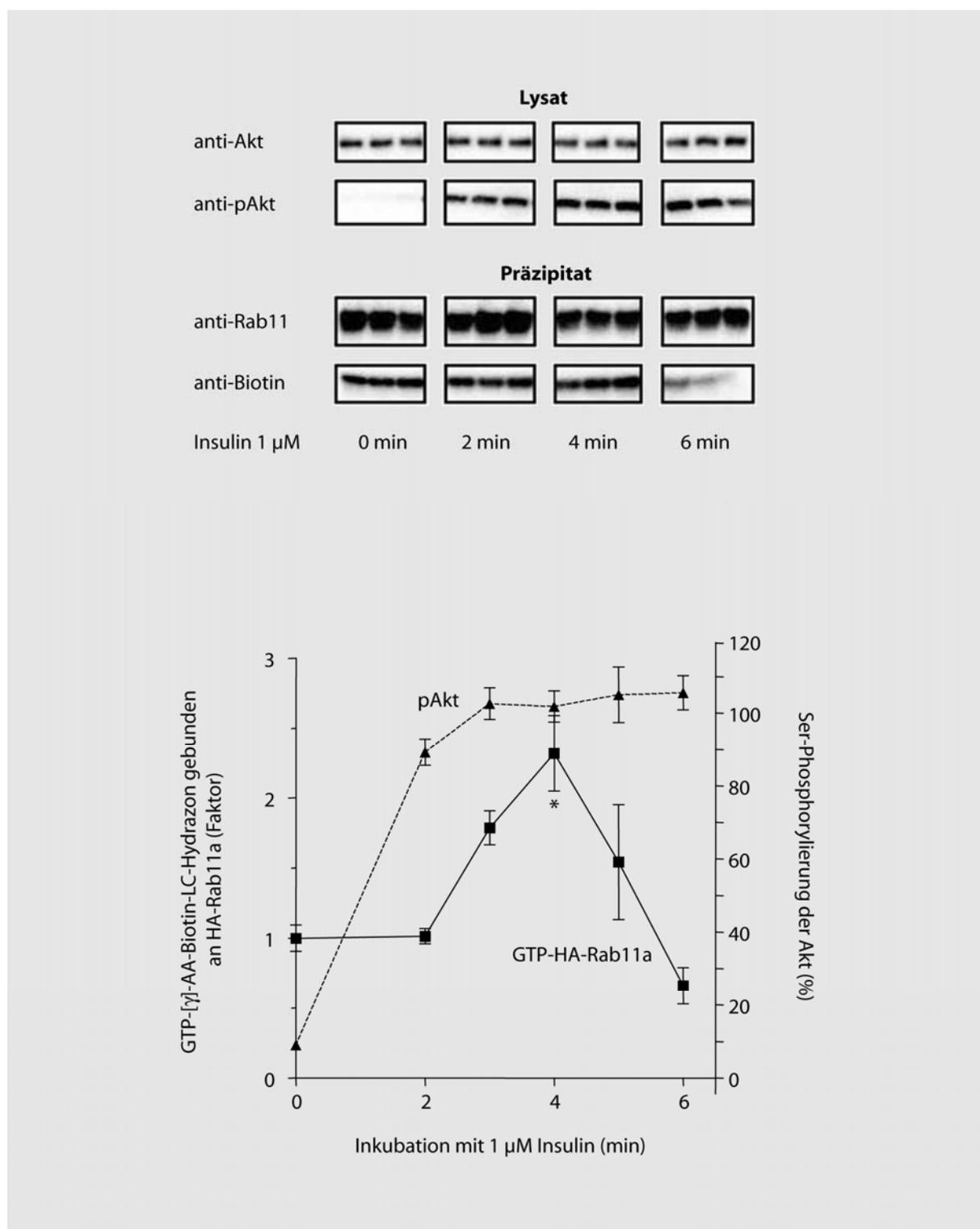


Abb. 3.12 : Insulinkinetik der GTP-Beladung von HA-Rab11a. Nach der Elektroporation in Anwesenheit von GTP-[γ]-AA-Biotin-LC-Hydrazon und der darauf folgenden Reaktivierungs- und Hungerphase wurden die HA-Rab11a transient überexprimierenden H9c2-hIR-Zellen mit Insulin stimuliert und zu verschiedenen Zeitpunkten mit UV-Licht bestrahlt und lysiert. Die Lysate wurden aufgearbeitet und HA-Rab11a immunopräzipitiert. Auftrennung der Lysate und Immunpräzipitate durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse mittels spezifischer Antikörper. Darstellung eines repräsentativen Blots (* $P < 0,05$ SEM im Vergleich zu $t = 0$ min, $n = 5$).

3.2.5 Hemmung der PI3-Kinase und Rab11a-Aktivierung

Um zu überprüfen, ob das Signal zur insulinabhängigen Aktivierung von Rab11a über den PI3-Kinase-Signalweg vermittelt wird, wurden die in Anwesenheit von GTP- $[\gamma]$ -AA-Biotin-LC-Hydrazon elektroporierten H9c2-hIR-Zellen fünf Minuten vor dem Insulinstimulus mit 20 μ M LY294002 inkubiert. Dieser PI3-Kinasen-Inhibitor verhindert die insulinabhängige Phosphorylierung der PI3-Kinase und terminiert dadurch die Weiterleitung des Insulinsignals. Diese Inhibition wurde über die insulinabhängige Ser₄₇₃-Phosphorylierung der Akt überprüft (Abb. 3.13).

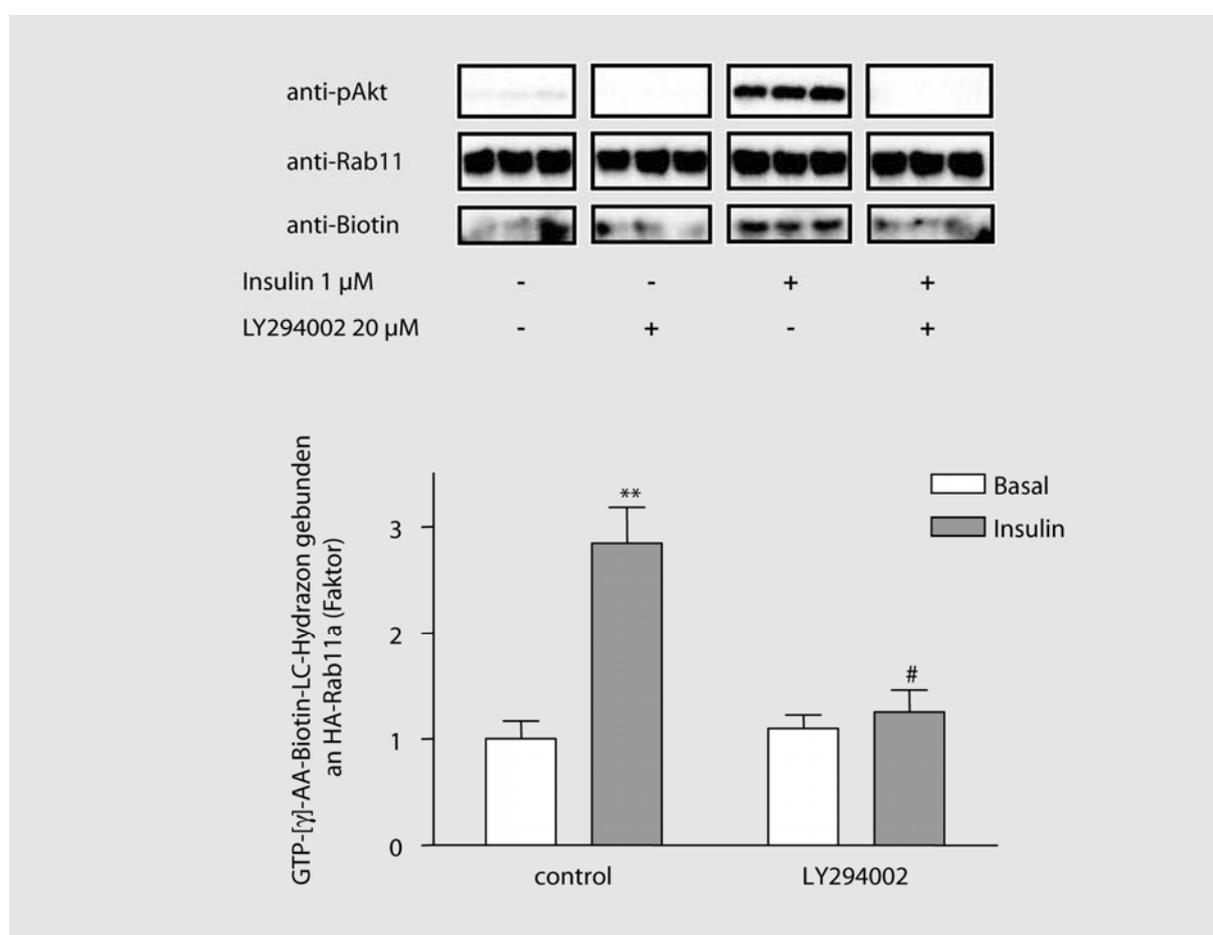


Abb. 3.13 : Hemmung der PI3-Kinase und GTP-Beladung von HA-Rab11a. Nach der Elektroporation in Anwesenheit von GTP- $[\gamma]$ -AA-Biotin-LC-Hydrazon und der darauf folgenden Reultivierungs- und Hungerphase wurden die HA-Rab11a transient überexprimierenden H9c2-hIR-Zellen zuerst mit 20 μ M LY294002 inkubiert und anschließend mit Insulin stimuliert. Nach vier Minuten wurden die Zellen mit UV-Licht bestrahlt und lysiert. Die Lysate wurden aufgearbeitet und HA-Rab11a immunopräzipitiert. Auftrennung der Lysate und Immunopräzipitate durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse mittels spezifischer Antikörper. Darstellung eines repräsentativen Blots (** P < 0,01, # P > 0,05 SEM im Vergleich zum entsprechenden Basalwert, n = 3).

Da das Maximum der GTP-Beladung von HA-Rab11a nach vier Minuten erreicht wird, wurde diese Zeit als Standard-Inkubationszeit für die insulinabhängige GTP-Beladung von HA-Rab11a verwendet. Nach diesem vierminütigen Insulinstimulus wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen, gebundenes GTP-[γ]-AA-Biotin-LC-Hydrazon durch UV-Bestrahlung fixiert und die Zellen durch Zugabe von Lysepuffer lysiert (2.4.1). Nach der Lyse wurde das HA-Rab11a immunopräzipitiert (2.3.5) und die Lysate als auch die Immunopräzipitate mittels SDS-PAGE (2.4.3) aufgetrennt. Durch Western-Blot-Analyse (2.4.4) mit anschließender ECL-Detektion (2.4.5) wurden über spezifische Antikörper pAkt (Ser₄₇₃), Rab11a und das Biotin des GTP-[γ]-AA-Biotin-LC-Hydrazon nachgewiesen. Während die Stimulation mit Insulin zu einer 2,8 (\pm 0,4) -fachen GTP-Beladung von HA-Rab11a in der Kontrollsituation führt, wird durch Hemmung der PI3-Kinase mit LY294002 die Aktivierung von HA-Rab11a komplett verhindert (Abb. 3.13, n = 3).

3.2.6 Genrepression von Akt und Rab11a-Aktivierung

Um den Signalweg der insulininduzierten GTP-Beladung von HA-Rab11a genauer zu spezifizieren, wurde Akt mittels siRNA-vermittelter Genrepression ausgeschaltet. Dazu wurden H9c2-hIR-Zellen sechs Stunden nach Aussaat mit nicht kodierender siRNA (n.c. siRNA, UUCUCCGAACGUGUCACGUdtdt) und Akt siRNA (UGCCCUUCUACAACCA-GGAdTdT) transfiziert (2.3.3.2) und 72 Stunden nach Aussaat lysiert (2.4.1). 10 μ g der Lysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt (2.4.3). Durch Western-Blot-Analyse (2.4.4) mit anschließender ECL-Detektion (2.4.5) wurden über spezifische Antikörper Akt und pAkt (Ser₄₇₃) nachgewiesen (Abb. 3.14, A). Durch diesen Ansatz konnte die Expression der Akt in H9c2-hIR-Zellen auf 9,3 (\pm 1,5) % verringert werden (Abb. 3.14, B). Diese Effizienz der Genrepression von Akt verringert das Signal der insulinstimulierten Akt-Phosphorylierung auf 25,9 (\pm 6,0) % (Abb. 3.14, C, n = 2). Im nächsten Schritt wurde diese Genrepression von Akt auf die Versuche zur GTP-Beladung von HA-Rab11a übertragen. Dazu wurde neben der Transfektion der siRNA 24 Stunden nach der Aussaat pCMV-HA-Rab11a in die Zellen transfiziert (2.3.3.1). 48 Stunden nach der Plasmid-Transfektion wurden die Zellen in Anwesenheit von 45 μ M GTP-[γ]-AA-Biotin-LC-Hydrazon elektroporiert (3.2.3). Nach der Rekultivierungs- und Hungerphase wurden die Zellen mit 1 μ M Insulin stimuliert und nach vier Minuten die Stimulation terminiert. Dazu wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen, gebundenes GTP-[γ]-AA-Biotin-LC-Hydrazon durch UV-Bestrahlung (254 nm) fixiert und

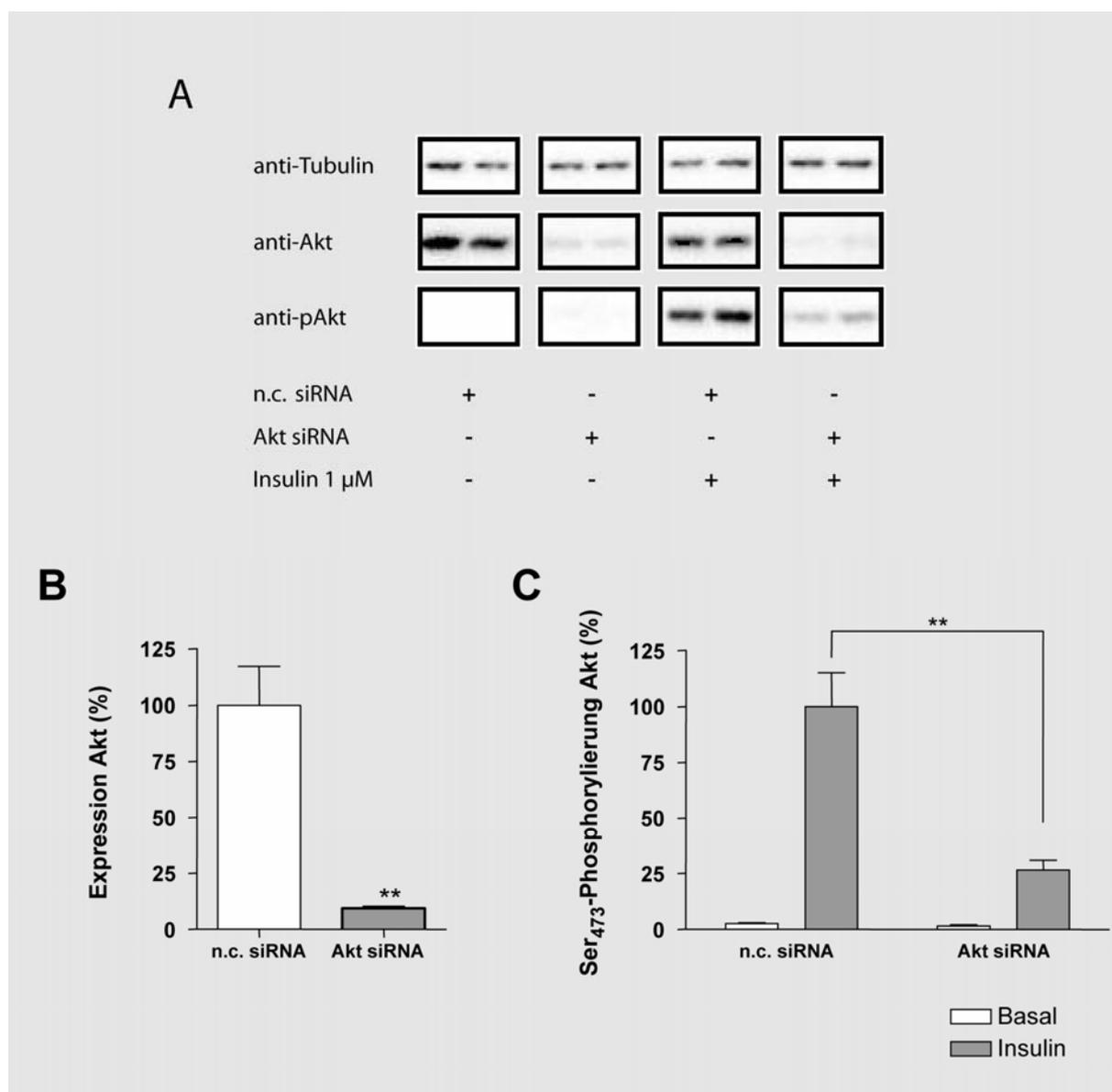


Abb. 3.14 : Genrepression von Akt und Einfluss auf das Insulinsignal. H9c2-hIR-Zellen wurden sechs Stunden nach Aussaat mit nicht kodierender siRNA (n.c. siRNA) bzw. Akt siRNA transfiziert und 72 Stunden nach Aussaat mit Insulin stimuliert. Auftrennung der Lysate durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse mittels spezifischer Antikörper. Darstellung eines repräsentativen Blots (** P < 0,01 SEM, n = 3).

die Zellen durch Zugabe von Lysepuffer lysiert (2.4.1). Nach der Lyse wurde das HA-Rab11a immunopräzipitiert (2.3.5) und die Lysate als auch die Immunopräzipitate mittels SDS-PAGE (2.4.3) aufgetrennt. Durch Western-Blot-Analyse (2.4.4) mit anschließender ECL-Detektion (2.4.5) wurden über spezifische Antikörper Akt, pAkt (Ser₄₇₃), Rab11a und das Biotin des GTP-[γ]-AA-Biotin-LC-Hydrazon nachgewiesen. In der Kontrollsituation mit n.c. siRNA führt die Stimulation mit Insulin zu einer GTP-Beladung von HA-Rab11a um den Faktor 2,2 (\pm 0,4), durch die Genrepression der Akt wird das insulinabhängige Signal zur Aktivierung von HA-Rab11a komplett unterdrückt (Abb. 3.15, n = 3).

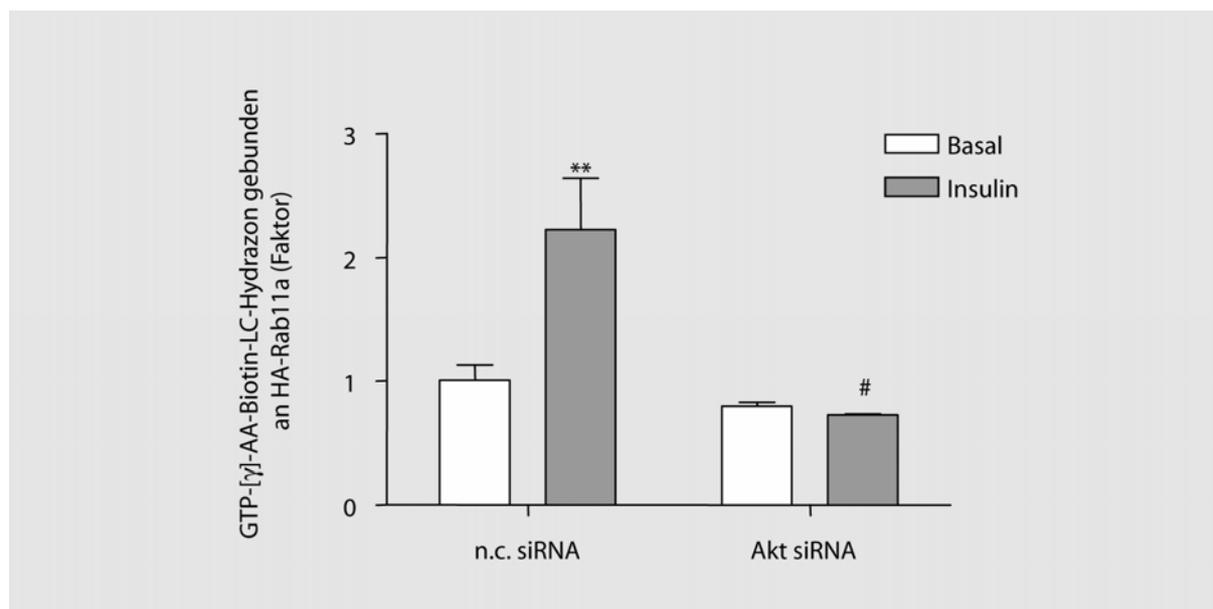


Abb. 3.15 : Genrepression von Akt und GTP-Beladung von HA-Rab11a. Transient HA-Rab11a überexprimierende H9c2-hIR-Zellen, in denen die Akt mittels siRNA-vermittelter Genrepression ausgeschaltet worden war, wurden in Anwesenheit von GTP-[γ]-AA-Biotin-LC-Hydrazon elektroporiert. Nach der darauf folgenden Re kultivierungs- und Hungerphase wurden die Zellen mit Insulin stimuliert und nach vier Minuten mit UV-Licht bestrahlt und lysiert. Die Lysate wurden aufgearbeitet und HA-Rab11a immunopräzipitiert. Auftrennung der Lysate und Immunpräzipitate durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse mittels spezifischer Antikörper (** $P < 0,01$, # $P > 0,05$ SEM im Vergleich zum entsprechenden Basalwert, $n = 3$).

3.3 Die Regulation der GLUT4- und FAT/CD36-Translokation durch Rab11a und seine Effektoren

3.3.1 Transiente Genrepression von Rab11a, Rip11 und Rab11-FIP2

Um die Funktion von Rab11a in Translokationsprozessen von GLUT4-enhaltenden Vesikeln und FAT/CD36-enhaltenden Vesikeln genauer zu spezifizieren, wurde die GTPase mittels siRNA-induzierter Genrepression in H9c2-hIR-Zellen ausgeschaltet. Da die Funktion als auch die intrazelluläre Lokalisation von Rab11a durch Rab11a-Effektorproteine gesteuert ist, sollten auch die Rab11a-Effektoren Rip11 und Rab11-FIP2 im gleichen Zellsystem reprimiert werden. Hierfür wurden doppelsträngige siRNA-Oligonukleotide kodierend gegen Rab11a (UGUCAGACAGACGUGAAAAdTdT), Rip11 (GCGGACUGGAGAGGCUCAAGAdTdT) und Rab11-FIP2 (GUCUAGCACUGUAGGCCCAAdTdT) der Spezies Ratte in H9c2-hIR-Zellen transfiziert (2.3.3.2).

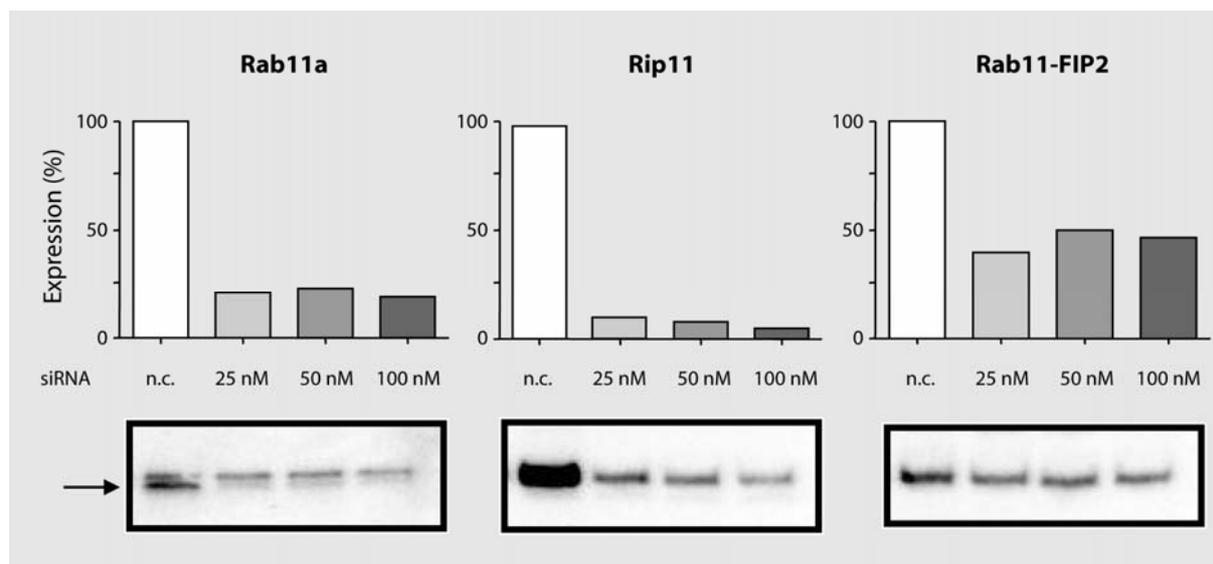


Abb. 3.16 : Genrepression von Rab11a, Rip11 und Rab11-FIP2 in H9c2-hIR-Zellen nach 48 Stunden. H9c2-hIR-Zellen wurden 24 Stunden nach Aussaat mit nicht kodierender siRNA (n.c. siRNA, 50 nM), Rab11a siRNA, Rip11 siRNA und Rab11-FIP2 siRNA unterschiedlicher Konzentrationen transfiziert und 48 Stunden später lysiert. Auftrennung der Lysate durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse mittels spezifischer Antikörper. Darstellung eines repräsentativen Western Blots.

48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert (2.4.1) und die Lysate mittels SDS-PAGE (2.4.3) aufgetrennt. Durch Western-Blot-Analyse (2.4.4) mit anschließender ECL-Detektion (2.4.5) wurden über spezifische Antikörper Rab11a, Rip11 und Rab11-FIP2 nachgewiesen und die Genrepression quantifiziert (Abb. 3.16). Mit diesem Ansatz ließ sich die Expressionsrate von Rab11a unabhängig der Konzentration der eingesetzten siRNA auf 19,0 (\pm 2,0) Prozent und die von Rip11 auf 7,7 (\pm 2,5) Prozent reduzieren. Die Expressionsrate von Rab11-FIP2 ließ sich lediglich auf 42,7 (\pm 3,5) Prozent reduzieren.

3.3.2 Überexpression von GLUT4myc und FAT/CD36

Um in H9c2-hIR-Zellen die Translokation von GLUT4 zur Plasmamembran messen zu können, muss ein myc-gekoppeltes GLUT4 überexprimiert werden. Ist das GLUT4myc in die Plasmamembran integriert, liegt dieses myc-Epitop extrazellulär und kann durch einen anti-myc-Antikörper zur Detektion gebunden werden. Im Falle des FAT/CD36 ist keine Koppelung nötig, da membranständiges FAT/CD36 auch in seiner endogenen Form von einem entsprechenden Antikörper gebunden werden kann. Dennoch muss auch dieses Protein überexprimiert werden. Um sicherzugehen, dass die Überexpression von GLUT4myc bzw. FAT/CD36 und die Genrepression von Rab11a, Rip11 bzw. Rab11-FIP2 sich nicht

gegenseitig beeinflussen, wurden Kofunktionsstudien durchgeführt. Dafür wurden sechs Stunden nach Aussaat H9c2-hIR-Zellen mit siRNA gegen Rab11a, Rip11 bzw. Rab11-FIP2 (2.3.3.2) und 24 Stunden nach Aussaat mit pCMV-GLUT4myc bzw. pcDNA3-FAT/CD36 (2.3.3.1) transfiziert. 48 Stunden später wurden die Zellen lysiert (2.4.1) und die Lysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt (2.4.3).

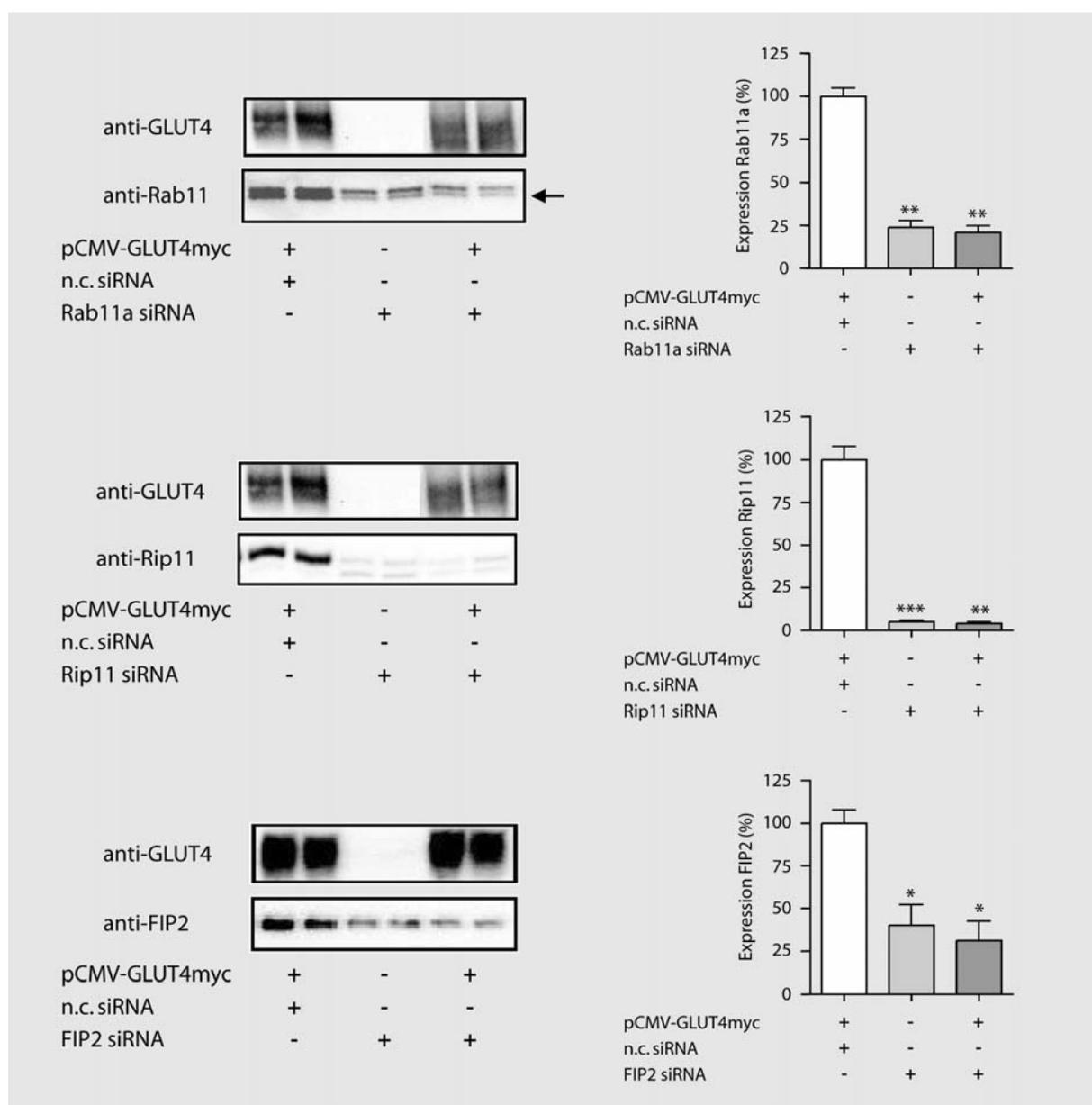


Abb. 3.17 : Einfluss der Überexpression von GLUT4myc auf die Genrepression von Rab11a, Rip11 und FIP2. H9c2-hIR-Zellen wurden sechs Stunden nach Aussaat mit nicht kodierender siRNA, Rab11a siRNA, Rip11 siRNA und FIP2 siRNA und 24 Stunden nach Aussaat mit pCMV-GLUT4myc transfiziert und 48 Stunden später lysiert. Auftrennung der Lysate durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse mittels spezifischer Antikörper. Darstellung eines repräsentativen Blots (***) $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$ SEM gegenüber der jeweiligen Kontrolle, $n = 3$).

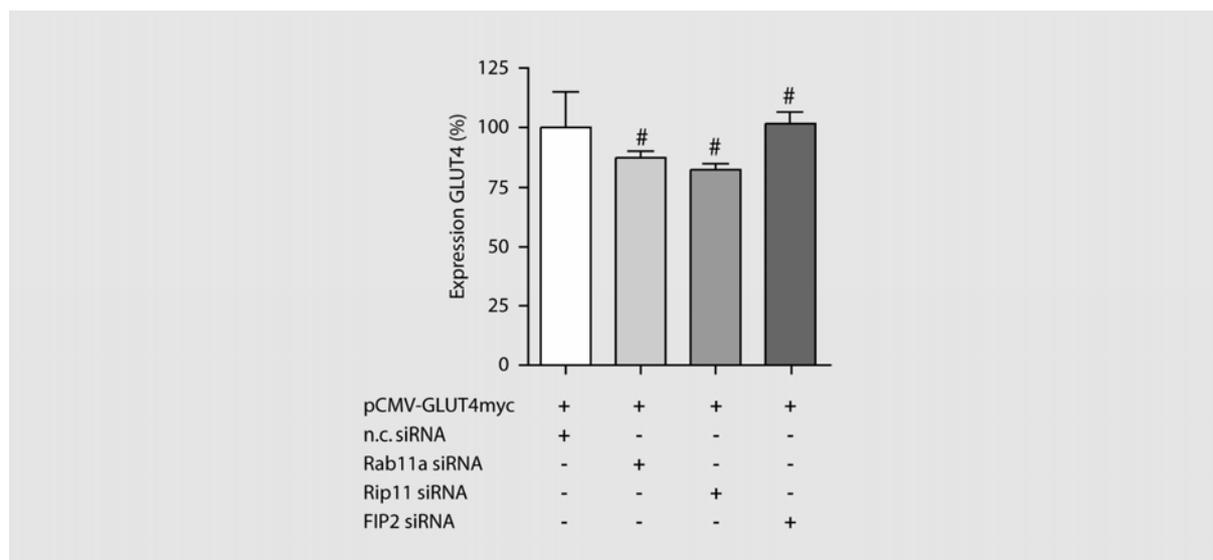


Abb. 3.18 : Einfluss der Genrepression von Rab11a, Rip11 und FIP2 auf die Überexpression von GLUT4myc. H9c2-hIR-Zellen wurden sechs Stunden nach Aussaat mit nicht kodierender siRNA, Rab11a siRNA, Rip11 siRNA und FIP2 siRNA und 24 Stunden nach Aussaat mit pCMV-GLUT4myc transfiziert und 48 Stunden später lysiert. Auftrennung der Lysate durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse mittels spezifischer Antikörper (# $P > 0,05$ SEM gegenüber der Kontrolle, $n = 3$).

Durch Western-Blot-Analyse (2.4.4) mit anschließender ECL-Detektion (2.4.5) wurden über spezifische Antikörper Rab11a, Rip11, Rab11-FIP2, GLUT4 und FAT/CD36 nachgewiesen. Unabhängig davon, ob GLUT4myc überexprimiert wird oder nicht, kann durch die Rab11a siRNA die Expression von Rab11a signifikant auf 24,0 ($\pm 4,0$) % bzw. 21,0 ($\pm 3,8$) % verringert werden ($P < 0,01$ SEM, $n = 3$, Abb. 3.17).

Auch die Genrepression von Rip11 ist unbeeinflusst von der GLUT4myc-Überexpression. Die Expression von Rip11 wird auf 5 ($\pm 1,0$) % bzw. 4 ($\pm 1,0$) % verringert ($P < 0,001$ bzw. $P < 0,01$ SEM, $n = 3$). Eine leichte Verstärkung der Genrepression im Ansatz mit der GLUT4myc-Überexpression sieht man bei Rab11-FIP2. In dieser Situation wird die Expression von Rab11-FIP2 auf 31,4 ($\pm 11,0$) % verringert, im Ansatz ohne GLUT4myc auf 38,5 ($\pm 10,0$) % ($P < 0,05$ SEM, $n = 3$). Dieser Unterschied ist allerdings nicht signifikant ($P > 0,05$ SEM, $n = 3$).

Durch die Genrepression von Rab11a und Rip11 wird die GLUT4myc-Überexpression im Vergleich zum Kontrollansatz mit nicht-kodierender siRNA von 100,0 ($\pm 15,0$) % auf 87,5 ($\pm 2,5$) % bzw. 83,5 ($\pm 2,5$) % verringert (Abb. 3.18). Diese Verringerung der GLUT4myc-Expression ist nicht signifikant ($P > 0,05$ SEM, $n = 3$). Die Genrepression von Rab11-FIP2 hat keinen Einfluss auf die Überexpression von GLUT4myc.

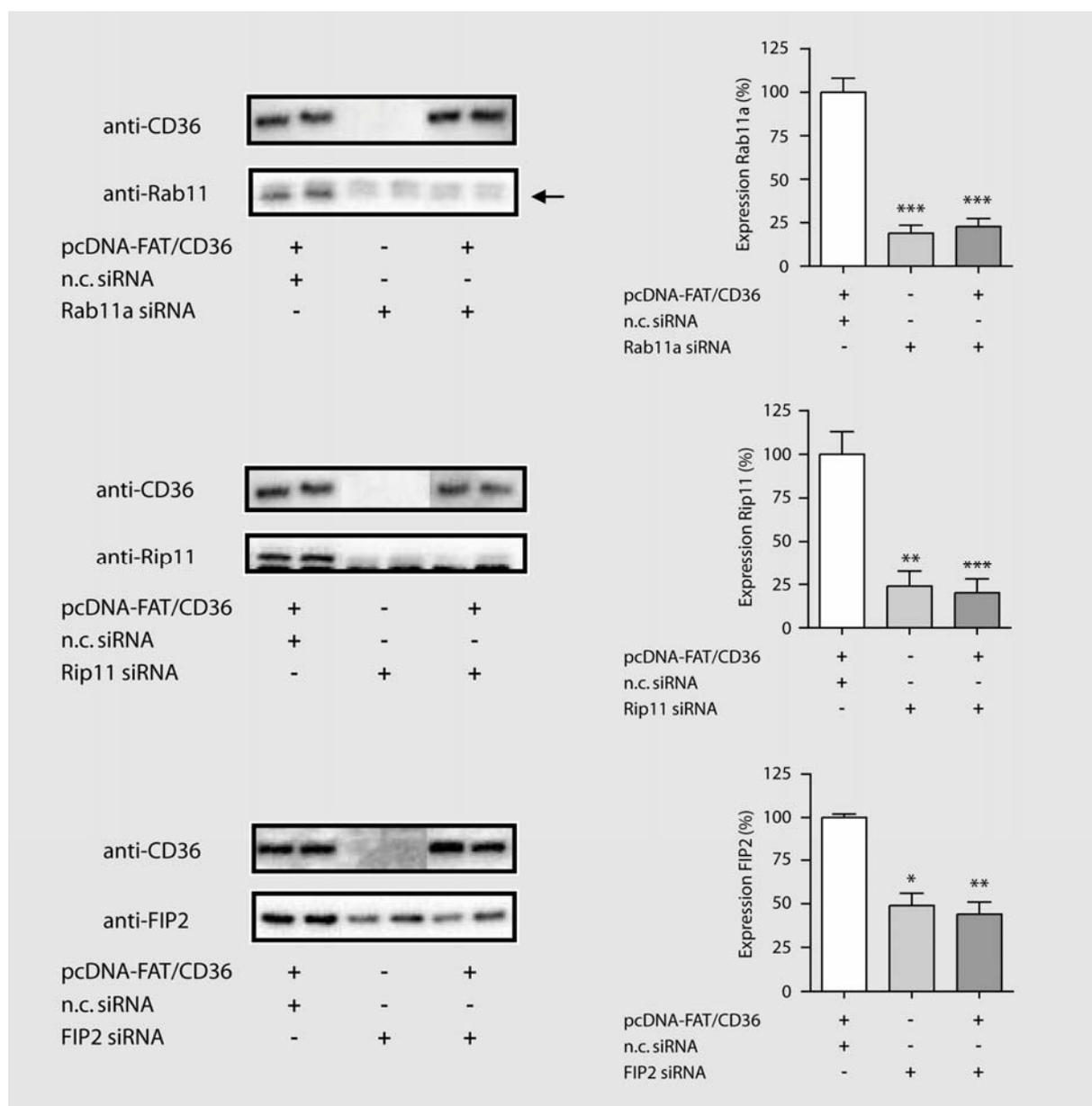


Abb. 3.19 : Einfluss der Überexpression von FAT/CD36 auf die Genrepression von Rab11a, Rip11 und FIP2. H9c2-hiR-Zellen wurden sechs Stunden nach Aussaat mit nicht kodierender siRNA, Rab11a siRNA, Rip11 siRNA und FIP2 siRNA und 24 Stunden nach Aussaat mit pcDNA3-FAT/CD36 transfiziert und 48 Stunden später lysiert. Auftrennung der Lysate durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse mittels spezifischer Antikörper. Darstellung eines repräsentativen Blots (***) $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$ SEM gegenüber der jeweiligen Kontrolle, $n = 3$).

Die Transfektion mit pcDNA-FAT/CD36 ca. 20 Stunden nach Transfektion der siRNA wirkt sich nicht auf die Genrepression von Rab11a, Rip11 und Rab11-FIP2 aus ($P > 0,05$ SEM, $n = 3$, Abb. 3.19). Die Expression von Rab11a kann durch siRNA-Transfektion unabhängig davon, ob sie einzeln oder in Kombination mit der pcDNA-FAT/CD36-Transfektion stattfindet, auf $19,0 (\pm 4,6)$ bzw. $12,9 (\pm 4,6)$ % verringert werden ($P < 0,001$ SEM, $n = 3$).

Die Expression von Rip11 wird durch die entsprechende siRNA auf $24,0 (\pm 8,7)$ bzw. $20,2 (\pm 8,0)$ % verringert ($P < 0,01$ bzw. $P < 0,001$ SEM, $n = 3$). Die gegen Rab11-FIP2 gerichtete siRNA verringert dessen Expression auf $49,0 (\pm 7,0)$ bzw. $44,0 (\pm 7,0)$ % ($P < 0,05$ bzw. $P < 0,01$ SEM, $n=3$).

Wie man in Abbildung 3.20 sieht, wird durch die Genrepression von Rab11a, Rip11 und Rab11-FIP2 die Expression von FAT/CD36 beeinflusst. Dabei steigt die Expression von FAT/CD36 durch die Genrepression von Rab11a um $24,4 (\pm 11,6)$ %, erreicht allerdings keine Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle mit nicht kodierender siRNA ($P > 0,05$ SEM, $n = 3$). Signifikant um $29,2 (\pm 4,4)$ % erniedrigt wird allerdings die Expression von FAT/CD36 durch die Genrepression von Rip11 ($P < 0,05$ SEM, $n = 3$).

Die Genrepression von Rab11-FIP2 beeinflusst die Expression von FAT/CD36 kaum, hier steigt dessen Expression um $11,5 (\pm 4,5)$ %, erreicht aber keine Signifikanz im Vergleich zur Kontrollsituation ($P > 0,05$ SEM, $n = 3$).

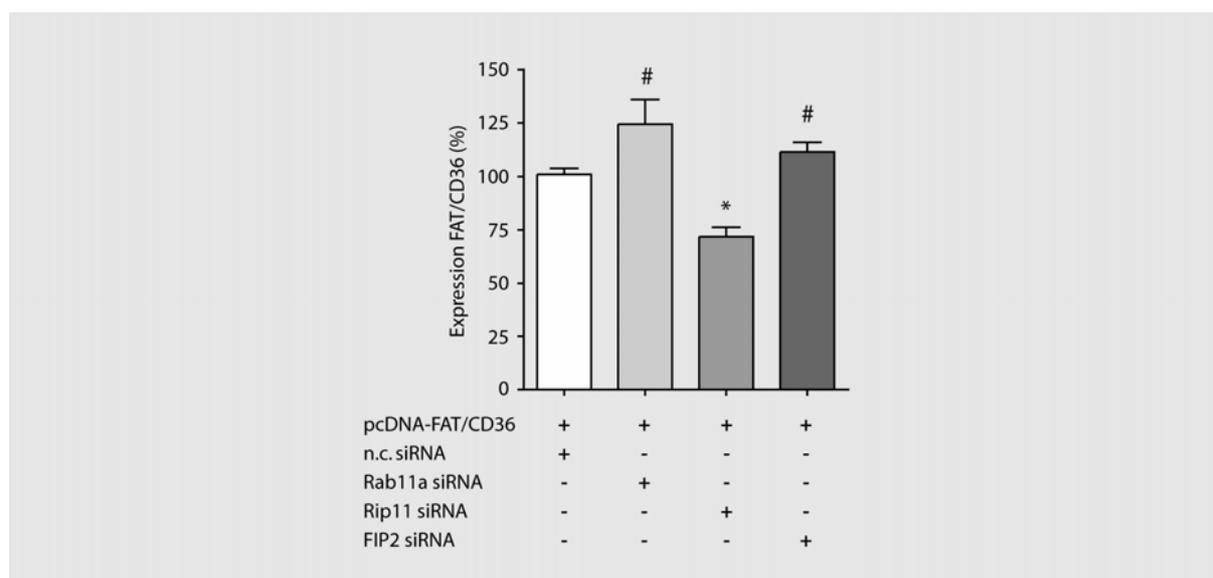


Abb. 3.20 : Einfluss der Genrepression von Rab11a, Rip11 und FIP2 auf die Überexpression von FAT/CD36. H9c2-hIR-Zellen wurden sechs Stunden nach Aussaat mit nicht kodierender siRNA, Rab11a siRNA, Rip11 siRNA und FIP2 siRNA und 24 Stunden nach Aussaat mit pcDNA3-FAT/CD36 transfiziert und 48 Stunden später lysiert. Auftrennung der Lysate durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse mittels spezifischer Antikörper (* $P < 0,05$, # $P > 0,05$ SEM gegenüber der Kontrolle, $n = 3$).

3.3.3 GLUT4myc-Translokation nach Genrepression

H9c2-hIR-Zellen wurden sechs Stunden nach Aussaat mit siRNA gegen Rab11a, Rip11 bzw. Rab11-FIP2 (2.3.3.2) und 24 Stunden nach Aussaat mit pCMV-GLUT4myc (2.3.3.1) transfiziert. Zur Messung und späteren Subtraktion des unspezifischen Hintergrundes wurde in Kontrollansätzen der Leervektor pCMV β transfiziert.

48 Stunden nach der Plasmid-Transfektion wurde die insulinabhängige Translokation von GLUT4myc zur Plasmamembran unter dem Einfluss der Genrepression von Rab11a, Rip11 bzw. Rab11-FIP2 gemessen (2.3.4.1). Die Transfektion mit nicht kodierender siRNA (n.c. siRNA) stellt die Kontrollsituation dar, hier steigert Insulin die Translokation von GLUT4myc zur Plasmamembran um den Faktor 1,54 ($\pm 0,06$) (Abb. 3.21).

Im Ansatz mit gegen Rab11a gerichteter siRNA wird bereits die basale Präsenz von GLUT4myc an der Plasmamembran um den Faktor 1,59 ($\pm 0,10$) hoch signifikant gesteigert ($P < 0,001$ SEM, $n = 3$).

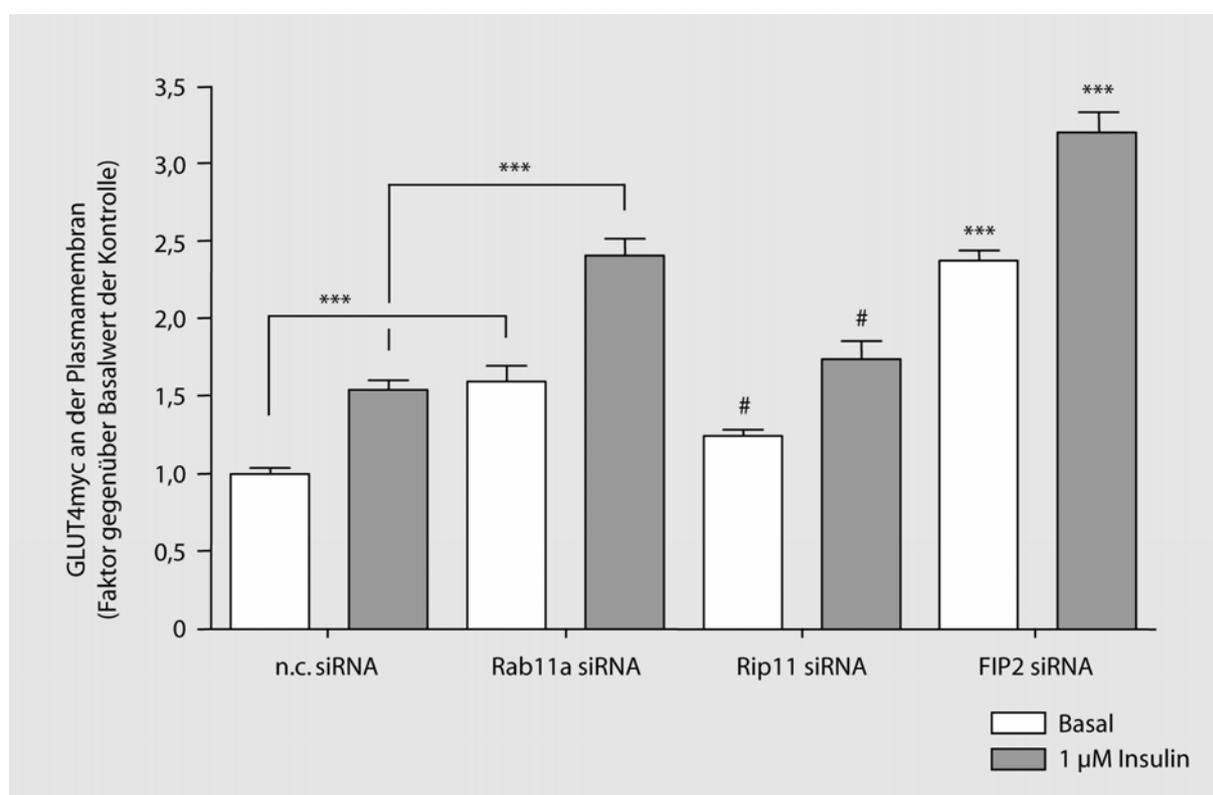


Abb. 3.21 : Translokation von GLUT4myc unter Einfluss der Genrepression von Rab11a, Rip11 und Rab11-FIP2. H9c2-hIR-Zellen wurden sechs Stunden nach Aussaat mit nicht kodierender siRNA, Rab11a siRNA, Rip11 siRNA und FIP2 siRNA und 24 Stunden nach Aussaat mit pCMV-GLUT4myc transfiziert. 48 Stunden später wurde die basale bzw. insulinstimulierte GLUT4myc-Translokation gemessen ($*** P < 0,001$, # $P > 0,05$ SEM im Vergleich zur entsprechenden Kontrollsituation, $n = 3$).

Die Stimulation mit Insulin führt in dieser Situation zu einer Steigerung um den Faktor 2,41 ($\pm 0,11$). Diese Steigerung ist ebenfalls hoch signifikant im Vergleich zur Kontrollsituation mit Insulinstimulus ($P < 0,001$ SEM, $n = 3$).

Die Genrepression von Rip11 führt zu einer leichten Steigerung des membranständigen GLUT4myc um den Faktor 1,24 ($\pm 0,04$) im basalen bzw. um den Faktor 1,79 ($\pm 0,12$) im insulinstimulierten Zustand, es wird allerdings im Vergleich zur jeweiligen Kontrollsituation keine Signifikanz erreicht ($P > 0,05$ SEM, $n = 3$). Durch die Genrepression von Rab11-FIP2 wird bereits die basale GLUT4myc-Translokation um den Faktor 2,36 ($\pm 0,06$) gesteigert. Der Insulinstimulus führt in dieser Situation zu einer Steigerung der Translokation um den Faktor 3,21 ($\pm 0,12$); sowohl die basale als auch die insulinstimulierte GLUT4myc-Translokation sind unter Genrepression von Rab11-FIP2 im Vergleich zur jeweiligen Kontrollsituation hoch signifikant erhöht ($P < 0,001$ SEM, $n = 3$).

Unter dem Einfluss der Genrepression von Rab11a und Rab11-FIP2 ändert sich auch die absolute Menge an GLUT4myc, welches durch den Insulinstimulus an die Plasmamembran verschoben wird (Abb. 3.22). Während das Inkrement in der Kontrollsituation mit nicht kodierender siRNA 0,54 ($\pm 0,1$) beträgt, ist es im Ansatz mit gegen Rab11a kodierender siRNA signifikant auf 0,82 ($\pm 0,2$) erhöht ($P < 0,05$, $n = 3$).

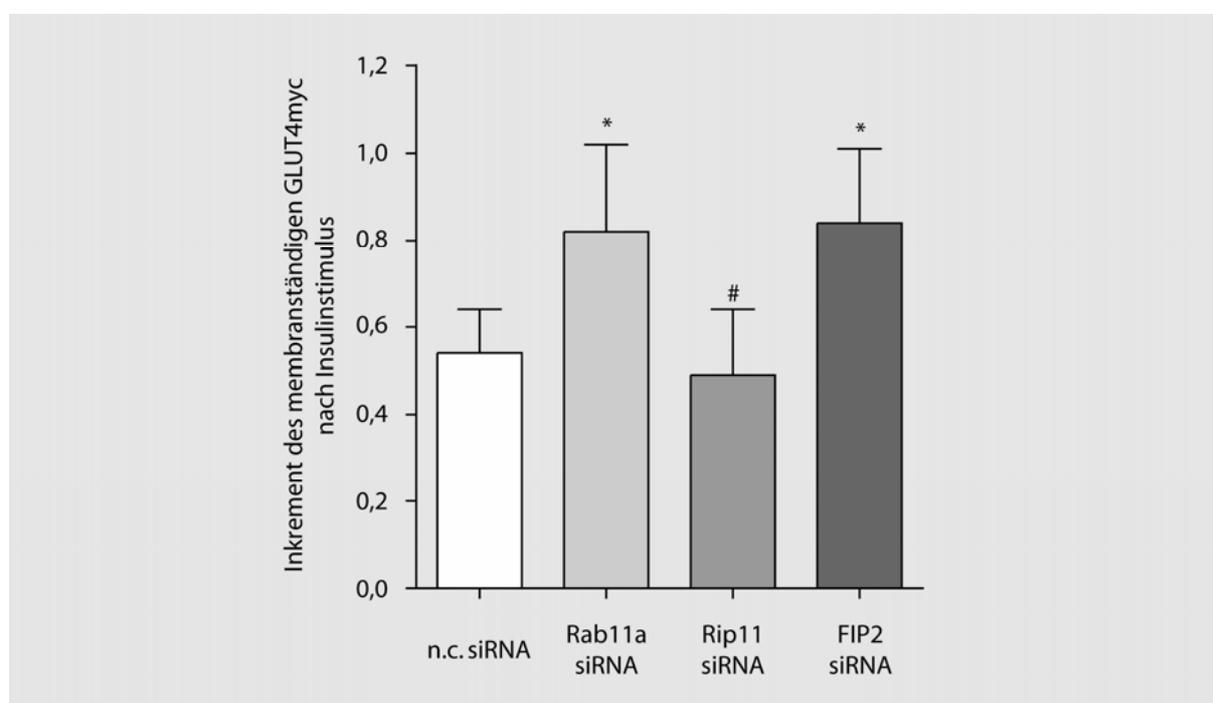


Abb. 3.22 : Inkrement des membranständigen GLUT4myc. Veränderung der absoluten GLUT4myc-Menge an der Plasmamembran von H9c2-hIR-Zellen nach einem Insulinstimulus in Abhängigkeit der Genrepression (* $P < 0,05$, # $P > 0,05$ SEM im Vergleich zur Kontrollsituation, $n = 3$).

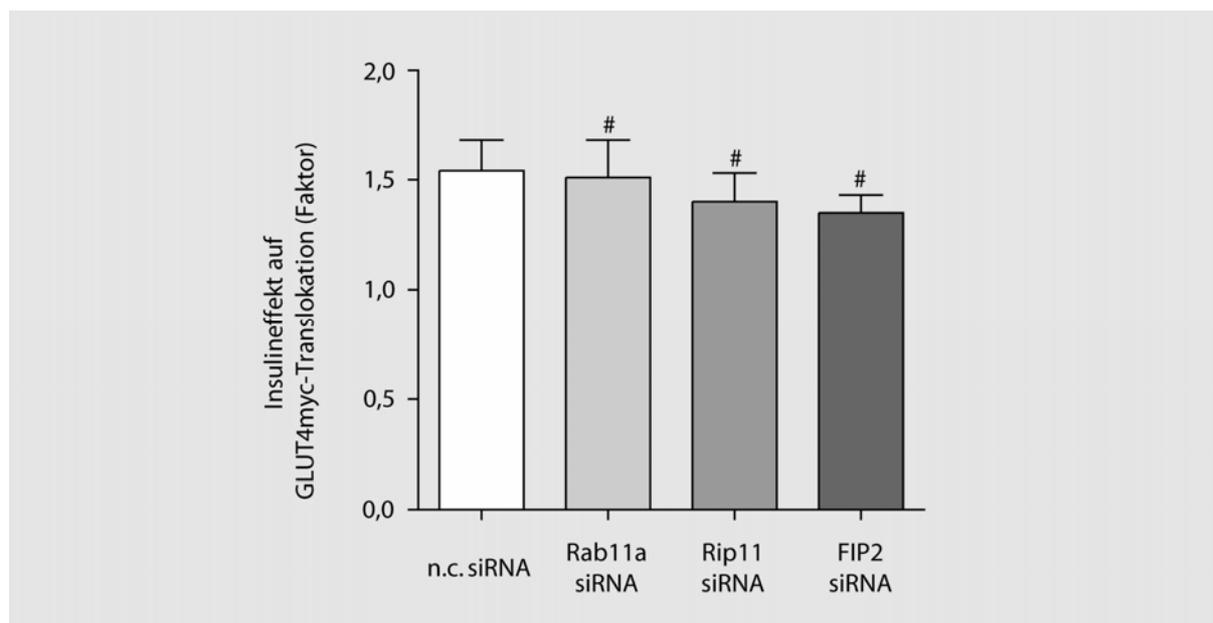


Abb. 3.23 : Relative Steigerung der GLUT4myc-Translokation durch Insulin. Veränderung der GLUT4myc-Translokation durch Insulin in Abhängigkeit der Genrepression im Verhältnis zum jeweiligen Basalwert (# $P > 0,05$ SEM im Vergleich zur Kontrollsituation, $n = 3$).

Das Inkrement im Ansatz mit FIP2 siRNA beträgt $0,84 (\pm 0,17)$ und ist im Vergleich zur Kontrollsituation ebenfalls signifikant erhöht ($P < 0,05$, $n = 3$). Durch die Genrepression mit Rip11 siRNA beträgt das Inkrement nur $0,49 (\pm 0,15)$ und ist damit tendenziell erniedrigt, erreicht aber keine Signifikanz im Vergleich zur Kontrollsituation ($P > 0,05$, $n = 3$).

Im Gegensatz zur absoluten Menge an transloziertem GLUT4myc bleibt der Faktor, um den Insulin die Translokation steigert, unverändert (Abb. 3.23). In der Kontrollsituation steigert Insulin die GLUT4myc-Translokation um den Faktor $1,54 (\pm 0,14)$, unter Genrepression von Rab11a, Rip11 und Rab11-FIP2 um den Faktor $1,51 (\pm 0,17)$, $1,40 (\pm 0,13)$ bzw. $1,35 (\pm 0,08)$ ($P > 0,05$, $n = 3$).

3.3.4 FAT/CD36-Translokation nach Genrepression

Da in Vorversuchen die Translokation des Fettsäuretransporters FAT/CD36 durch Insulin nicht stimuliert werden konnte, wurden alternative Substanzen gesucht, welche eine solche Translokation stimulieren könnten. Aus der aktuellen Literatur ist bekannt, dass die Translokation von FAT/CD36 u.a. über den AMPK-Signalweg vermittelt wird. Es wurden daher bekannte Aktivatoren dieses Signalweges getestet. Dazu wurden konfluent gewachsene H9c2-hIR-Zellen 24 Stunden nach Aussaat 30 Minuten lang mit 2 mM AICAR, 0,6 M D-

Sorbitol bzw. 0,1 mM 2,4-Dinitrophenol inkubiert. Als Negativkontrolle wurde zusätzlich ein Ansatz mit 1 μ M Insulin stimuliert. Danach wurden die Zellen lysiert (2.4.1) und die Lysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt (2.4.3). Durch Western-Blot-Analyse (2.4.4) mit anschließender ECL-Detektion (2.4.5) wurden über spezifische Antikörper Actin und phospho-AMPK nachgewiesen (Abb. 3.24).

Wie durch die Vorversuche erwartet, wird durch Inkubation der H9c2-hIR-Zellen mit Insulin die AMPK im Vergleich zu den Kontrollansätzen mit FCS-freiem Medium (DMEM) und Komplettmedium (Medium) nur nicht signifikant um den Faktor 1,27 (\pm 0,27) stimuliert ($P > 0,05$, $n = 3$). Zu ebenfalls keiner signifikanten Veränderung der AMPK-Phosphorylierung führt die Inkubation mit AICAR und 2,4-Dinitrophenol.

Hierbei wird die AMPK um den Faktor 1,28 (\pm 0,25) bzw. 0,95 (\pm 0,12) phosphoryliert ($P > 0,05$, $n = 3$). Durch die Inkubation mit D-Sorbitol wird die AMPK um den Faktor 2,2 (\pm 0,26) signifikant aktiviert ($P < 0,05$, $n = 3$).

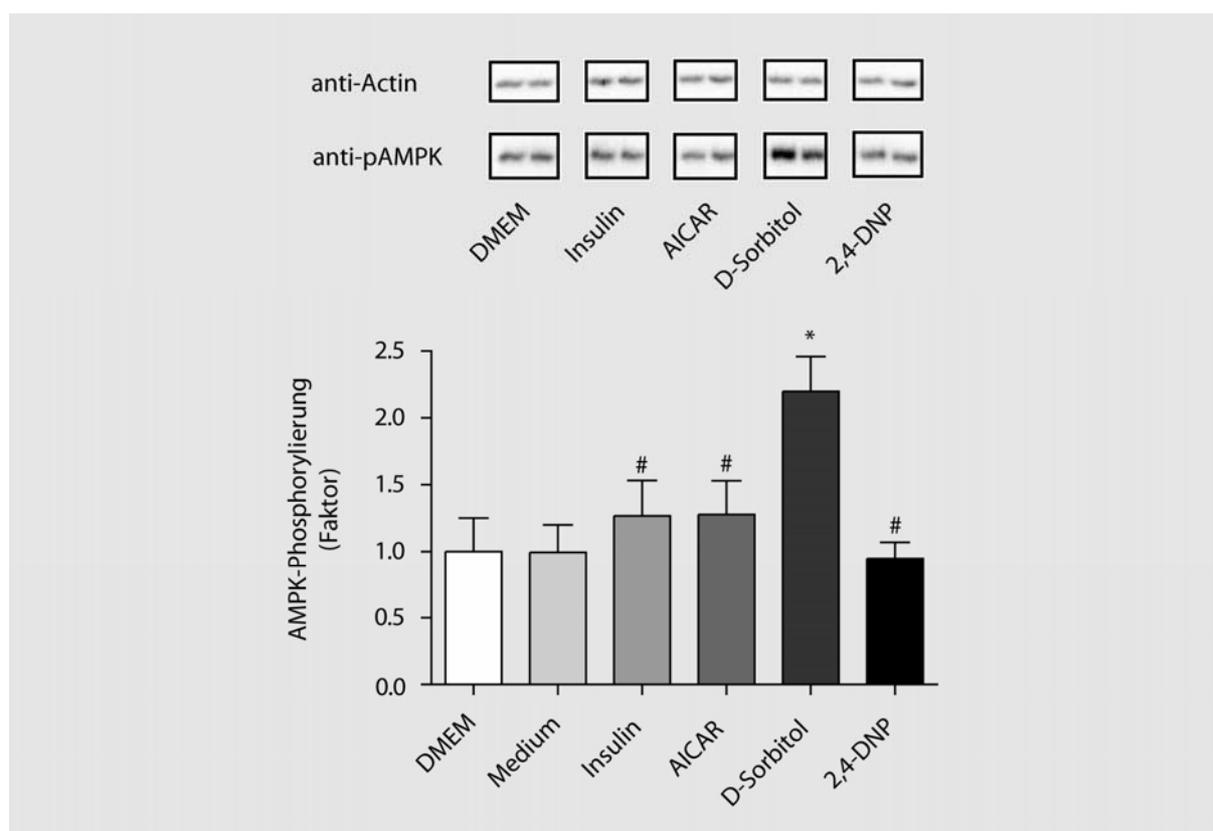


Abb. 3.24 : Aktivierung der AMPK. H9c2-hIR-Zellen wurden 30 Minuten lang mit verschiedenen Stimuli inkubiert und anschließend lysiert. Auftrennung der Lysate durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse mittels spezifischer Antikörper (# $P > 0,05$, * $P < 0,05$ SEM im Vergleich zu den Kontrollsituationen mit DMEM und Medium, $n = 3$).

D-Sorbitol wurde daher in den weiteren Versuchen als AMPK-Aktivator in H9c2-hIR-Zellen verwendet. Zur Messung der sorbitolinduzierten FAT/CD36-Translokation wurden H9c2-hIR-Zellen sechs Stunden nach Aussaat mit siRNA gegen Rab11a, Rip11 bzw. Rab11-FIP2 (2.3.3.2) und 24 Stunden nach Aussaat mit pcDNA-FAT/CD36 (2.3.3.1) transfiziert. Um den unspezifischen Hintergrund messen und von den Rohdaten abziehen zu können, wurde in Kontrollansätzen der Leervektor pcDNA3.1 transfiziert. 48 Stunden nach der Plasmid-Transfektion wurde die sorbitolinduzierte Translokation des überexprimierten FAT/CD36 zur Plasmamembran unter dem Einfluss der Genrepression von Rab11a, Rip11 bzw. Rab11-FIP2 gemessen (2.3.4.2). Die Transfektion mit nicht kodierender siRNA (n.c. siRNA) stellt die Kontrollsituation dar, hier steigert Sorbitol die Translokation von FAT/CD36 zur Plasmamembran um den Faktor 1,38 ($\pm 0,13$) (Abb. 3.25). Im Ansatz mit gegen Rab11a gerichteter siRNA wird bereits die basale Präsenz von FAT/CD36 an der Plasmamembran um den Faktor 3,48 ($\pm 0,16$) hoch signifikant gesteigert ($P < 0,001$ SEM, $n = 3$).

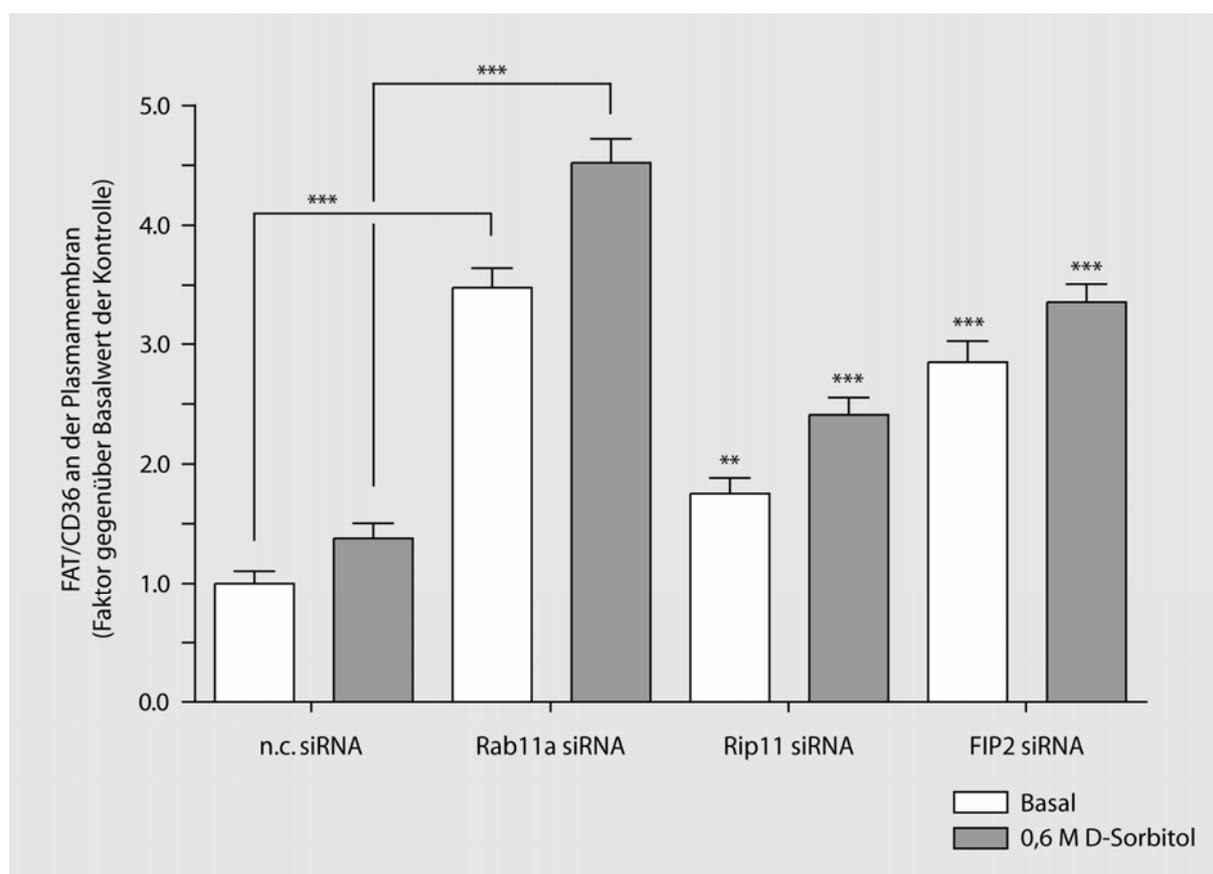


Abb. 3.25 : Translokation von FAT/CD36 unter Einfluss der Genrepression von Rab11a, Rip11 und Rab11-FIP2. H9c2-hIR-Zellen wurden sechs Stunden nach Aussaat mit nicht kodierender siRNA, Rab11a siRNA, Rip11 siRNA und FIP2 siRNA und 24 Stunden nach Aussaat mit pcDNA-FAT/CD36 transfiziert. 48 Stunden später wurde die basale bzw. sorbitolinduzierte FAT/CD36-Translokation gemessen (*** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$ SEM im Vergleich zur entsprechenden Kontrollsituation, $n = 3$).

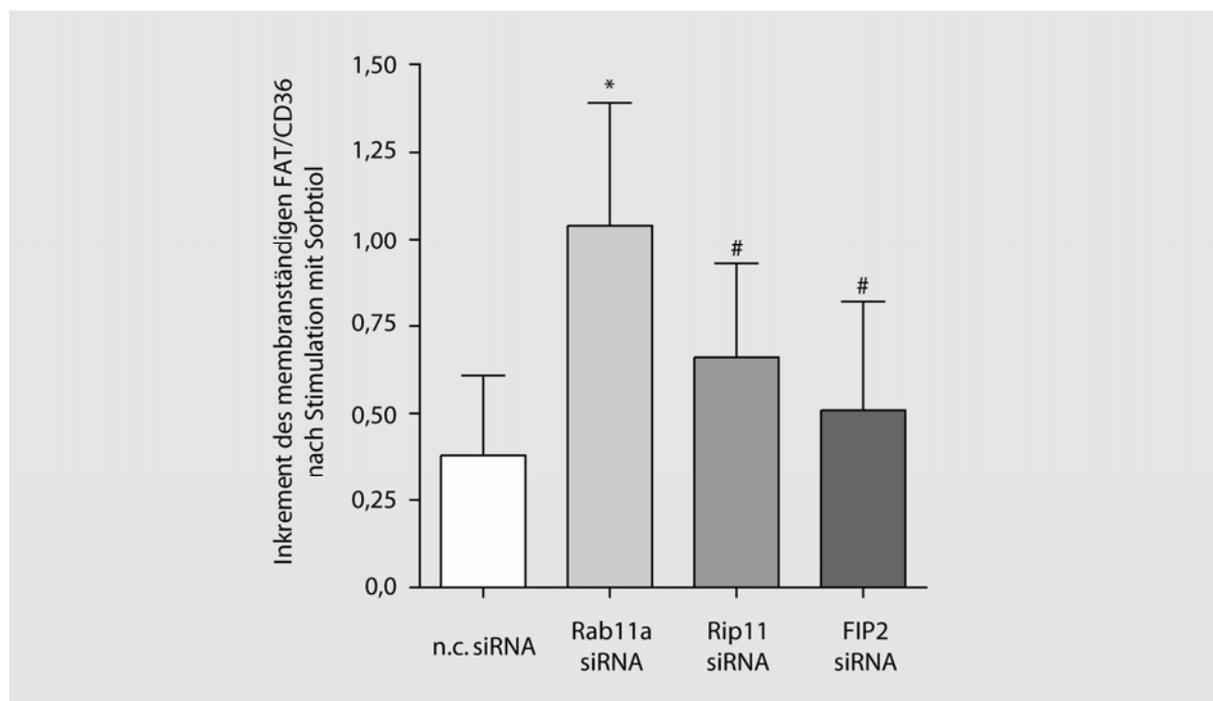


Abb. 3.26 : Inkrement des membranständigen FAT/CD36. Veränderung der absoluten FAT/CD36-Menge an der Plasmamembran von H9c2-hIR-Zellen durch Stimulation mit Sorbitol in Abhängigkeit der Genrepression (* $P < 0,05$, # $P > 0,05$ SEM im Vergleich zur Kontrollsituation, $n = 3$).

Die Stimulation mit Sorbitol führt in dieser Situation zu einer Steigerung um den Faktor 4,52 ($\pm 0,20$). Diese Steigerung ist ebenfalls hoch signifikant im Vergleich zur Kontrollsituation mit Sorbitolstimulus ($P < 0,001$ SEM, $n = 3$). Die Genrepression von Rip11 führt zu einer Steigerung des membranständigen FAT/CD36 um den Faktor 1,75 ($\pm 0,13$) im basalen bzw. um den Faktor 2,41 ($\pm 0,14$) im sorbitolstimulierten Zustand. Die basale Translokation ist im Vergleich zur Kontrollsituation mit nicht kodierender siRNA signifikant erhöht ($P < 0,01$ SEM, $n = 3$), die sorbitolstimulierte sogar hoch signifikant erhöht ($P < 0,001$ SEM, $n = 3$). Durch die Genrepression von Rab11-FIP2 wird bereits die basale FAT/CD36-Translokation um den Faktor 2,85 ($\pm 0,17$) gesteigert. Der Sorbitolstimulus führt in dieser Situation zu einer Steigerung der Translokation um den Faktor 3,36 ($\pm 0,14$). Sowohl die basale als auch die sorbitolstimulierte FAT/CD36-Translokation sind unter Genrepression von Rab11-FIP2 im Vergleich zur jeweiligen Kontrollsituation hoch signifikant erhöht ($P < 0,001$ SEM, $n = 3$).

Unter dem Einfluss der Genrepression von Rab11a erhöht sich die absolute Menge an FAT/CD36, welches durch Sorbitol in die Plasmamembran verschoben wird (Abb. 3.26). Das Inkrement in der Kontrollsituation mit nicht kodierender siRNA beträgt 0,38 ($\pm 0,23$), im Ansatz mit gegen Rab11a kodierender siRNA ist es signifikant auf 1,04 ($\pm 0,35$) erhöht ($P < 0,05$ SEM, $n = 3$). Die Genrepression von Rip11 und Rab11-FIP2 hat auf die absolute Menge

an transloziertem FAT/CD36 nur tendenziell Einfluss. Das Inkrement im Ansatz mit Rip11 siRNA beträgt 0,66 (\pm 0,27) und das der Rab11-FIP2 siRNA 0,51 (\pm 0,31), beide sind im Vergleich zur Kontrollsituation nicht signifikant erhöht ($P > 0,05$, $n = 3$).

Der Faktor, um den Sorbitol im Verhältnis zum jeweiligen Basalwert die Translokation von FAT/CD36 steigert, ist während der Genrepression von Rab11a und Rab11-FIP2 tendenziell erniedrigt (Abb. 3.27). Während in der Kontrollsituation der Stimulus mit Sorbitol zu einer Steigerung der FAT/CD36-Translokation um den Faktor 1,38 (\pm 0,27) führt, beträgt dieser Faktor unter Einfluss der Rab11a bzw. Rab11-FIP2 siRNA nur 1,30 (\pm 0,12) bzw. 1,18 (\pm 0,13), ist aber nicht signifikant verändert im Vergleich zur Kontrollsituation ($P > 0,05$ SEM, $n = 3$). Unter Einfluss der gegen Rip11 gerichteten siRNA bleibt die relative FAT/CD36-Translokation mit einem Faktor von 1,38 (\pm 0,2) unverändert ($P > 0,05$ SEM, $n = 3$).

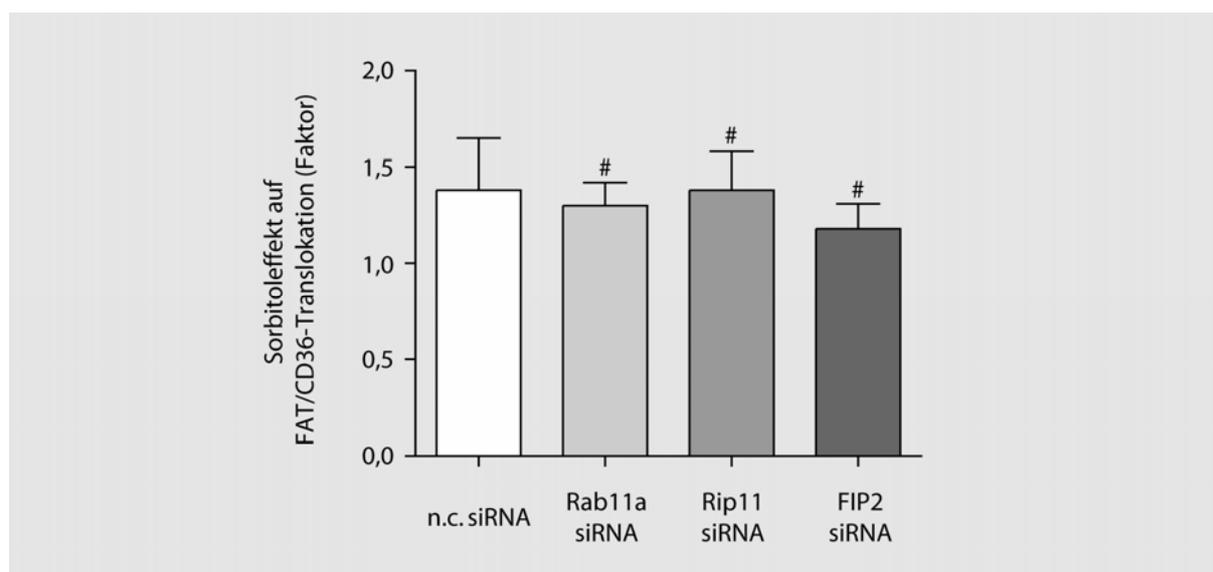


Abb. 3.27 : Relative Steigerung der FAT/CD36-Translokation durch Sorbitol. Veränderung der FAT/CD36-Translokation durch Sorbitol in Abhängigkeit der Genrepression im Verhältnis zum jeweiligen Basalwert (# $P > 0,05$ SEM im Vergleich zur Kontrollsituation, $n = 3$).

4. Diskussion

4.1 Expressionsvergleich Rab11a vs. Rab11b

Rab11 wird in verschiedenen Geweben exprimiert. Es wurde unter anderem bereits in primären Kardiomyozyten der Spezies Ratte (Kessler et al., 2000), in Ovarienzellen des Chinesischen Hamsters (CHO) und Babyhamster-Nierenzellen (BHK-21) (Ullrich et al., 1996), in Madin-Darby Canine Kidney Epithelzellen (MDCK) (Casanova et al., 1999), in 3T3-L1-Adipozyten (Zeng et al., 1999), sowie in H9c2-Myoblasten und humanen Skelettmuskelzellen und Adipozyten (Uhlig et al., 2005) nachgewiesen.

Für Myosin-Vb, welches über Rab11-FIP2 mit Rab11a einen ternären Komplex bildet, welcher den Transferrin Rezeptor und CXCR2 internalisiert (Lindsay & McCaffrey, 2002; Fan et al., 2004), konnte gezeigt werden, dass es mit allen drei Isoformen des Rab11, nämlich Rab11a, Rab11b und Rab25, interagiert (Lapierre et al., 2001). Rab11a und Rab11b sind zu 90 % in ihrer Aminosäuresequenz identisch (Scapin et al., 2006), dennoch sind sie unterschiedlich in der Zelle lokalisiert. Während Rab11a beispielsweise mit der H^+/K^+ -ATPase kolokalisiert (Calhoun et al., 1998), ist Rab11b in einer perizentrisomalen Region lokalisiert, welche sich von Rab11a unterscheidet (Lapierre et al., 2003).

Vor dem Hintergrund der hohen Homologie innerhalb der Rab11-Subfamilien und der geringen Datenlage bezüglich der Rab11b-Isoform, war es notwendig im Vorfeld festzustellen, ob neben Rab11a auch Rab11b in den verwendeten H9c2-hIR-Zellen exprimiert wird. Da von Rab25 bekannt ist, dass es nur in Epithelzellen exprimiert wird, wurde diese Isoform außen vor gelassen.

Da kommerzielle Antikörper nur gegen Rab11a zu erhalten sind, bzw. deren Spezifität nicht nachgewiesen ist, wurde die Expression von Rab11a und Rab11b mittels Realtime-PCR untersucht. Dazu wurde zweimal RNA aus H9c2-hIR-Zellen isoliert (3.1.1). Beide Präparationen zeigen im Analysegelel distinkte Banden für die 18S und 28S rRNA und wurden daher als Aufreinigungen hoher Reinheit betrachtet (Abb. 3.2). Dies ist Grundlage für eine aussagekräftige Real-Time-PCR. Zur Auswertung der Real-Time-PCR wurde die Zyklenzahl der Mitte des linearen Amplifikationsbereiches (Z_M) verwendet. Um zwei unterschiedliche Zielsequenzen in einer Real-Time-PCR ohne Standardkurve miteinander in Relation setzen zu

können, müssen die Läufe beider Zielsequenzen eine gleiche PCR-Effizienz aufweisen. Diese wird dadurch verglichen, indem man die Z_M -Werte in Abhängigkeit der logarithmierten cDNA-Menge aufträgt (Abb. 3.3). Für Rab11a und Rab11b ergaben sich Geraden mit nahezu identischer Steigung. Beide Real-Time-PCRs haben daher die gleiche Effizienz und die ermittelten relativen mRNA-Kopienzahlen lassen sich direkt miteinander vergleichen. Unabhängig der eingesetzten cDNA-Menge hat dabei Rab11a einen Z_M -Wert, der um $1,5 \pm 0,2$ Zyklen höher ist, als der von Rab11b.

Die Real-Time-PCR für Rab11a benötigt daher ca. 1,5 Zyklen mehr, um die gleiche Kopienzahl wie die Real-Time-PCR für Rab11b zu erreichen. Daraus ergibt sich, dass Rab11b um den Faktor $3,0 \pm 0,4$ stärker in H9c2-hIR exprimiert wird als Rab11a. Für die Ergebnisse in den Versuchen zur Genrepression des Rab11a, die in Kapitel 4.3 diskutiert werden, bedeutet dies, dass Unterschiede im Vergleich zur Kontrollsituation spezifisch für Rab11a sind und Rab11b trotz seiner erhöhten Expression bei einer Genrepression von Rab11a dessen Funktionsverlust nicht kompensatorisch ausgleichen kann. Da die Messung der mRNA-Menge eines Gens nach dem Einsatz von siRNA keine Aussage darüber zulässt, wie viel Protein noch in der Zelle vorhanden ist und welche Verweildauer es besitzt, bevor es degradiert wird, wurde die Effizienz der Genrepression ausschließlich mittels Western Blot quantifiziert.

In HeLa-Zellen wurde bezüglich der Verlagerung von Rip11 aus Endosomen in das Zytosol gezeigt, dass Rab11b kompensatorisch einen Funktionsverlust von Rab11a ausgleichen kann (Junutula et al., 2004). Während ein einzelnes Ausschalten von Rab11a bzw. Rab11b die Membranständigkeit des Rab11-Effektorproteins Rip11 nicht verändert, kann durch eine gleichzeitige Genrepression der beiden Isoformen Rip11 in das Zytosol verschoben werden. Zum einen zeigt dies, dass beide Rab11-Isoformen einem Funktionsverlust der anderen Isoform, zumindest bezüglich der Assoziation von Rab11-Effektorproteinen, kompensatorisch entgegenwirken können. Zum anderen bestätigen diese Daten, dass die Sequenz der Rab11a-siRNA, welche auch in dieser Arbeit verwendet wurde, spezifisch für diese Isoform ist und die Rab11b-Expression nicht beeinflusst.

Röntgenographische Untersuchungen von kristallisiertem Rab11a und Rab11b zeigen allerdings, dass es sich bei beiden Isoformen um recht unterschiedliche Proteine handelt (Scapin et al., 2006). Während Rab11a und Rab11b zu ca. 90 % in der Aminosäuresequenz identisch sind, zeigen ihre Kristallstrukturen bedeutende Unterschiede in ihren Switch-

Domänen, welche nicht nur die Bindung von GDP bzw. GTP, sondern auch deren Assoziation mit Effektorproteinen und Membrankompartimenten regulieren. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass inaktives Rab11a als Dimer mit geordneten Switch-Regionen ohne Magnesium-Ion in der Nukleotid-Bindetasche vorliegt, während inaktives Rab11b als Monomer mit flexiblen Switch-Regionen und vorhandenem Magnesium-Ion in der Nukleotid-Bindetasche kristallisiert. Dies verdeutlicht, dass die enzymatischen Unterschiede zwischen Rab11a und Rab11b nicht zu vernachlässigen sind und eine Differenzierung der Isoformen für alle Aussagen über die Rab11-GTPase notwendig ist.

Da die bisher gewonnenen Erkenntnisse, vor allem die Ergebnisse zum endosomalen Transport und der Expressionsansätze von Rab11-Varianten, auf der Rab11a-Isoform beruhen, sind die Experimente der hier vorliegenden Arbeit auf diese Isoform fokussiert.

4.2 Insulinabhängige Aktivierung von Rab11a

Nach einem Insulinstimulus von primären Kardiomyozyten akkumuliert Rab11a in GLUT4-enthaltenden Vesikeln und wird mit ihnen zur Plasmamembran verschoben (Uphues et al., 1994; Kessler et al., 2000). Die Überexpression von konstitutiv aktiven oder inaktiven Rab11a-Varianten verändert die Menge von GLUT4 in der Plasmamembran und die Glucoseaufnahme (Uhlir et al., 2005). Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass der Nukleotid-Bindestatus des Rab11a durch Insulin moduliert wird. Da bisher noch nicht gezeigt werden konnte, dass ein Insulinstimulus die GTP-Beladung von Rab11a verändert, war es unter anderem Ziel dieser Arbeit, die GTP-Bindung von Rab11a in intakten Myoblasten der Zelllinie H9c2-hIR nachzuweisen.

Die Aktivität von Rab-GTPasen wird über die Bindung von GTP und dessen Hydrolyse zu GDP reguliert. In diesem Zusammenhang stellt ein GTP-gebundenes ein aktiviertes Enzym und ein GDP-gebundenes Rab-Protein ein inaktives Enzym dar (Bourne et al., 1991; Kikuchi et al., 1992). Infolge ihres Wechsels zwischen aktiver und inaktiver Form ändern Rab-GTPasen ihre intrazelluläre Lokalisation, Bindepartner und katalysierte Funktion (Ullrich et al., 1996; Mammoto et al., 1999; Lapierre et al., 2001).

Als methodischer Ansatz zur Bestimmung des Nukleotid-Bindungszustandes von Rab-GTPasen dient häufig die Zugabe von zum Teil radioaktiv markiertem GTP zu Zelllysaten

(Imamura et al., 2003; Bielli et al., 2006). In der Arbeit von Bielli wird GTP oder sein nicht hydrolysierbares Analogon GTP γ S in Zelllysate gegeben und anschließend die Interaktion von Motorproteinen der Myosin-Familie mit Guaninnukleotid-Austausch-Faktoren (GEFs) der Rab/Ypt-GTPasen mittels Western Blot-Analyse untersucht. Diese Methode zeigt allerdings nur indirekte Effekte einer GTPasen-Aktivierung. Aussagen über den tatsächlichen Nukleotid-Bindestatus einer bestimmten Rab-GTPase lassen sich auf diese Weise nicht machen.

Dies ist möglich durch den Einsatz von radioaktiv markiertem und photoaffinem GTP und der anschließenden Immunopräzipitation der zu untersuchenden GTPase (Imamura et al., 2003). Mit dieser Methode wurde gezeigt, dass Rab4 insulinabhängig mit GTP beladen wird. Allerdings fand auch hier die GTP-Bindung im Rohlysat stimulierter Zellen statt. Neben dem besonderen Aufwand, den das Arbeiten mit Radioaktivität erfordert, findet auch diese RabGTPasen-Aktivierung nicht in der intakten Zelle statt, sondern erst nach Zerstörung der zellulären Strukturen und das Einbringen von beispielsweise Phosphatasen-Inhibitoren durch den Lysepuffer.

Eine weitere Methode mit der die GTP-Beladung von Rab4 gezeigt wurde, ist die Inkubation einer Western Blot-Membran mit radioaktivem GTP und der anschließenden Schwärzung eines Röntgenfilms (Saxena et al., 2006). Mit diesem Ansatz wurde gezeigt, wie eine konstitutiv aktive und eine dominant negative Variante von Rab4, welche im Zellsystem überexprimiert wurden, GTP binden kann beziehungsweise nicht in der Lage ist GTP zu binden. Diese Methode stellt daher einen funktionellen Nachweis von Rab4-Mutanten dar, ermöglicht aber keinen Nachweis der GTP-Beladung in der Zelle nach einem extrazellulären Stimulus.

Die Überexpression von konstitutiv aktiven oder dominant negativen Varianten von Rab-GTPasen ist eine häufig angewandte Methode, um den Einfluss eines GTP- bzw. GDP-gebundenen Enzyms zu simulieren (Uhlir et al., 2005; Saxena et al., 2006). Natürlich können so keine Aussagen getroffen werden, welche Signale zu einer Aktivierung oder Inaktivierung von Rab-GTPasen führt.

Um die Kinetik einer GTP-Hydrolyse aufzunehmen, kann man rekombinante Rab-GTPasen aufreinigen und *in vitro* mit 32 P-GTP beladen (Minea et al., 2005). Die Umsatzrate, beispielsweise durch ein Rab-GTPasen aktivierendes Protein (GAP) initiiert, kann durch Auftrennung verschiedener Zeitpunkte in einer Dünnschicht-Chromatographie und Detektion in einem Phosphor-Imager visualisiert werden.

Auch hier sind keine Aussagen darüber möglich, welche Signale in der Zelle tatsächlich zu einer Rab-Aktivierung führt. Die Methode ist allerdings gut geeignet um potentielle GAPs einer spezifischen Rab-GTPase zu identifizieren.

Um die GTP-Beladung von Rab11a in der intakten Zelle messen zu können, wurde daher eine nicht-radioaktive Methode etabliert, mit der ein biotinyliertes, photoaffines GTP-Analogon (GTP-[γ]-Azidoanilid-Biotin-longchain-Hydrazon) mittels Elektroporation in intakte H9c2-hIR-Zellen eingebracht wird. Nach der Stimulation mit Insulin wurde gebundenes GTP zu diskreten Zeitpunkten durch UV-Bestrahlung fixiert und konnte nach der Lyse und der anschließenden Immunopräzipitation des HA-gekoppelten Rab11a über den Biotin-Rest mittels Western Blot-Analyse quantifiziert werden.

4.2.1 Überexpression und Elektroporation

Durch Klonierung eines entsprechenden Vektors konnte HA-gekoppeltes Rab11a in H9c2-hIR-Zellen überexprimiert werden (Abb. 3.8). Die Kopplung des Rab11a mit einem HA-Rest ist notwendig, um es nach der Stimulation aus dem Lysat präzipitieren und aufreinigen zu können. Dass trotz der Inaktivierung des Rab11a-Startcodons auch nicht-gekoppeltes Rab11a überexprimiert wird, ist verwunderlich. Es ist zu vermuten, dass nicht-gekoppeltes Rab11a Resultat einer Proteasen-Aktivität oder falsch transkribierter mRNA ist. Da aber das HA-gekoppelte ca. 80 Prozent des gesamten Rab11a ausmacht und auch vollständig und spezifisch aus dem Lysat präzipitiert werden konnte (Abb. 3.9), wurde das unspezifische Expressionsprodukt vernachlässigt.

Da zur Messung der HA-Rab11a-Aktivierung ein GTP-Analogon in die H9c2-hIR-Zellen eingebracht werden musste, wurde mit Propidiumiodid ein Elektroporationsprotokoll für diese Zelllinie erstellt. Um die Zellen nach der Elektroporation möglichst effizient mit Insulin zu stimulieren, ist es erforderlich, sie FCS-frei zu hungern. Es wurde daher untersucht, ob FCS für die Resuspension nach der Elektroporation notwendig ist, um eine möglichst hohe Adhärenz und Vitalität der Zellen zu erreichen. Dabei zeigte sich nicht nur, dass FCS-haltiges Medium für die Resuspension zwingend erforderlich ist, sondern auch, dass bereits nach einer Stunde in FCS-haltigem Komplettmedium vitale Zellen adhären sind und eine FCS-freie Hungerphase von 15 Minuten ausreicht, um eine nahezu gleichstarke insulinabhängige Phosphorylierung der Akt zu erreichen, wie bei einer einstündigen Hungerphase (Abb. 3.11).

4.2.2 GTP-Beladung von Rab11a

Um eine insulinabhängige GTP-Beladung des HA-gekoppelten Rab11a in H9c2-hIR-Zellen messen zu können, wurde das biotinylierte, photoaffine GTP-Analogon GTP-[γ]-Azidoanilid-Biotin-longchain-Hydrazon mittels Elektroporation in die Zellen eingebracht. Dabei zeigte sich, dass Rab11a ca. vier Minuten nach der Zugabe von Insulin maximal mit GTP beladen wird (Abb. 3.12). Diese Aktivierung verläuft parallel zur Akt-Phosphorylierung, allerdings wenige Minuten zeitversetzt. Die Aktivierung ist transient, im Gegensatz zur Akt-Aktivierung wird die Rab11a-Aktivierung wenige Minuten nach Erreichen des Maximums wieder terminiert.

Insulin stimuliert die Aufnahme von Glucose in den intrazellulären Raum durch Translokation des Glucosetransporters GLUT4 in die Plasmamembran (Holman & Cushman, 1994). Dies geschieht durch die Verstärkung der GLUT4-Exozytoserate, welche je nach Zelltyp ihr Maximum nach 10 bis 20 Minuten erreicht (Govers et al., 2004; Coster et al., 2004). Die insulinabhängige Aktivierung von Rab11a findet also in den frühen Phasen statt, in denen GLUT4 aus den insulinsensitiven Kompartimenten in die Recycling-Maschinerie verschoben wird, mit der es dann zur Plasmamembran transloziert wird.

Zusammen mit der Beobachtung, dass Rab11a nach einem Insulinstimulus in GLUT4-Vesikeln akkumuliert, lässt sich vermuten, dass die Aktivierung von Rab11a durch Insulin notwendig ist, um es aus dem Zytosol an die GLUT4-Vesikel zu verlagern. Dieser Insulineffekt wurde in GLUT4-Vesikeln aus primären Kardiomyozyten gezeigt (Kessler et al., 2000). Die Aktivierung von Rab11a zeigt im Vergleich zu Rab5 eine unterschiedliche insulinabhängige Modulation des Nukleotid-Bindestatus. Die GTP-Beladung des Rab5 wird durch Insulin inhibiert, es wird daher angenommen, dass Rab5 die basale Endozytoserate des GLUT4 reguliert (Huang et al., 2001).

Während die insulinabhängige GLUT4-Translokation in Muskelgewebe hauptsächlich durch den PI3-Kinasen-Signalweg vermittelt wird (Tsakiridis et al., 1995; Terauchi et al., 1999), spielt in Fettgewebe der Cbl/CAP-Signalweg die entscheidende Rolle in der GLUT4-Translokation (Ahmed et al., 2000; Baumann et al., 2001).

Eine aktuelle Studie konnte allerdings zeigen, dass in Herz- und Skelettmuskel auch Cbl und CAP durch Insulin aktiviert werden können (Gupte & Mora., 2006). In diesem Zusammenhang führte die Phosphorylierung von Cbl und CAP in Herzmuskel und Fettgewebe zur Aktivierung der GTPase TC10, im Skelettmuskel wurde TC10 durch Cbl und

CAP jedoch nicht aktiviert. Um zu untersuchen, ob die insulinstimulierte Aktivierung von HA-Rab11a in H9c2-hIR-Zellen durch den PI3-Kinase- oder den Cbl/CAP-Signalweg vermittelt wird, wurde die PI3-Kinase mit dem sehr effizienten Inhibitor LY294002 spezifisch gehemmt. Die Inhibierung der PI3-Kinase führte zum kompletten Verlust der insulinabhängigen Rab11a-Aktivierung (Abb. 3.13). Daraus lässt sich schließen, dass die insulinabhängige Aktivierung von Rab11a komplett über den PI3-Kinase-Signalweg vermittelt wird.

Die regulatorische p85 α -Untereinheit der PI3-Kinase trägt eine BH-Domäne, welche eine Rab-GTPasen aktivierende GAP-Domäne trägt (Chamberlain et al., 2004). Sie besitzt eine hohe GAP-Aktivität gegenüber Rab4 und Rab5 und eine geringere Aktivität gegenüber Rab11. In der genannten Arbeit wurde die direkte Bindung von p85 α an Rab5 gezeigt, über eine Bindung an Rab11 ist keine Aussage gemacht worden.

Ein Insulinstimulus führt zu einer verstärkten Bindung von p85 α an GLUT4-enthaltende Vesikel (Heller-Harrison et al., 1996). Vorstellbar wäre, dass wie im Fall des Rab5 die aktivierte p85 α -Untereinheit der PI3-Kinase Rab11a an den GLUT4-Vesikeln bindet und als Rab-GTPasen aktivierendes Protein wirkt. Dies würde die oben genannte These untermauern, dass die insulinabhängige Aktivierung von Rab11a vor allem dessen Anlagerung an GLUT4-enthaltende Vesikel stimuliert. Nach erfolgter Anlagerung könnte die GTPasen-Aktivität des Rab11a dann durch eine Interaktion mit der BH-Domäne des p85 α , stimuliert werden, wodurch es dann zur schnellen Terminierung der insulinabhängigen GTP-Beladung von Rab11a kommt. Weiterführende Experimente, in denen die Interaktion von p85 α mit Rab11a, die GAP-Aktivität gegenüber Rab11a und die Bedeutung für dessen Bindung an GLUT4-enthaltende Vesikel näher untersucht werden, sind allerdings notwendig um dieses Modell zu verifizieren.

Die Produkte der PI3-Kinase aktivieren die Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase1 (PDK1), welcher ihrerseits sowohl die Akt/PKB als auch die atypischen Proteinkinasen PKC λ und PKC ζ aktiviert (Alessi et al., 1997; Shepherd et al., 1998; Standaert et al., 1999). Es ist bekannt, dass die Membranassoziation von Rab6 durch PKCs reguliert wird (Fitzgerald & Reed, 1999; Scheper et al., 2004). Die Regulation findet über Phosphorylierung von Rab6 an zwei konservierten PKC-Phosphorylierungsstellen statt. Dadurch wird nicht nur die Dissoziation des Rab6 von mikrosomalen Membranen sondern auch dessen Affinität gegenüber GTP erhöht. Auf die GTP-Hydrolyserate selbst hat die Phosphorylierung keinen

Einfluss. Ein Phosphorylierungssubstrat der Akt ist JFC1, welches einen Regulator der GTPase Rab27a darstellt (Johnson et al., 2005). Ähnlich wie im Fall von Rab6 und PKC wird durch die von der Akt vermittelten Phosphorylierung JFC1 von Membranen entfernt und in das Zytosol verlagert. Damit wird deutlich, dass durch die Aktivierung des PI3-Kinase-Signalweges Rab-GTPasen sowohl durch Akt als auch durch PKCs entweder direkt phosphoryliert oder durch Phosphorylierung von Rab-Bindeproteinen indirekt reguliert werden können.

Um den insulininduzierten Signalweg zum Rab11a genauer zu spezifizieren, wurde eine siRNA-vermittelte Genrepression der Akt in H9c2-hIR-Zellen etabliert. In diesem Ansatz konnte die Expression der Akt um über 90 Prozent verringert werden (Abb. 3.14). Diese Verringerung der Akt-Expression führte zu einer Senkung der detektierbaren insulinabhängigen Akt-Phosphorylierung um ca. 75 Prozent. Das reicht aus, um die insulinabhängige Rab11a-Aktivierung komplett zu verhindern (Abb. 3.15). Zum einen wird daraus ersichtlich, dass Rab11a in der PI3-Signalkaskade unterhalb der Akt positioniert ist. Zum anderen lässt sich durch dieses Ergebnis ausschließen, dass die atypischen Proteinkinasen PKC λ und PKC ζ die Aktivierung des Rab11a vermitteln können.

Von dem Akt-Substrat AS160 weiß man, dass es als Rab-GTPasen aktivierendes Protein (GAP) fungiert (Kane et al., 2002). Es wird nach einem Insulinstimulus von Akt phosphoryliert und seine Rab-GAP-Funktion dadurch inhibiert (Sano et al., 2003). Diese Phosphorylierung und Inaktivierung von AS160 ist notwendig für die GLUT4-Translokation; im aktiven Zustand unterdrückt es die Exozytose von GLUT4 (Sano et al., 2003; Eguez et al., 2005). Die Inhibierung der GLUT4-Endozytose durch Insulin wird allerdings nicht durch AS160 vermittelt (Zeigerer et al., 2004). In einer Studie, in der mögliche assoziierte GTPasen des AS160 identifiziert wurden, konnte für Rab2a, Rab8a, Rab10 und Rab14 eine starke Regulation durch AS160 festgestellt werden (Mfinea et al., 2005; Ishikura et al., 2007). Rab11a wurde nur unwesentlich durch die GAP-Aktivität des AS160 reguliert. Ein mögliches Akt-Substrat welches eine ähnliche Funktion auf Rab11a ausübt wie AS160 auf die oben genannten Rab-GTPasen ist daher noch zu identifizieren. Ein weiteres potentiell Akt-Substrat mit GAP-Aktivität ist das Tbc1d1, welches hohe Ähnlichkeit mit AS160 aufweist (Roach et al., 2007). Dazu gehört allerdings auch die Substratspezifität, welche nur eine geringe Aktivität gegenüber der Rab11a-GTPase zeigt.

Ob Rab11a direkt durch Akt aktiviert wird oder weitere Proteine das Insulinsignal zu Rab11a weiterleiten, konnte durch diese Untersuchungen nicht geklärt werden. Wäre Rab11a ein direktes Substrat von Akt, könnte dies durch *in vitro* Phosphorylierung der GTPase festgestellt werden. Ist eine direkte Phosphorylierung durch Akt nicht zu beobachten, muss die Aktivierung von Rab11a durch ein Akt-Substrat erfolgen, welches entweder direkt oder indirekt einen Regulator von Rab11a darstellt. Ein solches Regulatorprotein ist beispielsweise Rab11-FIP2. An Aminosäureposition 227 trägt es ein Serin, welches von der MARK2-Kinase phosphoryliert wird (Ducharme et al., 2006). Die Phosphorylierung hat in diesem Fall allerdings keinen Einfluss auf die Funktion des Proteins im Plasmamembran-Recycling.

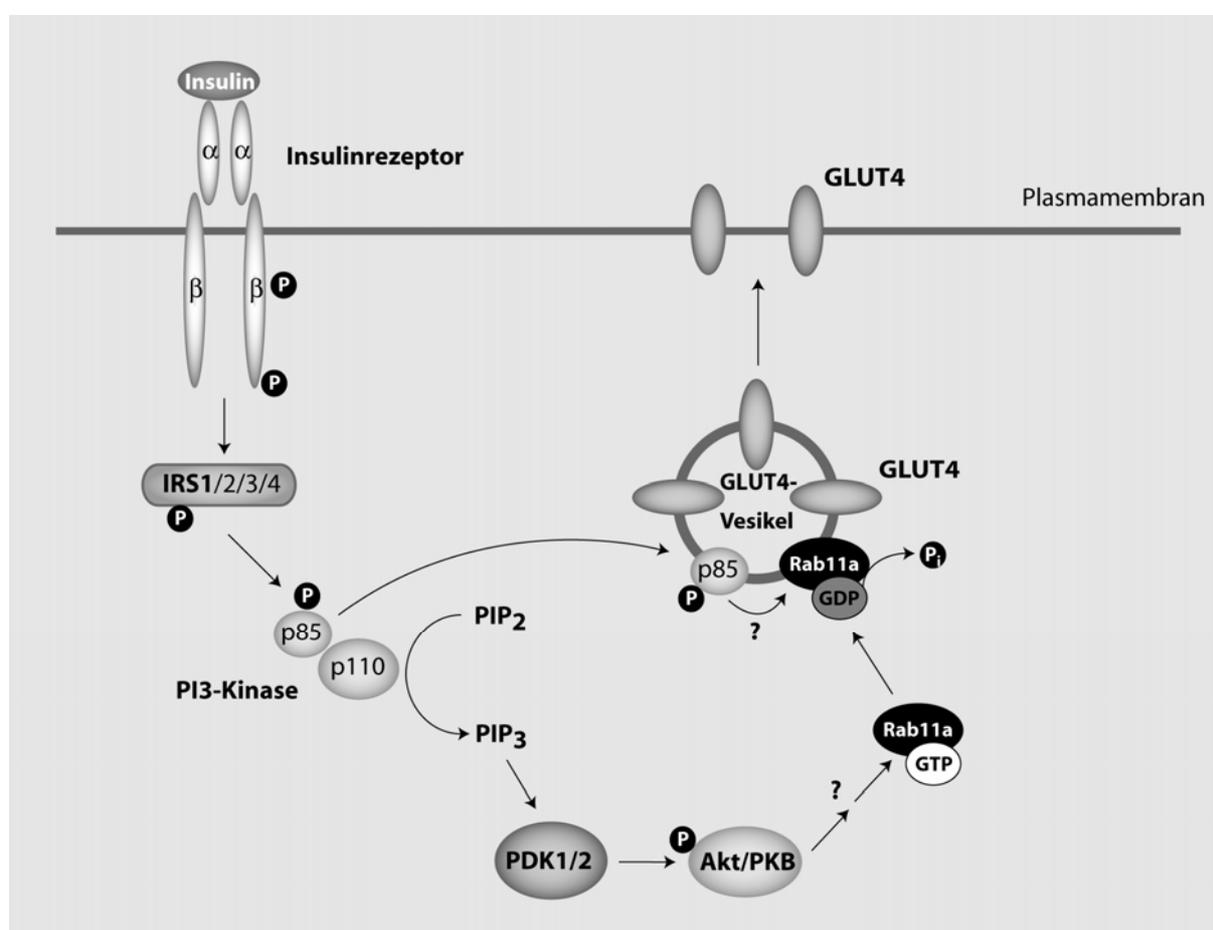


Abb. 4.1 : Modell der insulinabhängigen Rab11a-Aktivierung. Insulin aktiviert nach der Bindung an seinen Rezeptor den PI3-Kinase-Signalweg. In Abhängigkeit der Akt wird Rab11a entweder direkt durch Phosphorylierung oder indirekt durch zwischengeschaltete Proteine aktiviert und es kommt zur Bindung von GTP. Nach der anschließenden Anlagerung an GLUT4-enthaltene Vesikel wird die GTPasen-Aktivität des Rab11a beispielsweise durch die GAP-Domäne der ebenfalls durch Insulin aktivierten und in GLUT4-Vesikel verlagerten regulatorischen Untereinheit der PI3-Kinase p85 stimuliert. Dadurch kommt es zur Hydrolyse des GTP und Inaktivierung von Rab11a.

Das Rab11-Effektorprotein Rip11 spielt in polarisierten Epithelzellen eine Rolle im Transport von den apikalen Recycling-Endosomen zur apikalen Plasmamembran. In diesem System wurde gezeigt, dass die Membranständigkeit des Rip11 durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung reguliert wird (Prekeris et al., 2000). Nach dem Transport zur Plasmamembran wird Rip11 von einer bisher nicht identifizierten Kinase phosphoryliert und dadurch ins Zytosol verschoben. Zur wiederholten Assoziation an apikale Recycling-Endosomen wird es dann vermutlich wieder dephosphoryliert.

Beide Beispiele zeigen mögliche Verknüpfungspunkte zwischen der Signalweiterleitung durch Phosphorylierung und der Regulation von Rab11a durch Rab11-Effektorproteine auf. Es ist daher vorstellbar, dass neben der Modulation der GTP-Beladung von Rab11a auch dessen zelluläre Lokalisation direkt durch Aktivierung von spezifischen Rab11-Effektorproteinen insulinabhängig reguliert wird.

4.3 Translokation von GLUT4myc und FAT/CD36

4.3.1 Genrepression von Rab11a, Rip11 und Rab11-FIP2

Ein wesentlicher Vorteil der siRNA-vermittelten Genrepression gegenüber der Überexpression dominant negativer Varianten ist, dass es sich tatsächlich um eine Verringerung des endogenen Proteins handelt und nicht ein zusätzliches Protein in die Zelle eingebracht wird, welches mit dem endogenen Protein um die Bindungspartner konkurriert. Das Einbringen einer mutierten Enzym-Variante lässt keine Aussagen darüber zu, ob das mutierte Protein durch seine veränderte Konformation und der damit verbundenen Veränderung der Oberflächenladung nicht auch andere Proteine bindet, die in der endogenen Variante keine Bindungspartner oder Bindungspartner mit anderer Affinität darstellen. Aus diesen Gründen wurde die siRNA-vermittelte Genrepression als optimaler Ansatz zur funktionellen Untersuchung von Rab11a und seinen Effektoren Rip11 und Rab11-FIP2 im Zusammenhang des GLUT4-Vesikeltransports betrachtet.

Die siRNA-vermittelte Genrepression von Rab11a, Rip11 und Rab11-FIP2 zeigte in der Effizienz keine Abhängigkeit von der siRNA-Konzentration (Abb. 3.16). Über den Konzentrationsbereich von 25 bis 100 nM lassen sich alle drei Zielsequenzen gleichstark

reprimieren. Dies verdeutlicht, dass bereits geringste Mengen an siRNA ausreichen, um die mRNA eines Proteins zu degradieren und eine Erhöhung der siRNA-Menge keinesfalls zwangsweise die Effizienz der Genrepression erhöht. Bereits mit 20 nM siRNA kann die Rab11a-Expression in H9c2-hIR-Zellen auf 19,0 (\pm 2,0) Prozent reduziert werden, die Expression von Rip11 sogar auf 7,7 (\pm 2,5) Prozent. Die Expression des Rab11-FIP2 lässt sich mit diesem Ansatz allerdings nur auf 42,7 (\pm 3,5) Prozent reduzieren.

Im Vergleich zur siRNA-vermittelten Genrepression von Rab11a in HeLa-Zellen ist die Effizienz der in dieser Arbeit beschriebenen Rab11a-Genrepression vergleichbar, durch die fehlende Quantifizierung lässt sich dies allerdings nur abschätzen (Junutula et al., 2004). In WIF-B9-Zellen konnte durch Überexpression von shRNA (sh: short hairpin) gegen Rab11a sogar eine nahezu komplette Genrepression des Rab11a erreicht werden (Wakabayashi et al., 2005). Auch in einer anderen Arbeit konnte durch den Ansatz mit siRNA die Expression des Rip11 nahezu komplett verhindert werden (Peden et al., 2004).

Die Expression des Rab11-FIP2 ließ sich auch mit unterschiedlichen siRNA-Sequenzen und auch in Kombination nicht stärker verringern als auf die bereits oben erwähnten 43 Prozent. Eine erste Vermutung legt nahe, dass die getesteten siRNA-Sequenzen keine ausreichende Spezifität gegenüber Rab11-FIP2 besitzen bzw. nicht optimal entworfen sind. Um eine optimale siRNA gegen Rab11-FIP2 zu finden, wurden zahlreiche potentielle Zielsequenzen getestet. Dass auch mit unterschiedlichen siRNA-Sequenzen keine effiziente Genrepression erzielt werden konnte lässt zusätzlich vermuten, dass das Protein entweder eine im Vergleich zu Rab11a und Rip11 erheblich längere Halbwertszeit hat oder eine sehr starke mRNA-Syntheserate besitzt.

Ob trotz der prominenten Bande des Rab11-FIP2 in der Western-Blot Analyse, die mRNA-Kopienzahl durch die Transfektion mit doppelsträngiger siRNA verringert ist, wäre durch eine Realtime-PCR zu klären. Da aber letztendlich die Entfernung eines funktionellen Proteins das Ziel war, wurde als aussagekräftigste Analyse zur Findung geeigneter siRNA-Sequenzen gegen Rab11-FIP2 weiterhin die Western-Blot Analyse verwendet.

Die Überexpression des GLUT4myc tritt nicht in Wechselwirkung mit der siRNA-vermittelten Genrepression der drei Proteine (Abb. 3.18). Die Verringerung der GLUT4myc-Expression in den Ansätzen mit der gegen Rab11a und Rip11 gerichteten siRNA (87,5 bzw. 83,5 Prozent) ist nicht signifikant im Vergleich zur Negativkontrolle. Eine andere Situation

stellt sich bei der Überexpression von FAT/CD36 dar (Abb. 3.20). Während die Genrepression selbst unbeeinflusst bleibt, hat sie Auswirkung auf die Überexpression des FAT/CD36. In den Ansätzen mit Rab11a siRNA und Rab11-FIP2 siRNA ist die Expression des FAT/CD36 auf 124,4 (\pm 11,6) bzw. 111,5 (\pm 4,5) Prozent erhöht, allerdings nicht signifikant im Vergleich zur Kontrolle mit nicht kodierender siRNA ($P > 0,05$ SEM). Eine signifikante Verringerung der FAT/CD36-Expression auf 70,8 (\pm 4,4) Prozent wird durch die gegen Rip11 gerichtete siRNA verursacht ($P < 0,05$ SEM).

Neben der Veränderung der Expressionsrate des FAT/CD36 durch die siRNA könnte eine veränderte Sequestration des Fettsäuretransporters eine weitere Erklärung der Ergebnisse der Western-Blot Analyse darstellen. Da auch bei unterschiedlichen Detergenzien immer ungelöste Membranfragmente zurückbleiben, ist nicht auszuschließen, dass durch die Genrepression von Rab11a oder seiner Effektoren auch die zelluläre Lokalisation des FAT/CD36 verändert wird. Es ist bekannt, dass große Teile des Fettsäuretransporters in den Lipid-Raft-Domänen der Plasmamembran lokalisiert sind (Pfeiffer et al., 2001; Zeng et al., 2003; Pohl et al., 2005). Diese Domänen zeichnen sich durch eine hohe Dichte und veränderte Lipidzusammensetzung aus, was diese Domänen schwer zu lösen macht (Brown & London, 1998).

Es ist daher möglich, dass FAT/CD36 durch Rab11a und seine Effektoren zwischen intrazellulären Speicherkompartimenten und Domänen der Plasmamembran verschoben wird und deshalb nach der Genrepression dieser Proteine unterschiedliche Mengen des FAT/CD36 in der Western-Blot Analyse detektiert werden können.

4.3.2 Translokation von GLUT4myc unter Einfluss der Genrepression

In H9c2-hIR-Zellen, in denen GLUT4myc transient überexprimiert wird, lässt sich bei simultaner Transfektion mit nicht kodierender siRNA die GLUT4myc-Translokation in die Plasmamembran um den Faktor 1,54 (\pm 0,06) durch Insulin stimulieren (Abb. 3.21). Durch die Genrepression von Rab11a wird bereits die basale GLUT4myc-Translokation um den Faktor 1,59 (\pm 0,1) und die insulinstimulierte um den Faktor 2,41 (\pm 0,11) sehr signifikant erhöht ($P < 0,001$ SEM). Während sich dabei die absolute Menge an GLUT4myc, welches durch Insulin in die Plasmamembran verschoben wird von 0,54 (\pm 0,1) im Kontrollansatz auf

0,82 ($\pm 0,2$) im Ansatz mit Rab11-siRNA erhöht, bleibt die relative Steigerung im Vergleich zum jeweiligen Basalwert gleich (Abb. 3.22, Abb. 3.23).

Diese Beobachtungen lassen sich dadurch erklären, dass Rab11a offensichtlich einen Mediator der GLUT4-Endozytose darstellt. Dies wurde bereits in einer früheren Arbeit postuliert (Uhlig et al., 2005). Durch Überexpression von wildtyp Rab11a wurde dabei die basale und insulinstimulierte GLUT4-Translokation und Glucoseaufnahme verringert. Die Überexpression einer dominant negativen Variante des Rab11a führte allerdings nicht zu eindeutigen Ergebnissen, da sie nicht, wie man erwarten würde, den basalen und insulinstimulierten Glucosetransport erhöhte. Die in dieser Arbeit angewandte Genrepression des Rab11a durch Transfektion mit siRNA, kann als direkt gegensätzlicher Ansatz zur Überexpression des wildtyp Rab11a gesehen werden.

Das Ausschalten der Rab11a-Expression hat offensichtlich keinen Einfluss auf die Insulinstimulierbarkeit der GLUT4-Vesikel, sondern verlangsamt lediglich deren Endozytoserate. Der basale Zustand ist durch eine nur schwache Exozytose und verstärkte Endozytose des GLUT4 gekennzeichnet (Rudich & Klip, 2003; Czech & Buxton, 1993). Durch die Inhibierung des Rab11a wird daher bereits im basalen Zustand das Verhältnis von Exozytose zu Endozytose erhöht. Die Hemmung der GLUT4-Endozytose und Erhöhung der GLUT4-Exozytose durch Insulin wird daher in der Situation der Rab11-Genrepression zwar im Inkrement erhöht, bleibt aber in der relativen Aktivierung unverändert. In Kapitel 4.2.2 wurde das Rab-GTPasen aktivierende Protein AS160 diskutiert, welches die Exozytose von GLUT4 reguliert, aber keinen Einfluss auf dessen Endozytose hat (Zeigerer et al., 2004). Gegenüber Rab11a hat AS160 keine GAP-Aktivität (Minea et al., 2005). Dies unterstützt die Hypothese, dass Rab11a nicht an der Exozytose beteiligt ist, sondern einen Regulator der GLUT4-Endozytose darstellt.

Wie bereits in Kapitel 4.2.2 diskutiert, führt die Stimulation mit Insulin zu einer kurzzeitigen GTP-Beladung des Rab11a (Abb. 3.12). Diese Aktivierung des Rab11a findet in den frühen Phasen der GLUT4-Translokation statt und dient der Assoziation des Rab11a an die GLUT4-Vesikel.

Es scheint daher, dass die Assoziation des Rab11a an die GLUT4-Vesikel der späteren Endozytose, wahrscheinlich zur Terminierung der Glucoseaufnahme und Rückführung des GLUT4 in seine Speicherkompartimente, dient (Zeigerer et al., 2002; Foster et al., 2001). Das Ausschalten der Rab11a-Expression sollte daher vor allem die Präsenz des GLUT4myc in der

Plasmamembran und damit auch den Insulineffekt zeitlich verlängern. Als weiterführende Experimente wären daher Translokationsmessungen notwendig, die eine definierte Stimulationszeit und variierende Fixierungspunkte besitzt.

Die in Kapitel 4.1 diskutierten Ergebnissen der Realtime-PCR für die Isoformen Rab11a und Rab11b zeigten, dass Rab11b in H9c2-hIR-Zellen wesentlich stärker exprimiert wird als Rab11a. Im Bezug auf die GLUT4-Translokation lässt sich daher zusätzlich feststellen, dass die Vermittlung der GLUT4-Endozytose offensichtlich spezifisch für die Rab11a-Isoform ist, da Rab11b die Genrepression der a-Isoform nicht kompensatorisch ausgleichen kann.

Die Genrepression des Rab11-Effektors Rip11 zeigt keinen Einfluss auf die GLUT4myc-Translokation. Weder die basale noch die insulinstimulierte GLUT4myc-Translokation ist gegenüber der Kontrolle signifikant verändert, dies beinhaltet auch keine signifikanten Veränderungen des Inkrements der GLUT4-Translokation und des Insulineffekts.

Ganz anders sieht es aber für den Rab11-Effektor Rab11-FIP2 aus. Bereits im basalen Zustand führt die Genrepression von Rab11-FIP2 zu einer Steigerung der GLUT4myc-Translokation um den Faktor 2,36 ($\pm 0,06$), die insulinstimulierte Translokation ist um den Faktor 3,21 ($\pm 0,12$) erhöht. Diese gegenüber den Kontrollsituationen hoch signifikanten Steigerungen der Translokation ($P < 0,001$ SEM) sind damit noch stärker ausgeprägt, als die der Rab11a-Genrepression.

Dennoch ist das Inkrement, um das Insulin die GLUT4-Translokation steigert, ähnlich wie bei der Rab11a-siRNA um den Faktor 0,84 ($\pm 0,17$) im Vergleich zum Ansatz mit nicht kodierender siRNA erhöht. Dass das Inkrement im Vergleich zur Rab11a-siRNA trotz höherer basalen Translokation nicht erhöht ist, führt zu einer verringerten relativen insulinstimulierten GLUT4-Translokation. Dieser Effekt ist allerdings nicht signifikant im Vergleich zur Kontrollsituation ($P > 0,05$ SEM). Die Schlussfolgerung daraus ist, dass die Endozytose des GLUT4 durch Rab11a in Assoziation mit seinem Effektorprotein Rab11-FIP2 stattfindet. Eine Assoziation von Rab11-FIP2 und Rab11a an der Plasmamembran ist wahrscheinlich, da durch Phosphatidylinositol-3,4,5-Phosphate, welche Produkte der PI3-Kinase sind, vermehrt Rab11-Effektorproteine der Klasse I aus intrazellulären Regionen in die Peripherie der Zelle verlagert werden (Lindsay & McCaffrey, 2004a).

Es ist bekannt, dass aktiviertes Rab11a mit dem Motorprotein Myosin-Vb interagiert und dadurch das Recycling früher Endosomen über Aktin-Filamente reguliert (Lapierre et al., 2001). Die Interaktion von Rab11a mit Myosin-Vb wird dabei durch die Bildung eines

ternären Komplexes mit Rab11-FIP2 ermöglicht (Hales et al., 2002). Von diesem Komplex ist bekannt, dass er das Recycling des Transferrin-Rezeptors und des Chemokinrezeptors CXCR2 vermittelt (Lindsay & McCaffrey, 2002; Fan et al., 2004). Die Annahme liegt daher nahe, dass auch zur Internalisierung von GLUT4 die Bildung eines Komplexes aus Rab11a, Rab11-FIP2 und Myosin-Vb benötigt wird. Rab11a wird initial durch Insulin transient aktiviert, um an GLUT4-Vesikeln assoziiert und mit ihnen zur Plasmamembran verschoben zu werden.

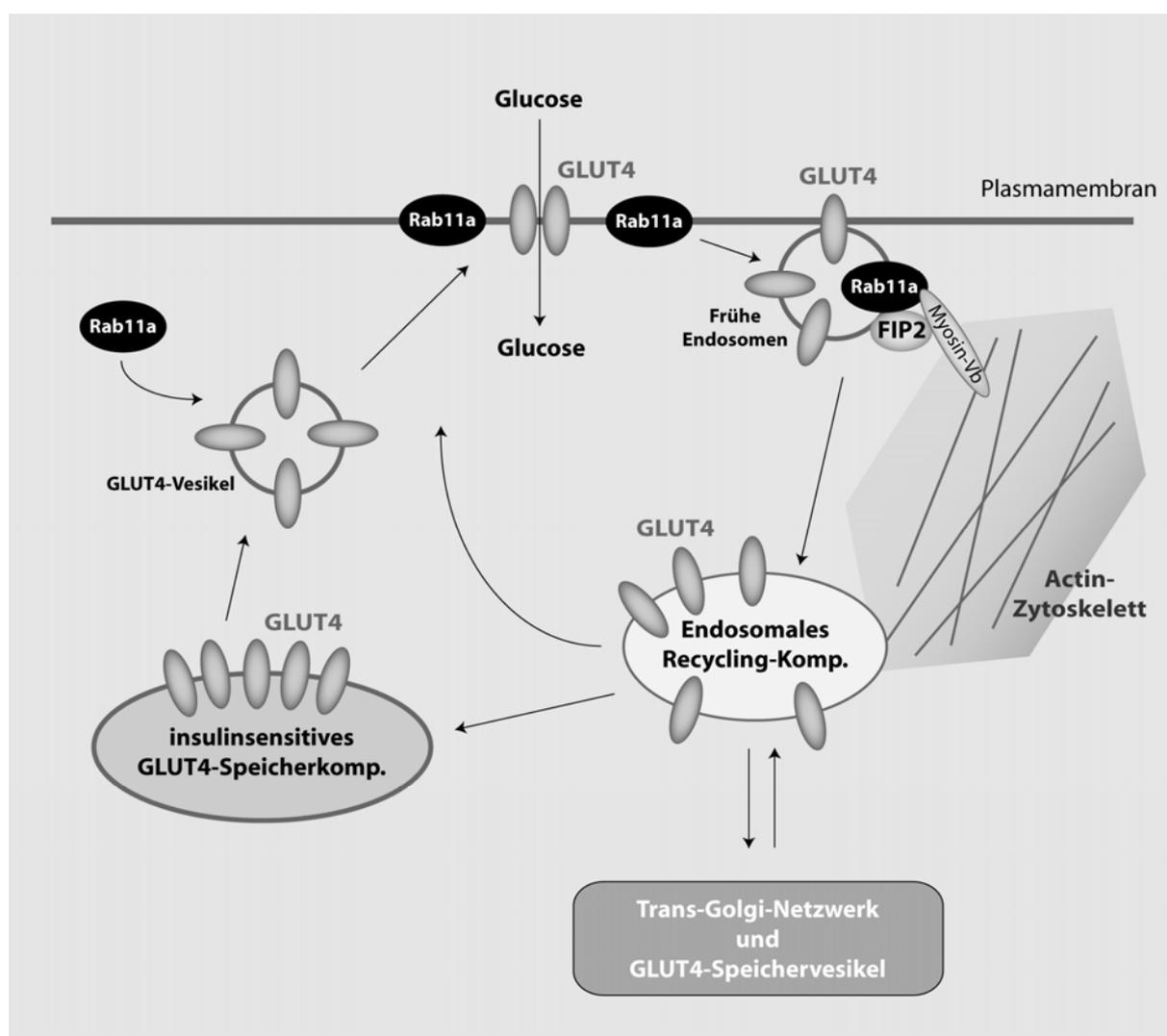


Abb. 4.2 : Modell der Funktion von Rab11a in der GLUT4-Internalisierung. Nach einer Stimulation mit Insulin wird GLUT4 aus insulinsensitiven Speicherkompartimenten in die Plasmamembran verschoben. Die Translokation geht einher mit der Rekrutierung von Rab11a an den GLUT4-Vesikeln. Rab11a akkumuliert an der Plasmamembran, wo es nach der Terminierung des Insulinsignals über seinen Effektor Rab11-FIP2 an das Motorprotein Myosin-Vb bindet. Dieser Komplex ermöglicht die Internalisierung früher Endosomen und die Endozytose von GLUT4 entlang des Zytoskeletts in das endosomale Recycling-Kompartiment. GLUT4 wird aus diesem Kompartiment entweder wieder in die Plasmamembran recycelt oder in Speicherkompartimente verschoben.

Es ist daher zu vermuten, dass es wahrscheinlich im Zuge der Terminierung des Insulinsignals zu einer Bindung von Rab11a, Rab11-FIP2 und Myosin-Vb kommt, wodurch die Internalisierung des GLUT4 wieder verstärkt wird.

Weiterführende Experimente müssten die Beteiligung des Myosin-Vb an der GLUT4-Endozytose untersuchen, eine Genrepression des Myosin-Vb sollte ähnliche Effekte auf die GLUT4-Translokation ausüben wie die Genrepression von Rab11a und Rab11-FIP2.

Die Rekrutierung von Rab11-FIP2 an Rab11a während der GLUT4-Internalisierung ist nicht nur notwendig, um mit Myosin den Vesikeltransport entlang des Zytoskeletts zu vermitteln, sondern auch, um mit EHD-Proteinen (EHD: Eps15-Homologie-Domäne) zu interagieren (Naslavsky et al., 2006). Diese Proteine regulieren den Transport früher Endosomen zum endosomalen Recycling-Kompartiment. Es ist beispielsweise bekannt, dass EHD2 an der Clathrin-vermittelten Endozytose von GLUT4-Vesikeln entlang des Aktin-Zytoskeletts beteiligt ist (Guilherme et al., 2004; Park et al., 2004). Für Rab11-FIP2 konnte gezeigt werden, dass es mit EHD1 und EHD3 interagiert und die Internalisierung des Transferrin-Rezeptors reguliert (Naslavsky et al., 2006).

Rab11a und Rab11-FIP2 regulieren daher offensichtlich den Transport von GLUT4 über frühe Endosomen zum endosomalen Recycling-Kompartiment. Aus dem endosomalen Recycling-Kompartiment wird das GLUT4 entweder zur Plasmamembran recycelt oder in GLUT4-Speicherkompartimente verschoben (Dugani & Klip, 2005).

4.3.3 Translokation von FAT/CD36 unter Einfluss der Genrepression

Ähnlich wie GLUT4 ist auch der Fettsäuretransporter sowohl in der Plasmamembran, als auch in mikrosomalen Membranen zu detektieren (Müller et al., 2002). Wie GLUT4 enthalten auch FAT/CD36-Vesikel Rab11a, allerdings führt ein Insulinstimulus in dieser Vesikelpopulation nicht zu einer verstärkten Assoziation der GTPase. Um zu untersuchen, ob Rab11a den Transport von FAT/CD36-Vesikel auf eine ähnliche Weise wie den der GLUT4-Vesikel reguliert, wurde versucht, auch die Translokation von FAT/CD36 durch Insulin zu stimulieren. Dass durch die Stimulation mit Insulin in H9c2-hIR-Zellen keine Translokation von FAT/CD36 in die Plasmamembran induziert werden konnte, bestätigt bereits veröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe (Müller et al., 2002). Aus diesem Grund wurde ein alternativer Stimulus gesucht, der eine Translokation des FAT/CD36 induzieren kann.

Eine Senkung des ATP/ADP-Verhältnisses, beispielsweise durch körperliche Aktivität, führt zur Phosphorylierung und Aktivierung der AMP-Kinase (AMPK) was dann, ähnlich wie der PI3-Kinase-Signalweg, zur Translokation von GLUT4 in die Plasmamembran und zur erhöhten Glucoseaufnahme führt (Coven et al., 2003; Till et al., 1997; Russell et al., 1999). In primären Kardiomyozyten konnte gezeigt werden, dass Kontraktion durch eine Aktivierung der AMP-Kinase auch zur Translokation des Fettsäuretransporters FAT/CD36 in die Plasmamembran und zur erhöhten Aufnahme langkettiger Fettsäuren führt (Luiken et al., 2003).

In den H9c2-hIR-Zellen ließ sich durch hyperosmotischen Schock die Phosphorylierung der AMP-Kinase signifikant um den Faktor 2,2 (\pm 0,26) steigern ($P < 0,05$ SEM), andere Aktivatoren der AMP-Kinase oder Insulin (als Negativkontrolle) führten zu keiner signifikanten Steigerung der AMPK-Phosphorylierung (Abb. 3.24). Der hyperosmotische Schock wurde durch Inkubation mit 0,6 M D-Sorbitol ausgelöst.

Die Translokation des FAT/CD36 wird bei simultaner Transfektion mit nicht-kodierender siRNA um den Faktor 1,38 (\pm 0,27) durch D-Sorbitol gesteigert (Abb. 3.25). Die Genrepression von Rab11a hat einen sehr starken Effekt sowohl auf die basale, als auch auf die durch D-Sorbitol induzierte FAT/CD36-Translokation. Sie wird um den Faktor 3,48 (\pm 0,16) bzw. 4,52 (\pm 0,2) hoch signifikant gesteigert ($P < 0,001$ SEM). Während das Inkrement der stimulierten Translokation in der Kontrollsituation 0,38 (\pm 0,23) beträgt, ist es in der Situation der Rab11a-Genrepression auf 1,04 (\pm 0,35) signifikant erhöht (Abb. 3.26, $P < 0,05$ SEM). Ähnlich wie in der GLUT4myc-Translokation bleibt die relative Steigerung der FAT/CD36-Translokation während der Rab11a-Genrepression unverändert (Abb. 3.27). Mechanistisch betrachtet, lässt sich für Rab11a daher eine ähnliche Funktion in der GLUT4- und der FAT/CD36-Internalisierung postulieren.

Eine andere Situation stellt sich in Anbetracht der Effektorproteine Rip11 und Rab11-FIP2 dar. Während die Rip11-Genrepression keinen Einfluss auf die GLUT4myc-Translokation zeigt, führt sie zu einer signifikanten Steigerung sowohl der basalen als auch der durch D-Sorbitol induzierten FAT/CD36-Translokation um den Faktor 1,75 (\pm 0,13) bzw. 2,41 (\pm 0,14) ($P < 0,01$ bzw. $P < 0,001$ SEM). Auch das Inkrement der stimulierten Translokation ist auf 0,66 (\pm 0,27) erhöht, erreicht aber durch die große Streuung keine Signifikanz im Vergleich zur Kontrollsituation ($P > 0,05$ SEM). Auch hier bleibt die relative Steigerung der FAT/CD36-Translokation unverändert.

Vergleicht man den Effekt, den die Genrepression von Rab11a und Rip11 auf die FAT/CD36-Translokation hat, lässt sich vermuten, dass Rip11 nicht das primäre Effektorprotein des Rab11a ist, welches dessen Funktion in der FAT/CD36-Internalisierung reguliert. Durch das Ausschalten der Expression von Rab11-FIP2 wird ebenfalls sowohl die basale, als auch die induzierte FAT/CD36-Translokation gesteigert. Mit einem Faktor von 2,85 (\pm 0,17) in der basalen, bzw. 3,36 (\pm 0,14) in der stimulierten Situation ist sie stärker ausgeprägt, als während der Rip11-Genrepression und erreicht in beiden Situationen eine hohe Signifikanz im Vergleich zu den Kontrollsituationen ($P < 0,001$ SEM).

Allerdings bleibt trotz der hohen Steigerung der Translokation sowohl das Inkrement, als auch die relative Steigerung der Translokation im Vergleich zur Kontrollsituation mit nicht-kodierender siRNA unverändert. Da der Effekt, den D-Sorbitol auf die FAT/CD36-Translokation hat, auch im Inkrement nicht erhöht ist, scheint Rab11-FIP2 ausschließlich die basale Endozytoserate des FAT/CD36 zu regulieren. Durch die Genrepression von Rab11-FIP2 wird diese stabil erhöht, eine Stimulation mit Sorbitol verstärkt die Exozytose ohne die Endozytose zu beeinflussen.

In Kardiomyozyten von adipösen Zucker-Ratten kommt es zu einer erhöhten Exozytose des FAT/CD36 und damit verbunden zu einer erhöhten Aufnahme langkettiger Fettsäuren (Coort et al., 2004; Luiken et al., 2001). Die Anhäufung von Lipiden im Herzmuskel führt zu myokardialer Dysfunktion und der Entwicklung einer Insulinresistenz (Unger, 2002).

Ein wesentlicher Unterschied im Vergleich zur GLUT4myc-Translokation sind die Resultate der Genrepression der Rab11a-Effektorproteine. Während bei GLUT4 die Funktion des Rab11a stark mit der Funktion des Rab11-FIP2 korreliert, können in der FAT/CD36-Translokation weder Rip11 noch Rab11-FIP2 direkt mit den Effekten, die ein Ausschalten des Rab11a hat, assoziiert werden. Es müssen daher weitere Rab11a-Effektorproteine untersucht werden um herauszufinden, welches Rab11a in der FAT/CD36-Internalisierung reguliert. Da aber sowohl Rip11 als auch Rab11-FIP2 die Translokation signifikant beeinflussen, ist die Bildung eines polymeren Proteinkomplexes zur Internalisierung von FAT/CD36 eine wahrscheinliche Erklärung. Rab11-Effektorproteine können über ihrem C-Terminus auch untereinander in Wechselwirkung treten (Wallace et al., 2002). Durch die Bildung variierender Rab11-Effektor-Komplexe kann die endozytotische Funktion des Rab11a für unterschiedliche Vesikelpopulationen und unterschiedliche Internalisierungs-Routen hoch spezifisch reguliert werden.

5. Zusammenfassung

Der Mechanismus, durch den Insulin die Glucoseaufnahme in Zellen stimuliert, beruht darauf, dass GLUT4 vermehrt aus intrazellulären Kompartimenten zur Plasmamembran transloziert wird. Seit mehreren Jahren ist bekannt, dass die Rab-GTPase Rab11a nach Stimulation mit Insulin an GLUT4-enhaltenden Vesikeln akkumuliert und zusammen mit GLUT4 an die Plasmamembran verschoben wird.

Veränderte GLUT4-Translokationen nach Überexpression sowohl konstitutiv aktiver, als auch dominant negativer Rab11a Varianten deuten auf die Rolle der Rab11a in diesem Prozess hin. Völlig unklar ist allerdings, welche Signale Rab11a an den Vesikeln akkumulieren lässt und welche Funktion es dort einnimmt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Rab11a in intakten Myoblasten durch Insulin nach wenigen Minuten transient aktiviert wird. Die Aktivierung erfolgt kurz nach Phosphorylierung der Akt durch Insulin, wird aber im Gegensatz zu dieser bereits nach wenigen Minuten wieder terminiert. Durch Hemmversuche und den Einsatz spezifischer siRNA ließ sich feststellen, dass diese Aktivierung von Rab11a durch den PI3-Kinasen-Signalweg und unterhalb der Akt vermittelt wird.

Durch siRNA-vermittelte Genrepression von Rab11a und zwei seiner Effektoren, dem Rip11 und Rab11-FIP2, konnte gezeigt werden, dass Rab11a im Zusammenspiel mit Rab11-FIP2 die Internalisierung des Glucosetransporters GLUT4, wahrscheinlich den Transport von frühen Endosomen zum endosomalen Recycling-Kompartiment, steuert. Auch die Endozytose des Fettsäuretransporters FAT/CD36 wird durch Rab11a reguliert. Allerdings konnte weder Rip11 noch Rab11-FIP2 als einzeln ausreichendes Effektorprotein in diesem Prozess identifiziert werden.

Durch die hier getätigten Arbeiten konnte die Funktion von Rab11a auf die Regulation der Endozytose von GLUT4- und FAT/CD36-enhaltenden Vesikeln genauer definiert werden. Mechanistisch wird diese Funktion bei GLUT4 durch den Effektor Rab11-FIP2 reguliert, welcher als Bindepartner von Myosin-Vb die Internalisierung entlang des Aktin-Zytoskeletts vermittelt. Rab11a wird über die PI3-Kinase kurzzeitig durch Insulin aktiviert und konnte daher als direkte Komponente des Insulin-Signalweges identifiziert werden.

5. Summary

The mechanism by which insulin stimulates glucose uptake in cells is based on increased translocation of GLUT4 from intracellular storage compartments to the plasma membrane. Since several years it is known that the small Rab-GTPase Rab11a accumulates in GLUT4 containing vesicles and is shifted to the plasma membrane with those vesicles in response to insulin.

Altered GLUT4 translocation after overexpression of constitutive active and dominant negative Rab11a variants indicates the role of Rab11a in this process. However, it remained elusive which signals lead to an accumulation of Rab11a on those vesicles and which functional role the GTPase has.

In this study in intact myoblasts it could be shown that Rab11a is activated rapidly and transiently by insulin. The activation occurs shortly after phosphorylation of Akt by insulin and, in contrast to Akt phosphorylation, is terminated after few minutes. By inhibition of PI3-kinase and siRNA mediated gene knockdown of Akt it could be shown that this activation goes along the PI3-kinase pathway and occurs downstream of Akt.

Gene knockdown of Rab11a and two of its effectors, Rip11 and Rab11-FIP2, showed that Rab11a in concert with Rab11-FIP2 mediates the internalization of the glucose transporter GLUT4, probably the transport from early endosomes to the endosomal recycling compartment. The endocytosis of the fatty acid translocase FAT/CD36 is also regulated by Rab11a. However, neither Rip11 nor Rab11-FIP2 could be identified as the major effector protein mediating this process.

The results of this study could further elucidate the functional role of Rab11a in the regulation of GLUT4 and FAT/CD36 endocytosis. In case of GLUT4 internalization the functional role of Rab11a is carried out mechanistically by its effector Rab11-FIP2, which acts as a binding partner of Myosin-Vb in the internalization along the actin cytoskeleton. Rab11a is transiently activated by insulin on a PI3-kinase dependent pathway and could therefore be identified as a component of the insulin signaling cascade.

6. Literaturverzeichnis

Abel ED, Peroni O, Kim JK, Kim YB, Boss O, Hadro E, Minnemann T, Shulman GI, Kahn BB. (2001) Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature*. 409(6821):729-33.

Abumrad NA, el-Maghrabi MR, Amri EZ, Lopez E, Grimaldi PA. (1993) Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. *J. Biol. Chem.* 268(24):17665-8.

Ahmed Z, Smith BJ, Pillay TS. (2000) The APS adapter protein couples the insulin receptor to the phosphorylation of c-Cbl and facilitates ligand-stimulated ubiquitination of the insulin receptor. *FEBS Lett.* 475(1):31-4.

Ahn MY, Katsanakis KD, Bheda F, Pillay TS. (2004) Primary and essential role of the adaptor protein APS for recruitment of both c-Cbl and its associated protein CAP in insulin signaling. *J. Biol. Chem.* 279(20):21526-32.

Aizawa T, Komatsu M. (2005) Rab27a: a new face in beta cell metabolism-secretion coupling. *J. Clin. Invest.* 115(2):227-30.

Aledo JC, Darakhshan F, Hundal HS. (1995) Rab4, but not the transferrin receptor, is colocalized with GLUT4 in an insulin-sensitive intracellular compartment in rat skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215(1):321-8.

Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, Cohen P. (1997) Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B α . *Curr. Biol.* 7(4):261-9.

Alexandrov K, Horiuchi H, Steele-Mortimer O, Seabra MC, Zerial M. (1994) Rab escort protein-1 is a multifunctional protein that accompanies newly prenylated rab proteins to their target membranes. *EMBO J.* 13(22):5262-73.

Al-Hasani H, Kunamneni RK, Dawson K, Hinck CS, Muller-Wieland D, Cushman SW. (2002) Roles of the N- and C-termini of GLUT4 in endocytosis. *J. Cell. Sci.* 115(Pt 1):131-40.

Allan BB, Weissman J, Aridor M, Moyer B, Chen CD, Yoo JS, Balch WE. (2000) Stage-specific assays to study biosynthetic cargo selection and role of SNAREs in export from the endoplasmic reticulum and delivery to the Golgi. *Methods.* 20(4):411-6.

Andres DA, Seabra MC, Brown MS, Armstrong SA, Smeland TE, Cremers FP, Goldstein JL. (1993) cDNA cloning of component A of Rab geranylgeranyl transferase and demonstration of its role as a Rab escort protein. *Cell.* 73(6):1091-9.

Antonetti DA, Algenstaedt P, Kahn CR. (1996) Insulin receptor substrate 1 binds two novel splice variants of the regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in muscle and brain. *Mol. Cell Biol.* 16(5):2195-203.

- Asano T, Katagiri H, Takata K, Lin JL, Ishihara H, Inukai K, Tsukuda K, Kikuchi M, Hirano H, Yazaki Y, et al.** (1991) The role of N-glycosylation of GLUT1 for glucose transport activity. *J. Biol. Chem.* 266(36):24632-6.
- Atkinson LL, Kozak R, Kelly SE, Onay Besikci A, Russell JC, Lopaschuk GD.** (2003) Potential mechanisms and consequences of cardiac triacylglycerol accumulation in insulin-resistant rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 284(5):E923-30.
- Barr VA, Malide D, Zarnowski MJ, Taylor SI, Cushman SW.** (1997) Insulin stimulates both leptin secretion and production by rat white adipose tissue. *Endocrinology.* 138(10):4463-72.
- Baumann CA, Brady MJ, Saltiel AR.** (2001) Activation of glycogen synthase by insulin in 3T3-L1 adipocytes involves c-Cbl-associating protein (CAP)-dependent and CAP-independent signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 276(9):6065-8.
- Baumann CA, Ribon V, Kanzaki M, Thurmond DC, Mora S, Shigematsu S, Bickel PE, Pessin JE, Saltiel AR.** (2000) CAP defines a second signalling pathway required for insulin-stimulated glucose transport. *Nature.* 407(6801):202-7.
- Berg JS, Powell BC, Cheney RE.** (2001) A millennial myosin census. *Mol. Biol. Cell.* 12(4):780-94.
- Bernards A, Settleman J.** (2004) GAP control: regulating the regulators of small GTPases. *Trends Cell. Biol.* 14(7):377-85.
- Berwick DC, Dell GC, Welsh GI, Heesom KJ, Hers I, Fletcher LM, Cooke FT, Tavare JM.** (2004) Protein kinase B phosphorylation of PIKfyve regulates the trafficking of GLUT4 vesicles. *J. Cell. Sci.* 117(Pt 25):5985-93.
- Bielli A, Thornqvist PO, Hendrick AG, Finn R, Fitzgerald K, McCaffrey MW.** (2001) The small GTPase Rab4A interacts with the central region of cytoplasmic dynein light intermediate chain-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281(5):1141-53.
- Bielli P, Casavola EC, Biroccio A, Urbani A, Ragnini-Wilson A.** (2006) GTP drives myosin light chain 1 interaction with the class V myosin Myo2 IQ motifs via a Sec2 RabGEF-mediated pathway. *Mol. Microbiol.* 59(5):1576-90.
- Birnbaum MJ.** (1989) Identification of a novel gene encoding an insulin-responsive glucose transporter protein. *Cell.* 57(2):305-15.
- Birnbaum MJ, Haspel HC, Rosen OM.** (1986) Cloning and characterization of a cDNA encoding the rat brain glucose-transporter protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 83(16):5784-8.
- Bock JB, Matern HT, Peden AA, Scheller RH.** (2001) A genomic perspective on membrane compartment organization. *Nature.* 409(6822):839-41.
- Bose A, Guilherme A, Robida SI, Nicoloso SM, Zhou QL, Jiang ZY, Pomerleau DP, Czech MP.** (2002) Glucose transporter recycling in response to insulin is facilitated by myosin Myo1c. *Nature.* 420(6917):821-4.

- Bourne HR, Sanders DA, McCormick F.** (1991) The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*. 349(6305):117-27.
- Brady MJ, Bourbonais FJ, Saltiel AR.** (1998) The activation of glycogen synthase by insulin switches from kinase inhibition to phosphatase activation during adipogenesis in 3T3-L1 cells. *J. Biol. Chem.* 273(23):14063-6.
- Broadie K, Prokop A, Bellen HJ, O'Kane CJ, Schulze KL, Sweeney ST.** (1995) Syntaxin and synaptobrevin function downstream of vesicle docking in *Drosophila*. *Neuron*. 15(3):663-73.
- Brown DA, London E.** (1998) Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 14:111-36.
- Brozinick JT Jr, McCoid SC, Reynolds TH, Nardone NA, Hargrove DM, Stevenson RW, Cushman SW, Gibbs EM.** (2001) GLUT4 overexpression in db/db mice dose-dependently ameliorates diabetes but is not a lifelong cure. *Diabetes*. 50(3):593-600.
- Bryant NJ, Govers R, James DE.** (2002) Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3(4):267-77.
- Bucci C, Thomsen P, Nicoziani P, McCarthy J, van Deurs B.** (2000) Rab7: a key to lysosome biogenesis. *Mol. Biol. Cell.* 11(2):467-80.
- Bucci C, Wandinger-Ness A, Lutcke A, Chiariello M, Bruni CB, Zerial M.** (1994) Rab5a is a common component of the apical and basolateral endocytic machinery in polarized epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 91(11):5061-5.
- Calakos N, Scheller RH.** (1996) Synaptic vesicle biogenesis, docking, and fusion: a molecular description. *Physiol. Rev.* 76(1):1-29.
- Calhoun BC, Lapierre LA, Chew CS, Goldenring JR.** (1998) Rab11a redistributes to apical secretory canaliculus during stimulation of gastric parietal cells. *Am. J. Physiol.* 275(1 Pt 1):C163-70.
- Carroll KS, Hanna J, Simon I, Krise J, Barbero P, Pfeffer SR.** (2001) Role of Rab9 GTPase in facilitating receptor recruitment by TIP47. *Science*. 292(5520):1373-6.
- Casanova JE, Wang X, Kumar R, Bhartur SG, Navarre J, Woodrum JE, Altschuler Y, Ray GS, Goldenring JR.** (1999) Association of Rab25 and Rab11a with the apical recycling system of polarized Madin-Darby canine kidney cells. *Mol. Biol. Cell.* 10(1):47-61.
- Chamberlain MD, Berry TR, Pastor MC, Anderson DH.** (2004) The p85alpha subunit of phosphatidylinositol 3'-kinase binds to and stimulates the GTPase activity of Rab proteins. *J. Biol. Chem.* 279(47):48607-14.
- Chang L, Adams RD, Saltiel AR.** (2002) The TC10-interacting protein CIP4/2 is required for insulin-stimulated Glut4 translocation in 3T3L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(20):12835-40.

- Charron MJ, Brosius FC 3rd, Alper SL, Lodish HF.** (1989) A glucose transport protein expressed predominately in insulin-responsive tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 86(8):2535-9.
- Chavrier P, Parton RG, Hauri HP, Simons K, Zerial M.** (1990) Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments. *Cell.* 62(2):317-29.
- Chen X, Matsumoto H, Hinck CS, Al-Hasani H, St-Denis JF, Whiteheart SW, Cushman SW.** (2005) Demonstration of differential quantitative requirements for NSF among multiple vesicle fusion pathways of GLUT4 using a dominant-negative ATPase-deficient NSF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 333(1):28-34.
- Chiang SH, Baumann CA, Kanzaki M, Thurmond DC, Watson RT, Neudauer CL, Macara IG, Pessin JE, Saltiel AR.** (2001) Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10. *Nature.* 410(6831):944-8.
- Chiang SH, Hou JC, Hwang J, Pessin JE, Saltiel AR.** (2002) Cloning and functional characterization of related TC10 isoforms, a subfamily of Rho proteins involved in insulin-stimulated glucose transport. *J. Biol. Chem.* 277(15):13067-73.
- Cho W.** (2001) Membrane targeting by C1 and C2 domains. *J. Biol. Chem.* 276(35):32407-10.
- Cho H, Thorvaldsen JL, Chu Q, Feng F, Birnbaum MJ.** (2001) Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *J. Biol. Chem.* 276(42):38349-52.
- Chou CK, Dull TJ, Russell DS, Gherzi R, Lebwohl D, Ullrich A, Rosen OM.** (1987) Human insulin receptors mutated at the ATP-binding site lack protein tyrosine kinase activity and fail to mediate postreceptor effects of insulin. *J. Biol. Chem.* 262(4):1842-7.
- Christoffersen C, Bollano E, Lindegaard ML, Bartels ED, Goetze JP, Andersen CB, Nielsen LB.** (2003) Cardiac lipid accumulation associated with diastolic dysfunction in obese mice. *Endocrinology.* 144(8):3483-90.
- Clarke M, Ewart MA, Santy LC, Prekeris R, Gould GW.** (2006) ACRP30 is secreted from 3T3-L1 adipocytes via a Rab11-dependent pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 342(4):1361-7.
- Clement S, Krause U, Desmedt F, Tanti JF, Behrends J, Pesesse X, Sasaki T, Penninger J, Doherty M, Malaisse W, Dumont JE, Le Marchand-Brustel Y, Erneux C, Hue L, Schurmans S.** (2001) The lipid phosphatase SHIP2 controls insulin sensitivity. *Nature.* 409(6816):92-7.
- Cohen AW, Combs TP, Scherer PE, Lisanti MP.** (2003) Role of caveolin and caveolae in insulin signaling and diabetes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 285(6):E1151-60.
- Colicelli J.** (2004) Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Sci. STKE.* 2004(250):RE13.

- Cong LN, Chen H, Li Y, Zhou L, McGibbon MA, Taylor SI, Quon MJ.** (1997) Physiological role of Akt in insulin-stimulated translocation of GLUT4 in transfected rat adipose cells. *Mol. Endocrinol.* 11(13):1881-90.
- Coort SL, Luiken JJ, van der Vusse GJ, Bonen A, Glatz JF.** (2004) Increased FAT (fatty acid translocase)/CD36-mediated long-chain fatty acid uptake in cardiac myocytes from obese Zucker rats. *Biochem. Soc. Trans.* 32(Pt 1):83-5.
- Cormont M, Le Marchand-Brustel Y.** (2001) The role of small G-proteins in the regulation of glucose transport. *Mol. Membr. Biol.* 18(3):213-20.
- Cormont M, Tanti JF, Zahraoui A, Van Obberghen E, Tavitian A, Le Marchand-Brustel Y.** (1993) Insulin and okadaic acid induce Rab4 redistribution in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 268(26):19491-7.
- Corvera S, Czech MP.** (1998) Direct targets of phosphoinositide 3-kinase products in membrane traffic and signal transduction. *Trends. Cell. Biol.* 8(11):442-6.
- Coster AC, Govers R, James DE.** (2004) Insulin stimulates the entry of GLUT4 into the endosomal recycling pathway by a quantal mechanism. *Traffic.* 5(10):763-71.
- Coven DL, Hu X, Cong L, Bergeron R, Shulman GI, Hardie DG, Young LH.** (2003) Physiological role of AMP-activated protein kinase in the heart: graded activation during exercise. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 285(3):E629-36.
- Cox D, Lee DJ, Dale BM, Calafat J, Greenberg S.** (2000) A Rab11-containing rapidly recycling compartment in macrophages that promotes phagocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97(2):680-5.
- Cox AD, Der CJ.** (2002) Farnesyltransferase inhibitors: promises and realities. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2(4):388-93.
- Cushman SW, Wardzala LJ.** (1980) Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell. Apparent translocation of intracellular transport systems to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 255(10):4758-62.
- Czech MP.** (1995) Molecular actions of insulin on glucose transport. *Annu. Rev. Nutr.* 15:441-71.
- Czech MP, Buxton JM.** (1993) Insulin action on the internalization of the GLUT4 glucose transporter in isolated rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* 268(13):9187-90.
- Czech MP, Corvera S.** (1999) Signaling mechanisms that regulate glucose transport. *J. Biol. Chem.* 274(4):1865-8.
- Damiani MT, Pavarotti M, Leiva N, Lindsay AJ, McCaffrey MW, Colombo MI.** (2004) Rab coupling protein associates with phagosomes and regulates recycling from the phagosomal compartment. *Traffic.* 5(10):785-97.

- Dawson PA, Mychaleckyj JC, Fossey SC, Mihic SJ, Craddock AL, Bowden DW.** (2001) Sequence and functional analysis of GLUT10: a glucose transporter in the Type 2 diabetes-linked region of chromosome 20q12-13.1. *Mol. Genet. Metab.* 74(1-2):186-99.
- De Fronzo RA, Ferrannini E, Sato Y, Felig P, Wahren J.** (1981) Synergistic interaction between exercise and insulin on peripheral glucose uptake. *J. Clin. Invest.* 68(6):1468-74.
- De Meyts P, Urso B, Christoffersen CT, Shymko RM.** (1995) Mechanism of insulin and IGF-I receptor activation and signal transduction specificity. Receptor dimer cross-linking, bell-shaped curves, and sustained versus transient signaling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 766:388-401.
- Ducharme NA, Hales CM, Lapierre LA, Ham AJ, Oztan A, Apodaca G, Goldenring JR.** (2006) MARK2/EMK1/Par-1/Balalpha phosphorylation of Rab11-family interacting protein 2 is necessary for the timely establishment of polarity in Madin-Darby canine kidney cells. *Mol. Biol. Cell.* 17(8):3625-37.
- Fehmann HC, Strowski MZ, Göke B.** (2004) Diabetes mellitus mit monogen determinierter Störung der Beta-Zell-Funktion: Maturity-onset Diabetes of the Young. *Deutsches Ärzteblatt* 101(13):A-860 / B-719 / C-698
- Diaz E, Pfeffer SR.** (1998) TIP47: a cargo selection device for mannose 6-phosphate receptor trafficking. *Cell.* 93(3):433-43.
- Dice JF.** (1987) Molecular determinants of protein half-lives in eukaryotic cells. *FASEB J.* 1(5):349-57.
- Doege H, Bocianski A, Joost HG, Schurmann A.** (2000) Activity and genomic organization of human glucose transporter 9 (GLUT9), a novel member of the family of sugar-transport facilitators predominantly expressed in brain and leucocytes. *Biochem. J.* 350 Pt 3:771-6.
- Doege H, Bocianski A, Scheepers A, Axer H, Eckel J, Joost HG, Schurmann A.** (2001) Characterization of human glucose transporter (GLUT) 11 (encoded by SLC2A11), a novel sugar-transport facilitator specifically expressed in heart and skeletal muscle. *Biochem. J.* 359(Pt 2):443-9.
- Dugani CB, Klip A.** (2005) Glucose transporter 4: cycling, compartments and controversies. *EMBO Rep.* 6(12):1137-42.
- Ebina Y, Ellis L, Jarnagin K, Edery M, Graf L, Clauser E, Ou JH, Masiarz F, Kan YW, Goldfine ID, et al.** (1985) The human insulin receptor cDNA: the structural basis for hormone-activated transmembrane signalling. *Cell.* 40(4):747-58.
- Echard A, Jollivet F, Martinez O, Lacapere JJ, Rousselet A, Janoueix-Lerosey I, Goud B.** (1998) Interaction of a Golgi-associated kinesin-like protein with Rab6. *Science.* 279(5350):580-5.
- Eguez L, Lee A, Chavez JA, Miinea CP, Kane S, Lienhard GE, McGraw TE.** (2005) Full intracellular retention of GLUT4 requires AS160 Rab GTPase activating protein. *Cell. Metab.* 2(4):263-72.

- Eehalt R, Fullekrug J, Pohl J, Ring A, Herrmann T, Stremmel W.** (2006) Translocation of long chain fatty acids across the plasma membrane--lipid rafts and fatty acid transport proteins. *Mol. Cell. Biochem.* 284(1-2):135-40.
- Emoto M, Langille SE, Czech MP.** (2001) A role for kinesin in insulin-stimulated GLUT4 glucose transporter translocation in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 276(14):10677-82.
- Etienne-Manneville S, Hall A.** (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature.* 420(6916):629-35.
- Ewart MA, Clarke M, Kane S, Chamberlain LH, Gould GW.** (2005) Evidence for a role of the exocyst in insulin-stimulated Glut4 trafficking in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 280(5):3812-6.
- Fan GH, Lapierre LA, Goldenring JR, Sai J, Richmond A.** (2004) Rab11-family interacting protein 2 and myosin Vb are required for CXCR2 recycling and receptor-mediated chemotaxis. *Mol. Biol. Cell.* 15(5):2456-69.
- Feener EP, Backer JM, King GL, Wilden PA, Sun XJ, Kahn CR, White MF.** (1993) Insulin stimulates serine and tyrosine phosphorylation in the juxtamembrane region of the insulin receptor. *J. Biol. Chem.* 268(15):11256-64.
- Feng Y, Press B, Wandinger-Ness A.** (1995) Rab 7: an important regulator of late endocytic membrane traffic. *J. Cell. Biol.* 131(6 Pt 1):1435-52.
- Ferrannini E, Buzzigoli G, Bonadonna R, Giorico MA, Oleggini M, Graziadei L, Pedrinelli R, Brandi L, Bevilacqua S.** (1987) Insulin resistance in essential hypertension. *N. Engl. J. Med.* 317(6):350-7.
- Fielding AB, Schonteich E, Matheson J, Wilson G, Yu X, Hickson GR, Srivastava S, Baldwin SA, Prekeris R, Gould GW.** (2005) Rab11-FIP3 and FIP4 interact with Arf6 and the exocyst to control membrane traffic in cytokinesis. *EMBO J.* 24(19):3389-99.
- Fitzgerald ML, Reed GL.** (1999) Rab6 is phosphorylated in thrombin-activated platelets by a protein kinase C-dependent mechanism: effects on GTP/GDP binding and cellular distribution. *Biochem. J.* 342 (Pt 2):353-60.
- Foster LJ, Li D, Randhawa VK, Klip A.** (2001) Insulin accelerates inter-endosomal GLUT4 traffic via phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B. *J. Biol. Chem.* 276(47):44212-21.
- Fruman DA.** (2004) Phosphoinositide 3-kinase and its targets in B-cell and T-cell signaling. *Curr. Opin. Immunol.* 16(3):314-20.
- Fruman DA, Cantley LC, Carpenter CL.** (1996) Structural organization and alternative splicing of the murine phosphoinositide 3-kinase p85 alpha gene. *Genomics.* 37(1):113-21.
- Fukuda M.** (2003) Distinct Rab binding specificity of Rim1, Rim2, rabphilin, and Noc2. Identification of a critical determinant of Rab3A/Rab27A recognition by Rim2. *J. Biol. Chem.* 278(17):15373-80.

Fukuda M, Itoh T. (2004) Slac2-a/melanophilin contains multiple PEST-like sequences that are highly sensitive to proteolysis. *J. Biol. Chem.* 279(21):22314-21.

Fukumoto H, Kayano T, Buse JB, Edwards Y, Pilch PF, Bell GI, Seino S. (1989) Cloning and characterization of the major insulin-responsive glucose transporter expressed in human skeletal muscle and other insulin-responsive tissues. *J. Biol. Chem.* 264(14):7776-9.

Fukumoto H, Seino S, Imura H, Seino Y, Bell GI. (1988) Characterization and expression of human HepG2/erythrocyte glucose-transporter gene. *Diabetes.* 37(5):657-61.

Furtado LM, Somwar R, Sweeney G, Niu W, Klip A. (2002) Activation of the glucose transporter GLUT4 by insulin. *Biochem. Cell. Biol.* 80(5):569-78.

Garcia EP, McPherson PS, Chilcote TJ, Takei K, De Camilli P. (1995) rbSec1A and B colocalize with syntaxin 1 and SNAP-25 throughout the axon, but are not in a stable complex with syntaxin. *J. Cell. Biol.* 129(1):105-20.

Garippa RJ, Johnson A, Park J, Petrush RL, McGraw TE. (1996) The carboxyl terminus of GLUT4 contains a serine-leucine-leucine sequence that functions as a potent internalization motif in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 271(34):20660-8.

Garippa RJ, Judge TW, James DE, McGraw TE. (1994) The amino terminus of GLUT4 functions as an internalization motif but not an intracellular retention signal when substituted for the transferrin receptor cytoplasmic domain. *J. Cell. Biol.* 124(5):705-15.

Giorgetti S, Pelicci PG, Pelicci G, Van Obberghen E. (1994) Involvement of Src-homology/collagen (SHC) proteins in signaling through the insulin receptor and the insulin-like-growth-factor-I-receptor. *Eur. J. Biochem.* 223(1):195-202.

Glatz JF, Luiken JJ, Bonen A. (2001) Involvement of membrane-associated proteins in the acute regulation of cellular fatty acid uptake. *J. Mol. Neurosci.* 16(2-3):123-32;

Goldenring JR, Smith J, Vaughan HD, Cameron P, Hawkins W, Navarre J. (1996) Rab11 is an apically located small GTP-binding protein in epithelial tissues. *Am. J. Physiol.* 270(3 Pt 1):G515-25.

Goodyear LJ, Hirshman MF, Smith RJ, Horton ES. (1991) Glucose transporter number, activity, and isoform content in plasma membranes of red and white skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 261(5 Pt 1):E556-61.

Govers R, Coster AC, James DE. (2004) Insulin increases cell surface GLUT4 levels by dose dependently discharging GLUT4 into a cell surface recycling pathway. *Mol. Cell. Biol.* 24(14):6456-66.

Govindan B, Bowser R, Novick P. (1995) The role of Myo2, a yeast class V myosin, in vesicular transport. *J. Cell. Biol.* 128(6):1055-68.

Grimaldi PA, Knobel SM, Whitesell RR, Abumrad NA. (1992) Induction of aP2 gene expression by nonmetabolized long-chain fatty acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 89(22):10930-4.

Grosshans BL, Ortiz D, Novick P. (2006) Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 103(32):11821-7.

Guilherme A, Emoto M, Buxton JM, Bose S, Sabini R, Theurkauf WE, Leszyk J, Czech MP. (2000) Perinuclear localization and insulin responsiveness of GLUT4 requires cytoskeletal integrity in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 2000 Dec 8;275(49):38151-9.

Guilherme A, Soriano NA, Furcinitti PS, Czech MP. (2004) Role of EHD1 and EHBP1 in perinuclear sorting and insulin-regulated GLUT4 recycling in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 279(38):40062-75.

Gupte A, Mora S. (2006) Activation of the Cbl insulin signaling pathway in cardiac muscle; dysregulation in obesity and diabetes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 342(3):751-7.

Hales CM, Griner R, Hobdy-Henderson KC, Dorn MC, Hardy D, Kumar R, Navarre J, Chan EK, Lapierre LA, Goldenring JR. (2001) Identification and characterization of a family of Rab11-interacting proteins. *J. Biol. Chem.* 276(42):39067-75.

Hales CM, Vaerman JP, Goldenring JR. (2002) Rab11 family interacting protein 2 associates with Myosin Vb and regulates plasma membrane recycling. *J. Biol. Chem.* 277(52):50415-21.

Haller H. (1977) Epidemiology and associated risk factors of hyperlipoproteinemia. *Z. Gesamte Inn. Med.* 32(8):124-8.

Hattula K, Peranen J. (2000) FIP-2, a coiled-coil protein, links Huntingtin to Rab8 and modulates cellular morphogenesis. *Curr. Biol.* 10(24):1603-6.

Hediger MA, Turk E, Wright EM. (1989) Homology of the human intestinal Na⁺/glucose and Escherichia coli Na⁺/proline cotransporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 86(15):5748-52.

Heller-Harrison RA, Morin M, Guilherme A, Czech MP. (1996) Insulin-mediated targeting of phosphatidylinositol 3-kinase to GLUT4-containing vesicles. *J. Biol. Chem.* 271(17):10200-4.

Herrera R, Lebwohl D, Garcia de Herreros A, Kallen RG, Rosen OM. (1988) Synthesis, purification, and characterization of the cytoplasmic domain of the human insulin receptor using a baculovirus expression system. *J. Biol. Chem.* 263(12):5560-8.

Hickson GR, Matheson J, Riggs B, Maier VH, Fielding AB, Prekeris R, Sullivan W, Barr FA, Gould GW. (2003) Arfophilins are dual Arf/Rab 11 binding proteins that regulate recycling endosome distribution and are related to Drosophila nuclear fallout. *Mol. Biol. Cell.* 14(7):2908-20.

Hirsch D, Stahl A, Lodish HF. (1998) A family of fatty acid transporters conserved from mycobacterium to man. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 95(15):8625-9.

Hodgkinson CP, Mander A, Sale GJ. (2005) Protein kinase-zeta interacts with munc18c: role in GLUT4 trafficking. *Diabetologia.* 48(8):1627-36.

Hoffbauer G. (2005) Das grosse Diabetes Lexikon

Holgado-Madruga M, Emlet DR, Moscatello DK, Godwin AK, Wong AJ. (1996) A Grb2-associated docking protein in EGF- and insulin-receptor signalling. *Nature*. 379(6565):560-4.

Holman GD, Cushman SW. (1994) Subcellular localization and trafficking of the GLUT4 glucose transporter isoform in insulin-responsive cells. *Bioessays*. 16(10):753-9.

Hosaka T, Brooks CC, Presman E, Kim SK, Zhang Z, Breen M, Gross DN, Sztul E, Pilch PF. (2005) p115 Interacts with the GLUT4 vesicle protein, IRAP, and plays a critical role in insulin-stimulated GLUT4 translocation. *Mol. Biol. Cell*. 16(6):2882-90.

Hu J, Liu J, Ghirlando R, Saltiel AR, Hubbard SR. (2003) Structural basis for recruitment of the adaptor protein APS to the activated insulin receptor. *Mol. Cell*. 12(6):1379-89.

Huang J, Imamura T, Olefsky JM. (2001) Insulin can regulate GLUT4 internalization by signaling to Rab5 and the motor protein dynein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 98(23):13084-9.

Hudson AW, Ruiz M, Birnbaum MJ. (1992) Isoform-specific subcellular targeting of glucose transporters in mouse fibroblasts. *J. Cell. Biol.* 116(3):785-97.

Hudson AW, Fingar DC, Seidner GA, Griffiths G, Burke B, Birnbaum MJ. (1993) Targeting of the "insulin-responsive" glucose transporter (GLUT4) to the regulated secretory pathway in PC12 cells. *J. Cell. Biol.* 122(3):579-88.

Hundal HS, Ahmed A, Guma A, Mitsumoto Y, Marette A, Rennie MJ, Klip A. (1992) Biochemical and immunocytochemical localization of the 'GLUT5 glucose transporter' in human skeletal muscle. *Biochem. J.* 286 (Pt 2):339-43.

Ibberson M, Uldry M, Thorens B. (2000) GLUTX1, a novel mammalian glucose transporter expressed in the central nervous system and insulin-sensitive tissues. *J. Biol. Chem.* 275(7):4607-12.

Ibrahimi A, Abumrad NA. (2002) Role of CD36 in membrane transport of long-chain fatty acids. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*. 5(2):139-45.

International Diabetes Federation (IDF). (2003) Diabetes Atlas - Executive Summary. Second edition.

Imamura T, Huang J, Usui I, Satoh H, Bever J, Olefsky JM. (2003) Insulin-induced GLUT4 translocation involves protein kinase C-lambda-mediated functional coupling between Rab4 and the motor protein kinesin. *Mol. Cell. Biol.* 23(14):4892-900.

Inoue M, Chang L, Hwang J, Chiang SH, Saltiel AR. (2003) The exocyst complex is required for targeting of Glut4 to the plasma membrane by insulin. *Nature*. 422(6932):629-33.

Isakoff SJ, Taha C, Rose E, Marcusohn J, Klip A, Skolnik EY. (1995) The inability of phosphatidylinositol 3-kinase activation to stimulate GLUT4 translocation indicates additional signaling pathways are required for insulin-stimulated glucose uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 92(22):10247-51.

- Ishikura S, Bilan PJ, Klip A.** (2007) Rabs 8A and 14 are targets of the insulin-regulated Rab-GAP AS160 regulating GLUT4 traffic in muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 353(4):1074-9.
- James DE, Strube M, Mueckler M.** (1989) Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transporter. *Nature.* 338(6210):83-7.
- Jeng RL, Welch MD.** (2001) Cytoskeleton: actin and endocytosis--no longer the weakest link. *Curr. Biol.* 11(17):R691-4.
- Jhun BH, Rampal AL, Liu H, Lachaal M, Jung CY.** (1992) Effects of insulin on steady state kinetics of GLUT4 subcellular distribution in rat adipocytes. Evidence of constitutive GLUT4 recycling. *J. Biol. Chem.* 267(25):17710-5.
- Jiang T, Sweeney G, Rudolf MT, Klip A, Traynor-Kaplan A, Tsien RY.** (1998) Membrane-permeant esters of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.* 273(18):11017-24.
- Jiang ZY, Zhou QL, Coleman KA, Chouinard M, Boese Q, Czech MP.** (2003) Insulin signaling through Akt/protein kinase B analyzed by small interfering RNA-mediated gene silencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 100(13):7569-74.
- Johnson JL, Pacquelet S, Lane WS, Eam B, Catz SD.** (2005) Akt regulates the subcellular localization of the Rab27a-binding protein JFC1 by phosphorylation. *Traffic.* 6(8):667-81.
- Joost HG, Thorens B.** (2001) The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members. *Mol. Membr. Biol.* 18(4):247-56.
- Jordens I, Marsman M, Kuijl C, Neefjes J.** (2005) Rab proteins, connecting transport and vesicle fusion. *Traffic.* 6(12):1070-7.
- Junutula JR, Schonteich E, Wilson GM, Peden AA, Scheller RH, Prekeris R.** (2004) Molecular characterization of Rab11 interactions with members of the family of Rab11-interacting proteins. *J. Biol. Chem.* 279(32):33430-7.
- Kanda H, Tamori Y, Shinoda H, Yoshikawa M, Sakaue M, Udagawa J, Otani H, Tashiro F, Miyazaki J, Kasuga M.** (2005) Adipocytes from Munc18c-null mice show increased sensitivity to insulin-stimulated GLUT4 externalization. *J. Clin. Invest.* 115(2):291-301.
- Kandror KV, Pilch PF.** (1996) The insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor utilizes the same membrane compartments as GLUT4 for insulin-dependent trafficking to and from the rat adipocyte cell surface. *J. Biol. Chem.* 271(36):21703-8.
- Kandror KV, Pilch PF.** (1998) Multiple endosomal recycling pathways in rat adipose cells. *Biochem. J.* 331 (Pt 3):829-35.
- Kandror KV, Yu L, Pilch PF.** (1994) The major protein of GLUT4-containing vesicles, gp160, has aminopeptidase activity. *J. Biol. Chem.* 269(49):30777-80.

Kane S, Sano H, Liu SC, Asara JM, Lane WS, Garner CC, Lienhard GE. (2002) A method to identify serine kinase substrates. Akt phosphorylates a novel adipocyte protein with a Rab GTPase-activating protein (GAP) domain. *J. Biol. Chem.* 277(25):22115-8.

Kanzaki M, Mora S, Hwang JB, Saltiel AR, Pessin JE. (2004) Atypical protein kinase C (PKCzeta/lambda) is a convergent downstream target of the insulin-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase and TC10 signaling pathways. *J. Cell. Biol.* 164(2):279-90.

Kanzaki M, Pessin JE. (2001) Insulin-stimulated GLUT4 translocation in adipocytes is dependent upon cortical actin remodeling. *J. Biol. Chem.* 276(45):42436-44.

Kanzaki M, Pessin JE. (2002) Caveolin-associated filamentous actin (Cav-actin) defines a novel F-actin structure in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 277(29):25867-9.

Karlsson HK, Zierath JR, Kane S, Krook A, Lienhard GE, Wallberg-Henriksson H. (2005) Insulin-stimulated phosphorylation of the Akt substrate AS160 is impaired in skeletal muscle of type 2 diabetic subjects. *Diabetes.* 54(6):1692-7.

Kartberg F, Elsner M, Froderberg L, Asp L, Nilsson T. (2005) Commuting between Golgi cisternae--mind the GAP! *Biochim. Biophys. Acta.* 1744(3):351-63.

Kasai K, Ohara-Imaizumi M, Takahashi N, Mizutani S, Zhao S, Kikuta T, Kasai H, Nagamatsu S, Gomi H, Izumi T. (2005) Rab27a mediates the tight docking of insulin granules onto the plasma membrane during glucose stimulation. *J. Clin. Invest.* 115(2):388-96.

Kasuga M, Hedo JA, Yamada KM, Kahn CR. (1982) The structure of insulin receptor and its subunits. Evidence for multiple nonreduced forms and a 210,000 possible proreceptor. *J. Biol. Chem.* 257(17):10392-9.

Katz EB, Stenbit AE, Hatton K, DePinho R, Charron MJ. (1995) Cardiac and adipose tissue abnormalities but not diabetes in mice deficient in GLUT4. *Nature.* 377(6545):151-5.

Kauppi M, Simonsen A, Bremnes B, Vieira A, Callaghan J, Stenmark H, Olkkonen VM. (2002) The small GTPase Rab22 interacts with EEA1 and controls endosomal membrane trafficking. *J. Cell. Sci.* 115(Pt 5):899-911.

Keller SR. (2003) The insulin-regulated aminopeptidase: a companion and regulator of GLUT4. *Front. Biosci.* 8:s410-20.

Keller SR, Davis AC, Clairmont KB. (2002) Mice deficient in the insulin-regulated membrane aminopeptidase show substantial decreases in glucose transporter GLUT4 levels but maintain normal glucose homeostasis. *J. Biol. Chem.* 277(20):17677-86.

Kessler A, Tomas E, Immler D, Meyer HE, Zorzano A, Eckel J. (2000) Rab11 is associated with GLUT4-containing vesicles and redistributes in response to insulin. *Diabetologia.* 43(12):1518-27.

Kessler A, Uphues I, Ouwens DM, Till M, Eckel J. (2001) Diversification of cardiac insulin signaling involves the p85 alpha/beta subunits of phosphatidylinositol 3-kinase. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 280(1):E65-74.

- Kikuchi A, Kuroda S, Sasaki T, Kotani K, Hirata K, Katayama M, Takai Y.** (1992) Functional interactions of stimulatory and inhibitory GDP/GTP exchange proteins and their common substrate small GTP-binding protein. *J. Biol. Chem.* 267(21):14611-5.
- Kimura A, Baumann CA, Chiang SH, Saltiel AR.** (2001) The sorbin homology domain: a motif for the targeting of proteins to lipid rafts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 98(16):9098-103.
- Kimura A, Mora S, Shigematsu S, Pessin JE, Saltiel AR.** (2002) The insulin receptor catalyzes the tyrosine phosphorylation of caveolin-1. *J. Biol. Chem.* 277(33):30153-8.
- Knight JB, Cao KT, Gibson GV, Olson AL.** (2000) Expression of a prenylation-deficient Rab4 interferes with propagation of insulin signaling through insulin receptor substrate-1. *Endocrinology.* 141(1):208-18.
- Knudsen BS, Feller SM, Hanafusa H.** (1994) Four proline-rich sequences of the guanine-nucleotide exchange factor C3G bind with unique specificity to the first Src homology 3 domain of Crk. *J. Biol. Chem.* 269(52):32781-7.
- Kohn AD, Barthel A, Kovacina KS, Boge A, Wallach B, Summers SA, Birnbaum MJ, Scott PH, Lawrence JC Jr, Roth RA.** (1998) Construction and characterization of a conditionally active version of the serine/threonine kinase Akt. *J. Biol. Chem.* 273(19):11937-43.
- Kohn AD, Summers SA, Birnbaum MJ, Roth RA.** (1996) 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(49):31372-8.
- Kosaka T, Ikeda K.** (1983) Reversible blockage of membrane retrieval and endocytosis in the garland cell of the temperature-sensitive mutant of *Drosophila melanogaster*, shibirets1. *J. Cell. Biol.* 97(2):499-507.
- 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.** (2000) Disruption of insulin receptor substrate 2 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory beta-cell hyperplasia. *Diabetes.* 49(11):1880-9.
- Kupriyanova TA, Kandror V, Kandror KV.** (2002) Isolation and characterization of the two major intracellular Glut4 storage compartments. *J. Biol. Chem.* 277(11):9133-8.
- Lapierre LA, Dorn MC, Zimmerman CF, Navarre J, Burnette JO, Goldenring JR.** (2003) Rab11b resides in a vesicular compartment distinct from Rab11a in parietal cells and other epithelial cells. *Exp. Cell. Res.* 290(2):322-31.
- Lapierre LA, Kumar R, Hales CM, Navarre J, Bhartur SG, Burnette JO, Provance DW Jr, Mercer JA, Bahler M, Goldenring JR.** (2001) Myosin vb is associated with plasma membrane recycling systems. *Mol. Biol. Cell.* 12(6):1843-57.

- Lebrand C, Corti M, Goodson H, Cosson P, Cavalli V, Mayran N, Faure J, Gruenberg J.** (2002) Late endosome motility depends on lipids via the small GTPase Rab7. *EMBO J.* 21(6):1289-300.
- Li L, Omata W, Kojima I, Shibata H.** (2001) Direct interaction of Rab4 with syntaxin 4. *J. Biol. Chem.* 276(7):5265-73.
- Li SH, McNeill JH.** (2001) In vivo effects of vanadium on GLUT4 translocation in cardiac tissue of STZ-diabetic rats. *Mol. Cell. Biochem.* 217(1-2):121-9.
- Lietzke SE, Bose S, Cronin T, Klarlund J, Chawla A, Czech MP, Lambright DG.** (2000) Structural basis of 3-phosphoinositide recognition by pleckstrin homology domains. *Mol. Cell.* 6(2):385-94.
- Lindsay AJ, Hendrick AG, Cantalupo G, Senic-Matuglia F, Goud B, Bucci C, McCaffrey MW.** (2002) Rab coupling protein (RCP), a novel Rab4 and Rab11 effector protein. *J. Biol. Chem.* 277(14):12190-9.
- Lindsay AJ, McCaffrey MW.** (2002) Rab11-FIP2 functions in transferrin recycling and associates with endosomal membranes via its COOH-terminal domain. *J. Biol. Chem.* 277(30):27193-9.
- Lindsay AJ, McCaffrey MW.** (2004a) The C2 domains of the class I Rab11 family of interacting proteins target recycling vesicles to the plasma membrane. *J. Cell. Sci.* 117(Pt 19):4365-75.
- Lindsay AJ, McCaffrey MW.** (2004b) Characterisation of the Rab binding properties of Rab coupling protein (RCP) by site-directed mutagenesis. *FEBS Lett.* 571(1-3):86-92.
- Lisinski I, Schurmann A, Joost HG, Cushman SW, Al-Hasani H.** (2001) Targeting of GLUT6 (formerly GLUT9) and GLUT8 in rat adipose cells. *Biochem. J.* 358(Pt 2):517-22.
- Liu J, Kimura A, Baumann CA, Saltiel AR.** (2002) APS facilitates c-Cbl tyrosine phosphorylation and GLUT4 translocation in response to insulin in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Cell. Biol.* 22(11):3599-609.
- Liu J, DeYoung SM, Hwang JB, O'Leary EE, Saltiel AR.** (2003) The roles of Cbl-b and c-Cbl in insulin-stimulated glucose transport. *J. Biol. Chem.* 278(38):36754-62.
- Liu J, Deyoung SM, Zhang M, Dold LH, Saltiel AR.** (2005) The stomatin/prohibitin/flotillin/HflK/C domain of flotillin-1 contains distinct sequences that direct plasma membrane localization and protein interactions in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 280(16):16125-34.
- Lizunov VA, Matsumoto H, Zimmerberg J, Cushman SW, Frolov VA.** (2005) Insulin stimulates the halting, tethering, and fusion of mobile GLUT4 vesicles in rat adipose cells. *J. Cell. Biol.* 169(3):481-9.
- Lombardi D, Soldati T, Riederer MA, Goda Y, Zerial M, Pfeffer SR.** (1993) Rab9 functions in transport between late endosomes and the trans Golgi network. *EMBO J.* 12(2):677-82.

Londos C, Brasaemle DL, Schultz CJ, Adler-Wailes DC, Levin DM, Kimmel AR, Rondinone CM. (1999) On the control of lipolysis in adipocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 892:155-68.

Luiken JJ, Schaap FG, van Nieuwenhoven FA, van der Vusse GJ, Bonen A, Glatz JF. (1999) Cellular fatty acid transport in heart and skeletal muscle as facilitated by proteins. *Lipids.* 34 Suppl:S169-75.

Luiken JJ, Arumugam Y, Dyck DJ, Bell RC, Pelsers MM, Turcotte LP, Tandon NN, Glatz JF, Bonen A. (2001) Increased rates of fatty acid uptake and plasmalemmal fatty acid transporters in obese Zucker rats. *J. Biol. Chem.* 276(44):40567-73.

Luiken JJ, Bonen A, Glatz JF. (2002) Cellular fatty acid uptake is acutely regulated by membrane-associated fatty acid-binding proteins. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 67(2-3):73-8.

Luiken JJ, Coort SL, Willems J, Coumans WA, Bonen A, van der Vusse GJ, Glatz JF. (2003) Contraction-induced fatty acid translocase/CD36 translocation in rat cardiac myocytes is mediated through AMP-activated protein kinase signaling. *Diabetes.* 52(7):1627-34.

Mackay DJ, Hall A. (1998) Rho GTPases. *J. Biol. Chem.* 273(33):20685-8.

Malide D, Ramm G, Cushman SW, Slot JW. (2000) Immunoelectron microscopic evidence that GLUT4 translocation explains the stimulation of glucose transport in isolated rat white adipose cells. *J. Cell. Sci.* 113 Pt 23:4203-10.

Mallard F, Tang BL, Galli T, Tenza D, Saint-Pol A, Yue X, Antony C, Hong W, Goud B, Johannes L. (2002) Early/recycling endosomes-to-TGN transport involves two SNARE complexes and a Rab6 isoform. *J. Cell. Biol.* 156(4):653-64.

Mammoto A, Ohtsuka T, Hotta I, Sasaki T, Takai Y. (1999) Rab11BP/Rabphilin-11, a downstream target of rab11 small G protein implicated in vesicle recycling. *J. Biol. Chem.* 274(36):25517-24.

Marette A, Richardson JM, Ramlal T, Balon TW, Vranic M, Pessin JE, Klip A. (1992) Abundance, localization, and insulin-induced translocation of glucose transporters in red and white muscle. *Am. J. Physiol.* 263(2 Pt 1):C443-52.

Marie N, Lindsay AJ, McCaffrey MW. (2005) Rab coupling protein is selectively degraded by calpain in a Ca²⁺-dependent manner. *Biochem. J.* 389(Pt 1):223-31.

Martin SS, Haruta T, Morris AJ, Klippel A, Williams LT, Olefsky JM. (1996) Activated phosphatidylinositol 3-kinase is sufficient to mediate actin rearrangement and GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 271(30):17605-8.

Mastick CC, Aebersold R, Lienhard GE. (1994) Characterization of a major protein in GLUT4 vesicles. Concentration in the vesicles and insulin-stimulated translocation to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 269(8):6089-92.

Matschinsky FM. (1990) Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic beta-cells and hepatocytes. *Diabetes.* 39(6):647-52.

- McClain DA, Maegawa H, Lee J, Dull TJ, Ulrich A, Olefsky JM.** (1987) A mutant insulin receptor with defective tyrosine kinase displays no biologic activity and does not undergo endocytosis. *J. Biol. Chem.* 262(30):14663-71.
- McLauchlan H, Newell J, Morrice N, Osborne A, West M, Smythe E.** (1998) A novel role for Rab5-GDI in ligand sequestration into clathrin-coated pits. *Curr. Biol.* 8(1):34-45.
- McNiven MA.** (1998) Dynamin: a molecular motor with pinchase action. *Cell.* 94(2):151-4.
- McNiven MA, Kim L, Krueger EW, Orth JD, Cao H, Wong TW.** (2000) Regulated interactions between dynamin and the actin-binding protein cortactin modulate cell shape. *J. Cell. Biol.* 151(1):187-98.
- McVie-Wylie AJ, Lamson DR, Chen YT.** (2001) Molecular cloning of a novel member of the GLUT family of transporters, SLC2a10 (GLUT10), localized on chromosome 20q13.1: a candidate gene for NIDDM susceptibility. *Genomics.* 72(1):113-7.
- Melvin DR, Marsh BJ, Walmsley AR, James DE, Gould GW.** (1999) Analysis of amino and carboxy terminal GLUT-4 targeting motifs in 3T3-L1 adipocytes using an endosomal ablation technique. *Biochemistry.* 38(5):1456-62.
- Miinea CP, Sano H, Kane S, Sano E, Fukuda M, Peranen J, Lane WS, Lienhard GE.** (2005) AS160, the Akt substrate regulating GLUT4 translocation, has a functional Rab GTPase-activating protein domain. *Biochem. J.* 391(Pt 1):87-93.
- Millar CA, Meerloo T, Martin S, Hickson GR, Shimwell NJ, Wakelam MJ, James DE, Gould GW.** (2000) Adipsin and the glucose transporter GLUT4 traffic to the cell surface via independent pathways in adipocytes. *Traffic.* 1(2):141-51.
- Min J, Okada S, Kanzaki M, Elmendorf JS, Coker KJ, Ceresa BP, Syu LJ, Noda Y, Saltiel AR, Pessin JE.** (1999) Synip: a novel insulin-regulated syntaxin 4-binding protein mediating GLUT4 translocation in adipocytes. *Mol. Cell.* 3(6):751-60.
- Mitra P, Zheng X, Czech MP.** (2004) RNAi-based analysis of CAP, Cbl, and CrkII function in the regulation of GLUT4 by insulin. *J. Biol. Chem.* 279(36):37431-5.
- Modan M, Halkin H, Almog S, Lusky A, Eshkol A, Shefi M, Shitrit A, Fuchs Z.** (1985) Hyperinsulinemia. A link between hypertension obesity and glucose intolerance. *J. Clin. Invest.* 75(3):809-17.
- Molero JC, Whitehead JP, Meerloo T, James DE.** (2001) Nocodazole inhibits insulin-stimulated glucose transport in 3T3-L1 adipocytes via a microtubule-independent mechanism. *J. Biol. Chem.* 276(47):43829-35.
- Moller DE, Yokota A, White MF, Pazianos AG, Flier JS.** (1990) A naturally occurring mutation of insulin receptor alanine 1134 impairs tyrosine kinase function and is associated with dominantly inherited insulin resistance. *J. Biol. Chem.* 265(25):14979-85.
- Mora A, Komander D, van Aalten DM, Alessi DR.** (2004) PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 15(2):161-70.

- Mueckler M.** (1994) Facilitative glucose transporters. *Eur. J. Biochem.* 219(3):713-25.
- Mueckler M, Caruso C, Baldwin SA, Panico M, Blench I, Morris HR, Allard WJ, Lienhard GE, Lodish HF.** (1985) Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science.* 229(4717):941-5.
- Mueckler M, Hresko RC, Sato M.** (1997) Structure, function and biosynthesis of GLUT1. *Biochem. Soc. Trans.* 25(3):951-4.
- Muhlberg AB, Warnock DE, Schmid SL.** (1997) Domain structure and intramolecular regulation of dynamin GTPase. *EMBO J.* 16(22):6676-83.
- Müller H, Deckers K, Eckel J.** (2002) The fatty acid translocase (FAT)/CD36 and the glucose transporter GLUT4 are localized in different cellular compartments in rat cardiac muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293(2):665-9.
- Myers MG Jr, Backer JM, Sun XJ, Shoelson S, Hu P, Schlessinger J, Yoakim M, Schaffhausen B, White MF.** (1992) IRS-1 activates phosphatidylinositol 3'-kinase by associating with src homology 2 domains of p85. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 89(21):10350-4.
- Meyers JM, Prekeris R.** (2002) Formation of mutually exclusive Rab11 complexes with members of the family of Rab11-interacting proteins regulates Rab11 endocytic targeting and function. *J. Biol. Chem.* 277(50):49003-10.
- Nagelkerken B, Van Anken E, Van Raak M, Gerez L, Mohrmann K, Van Uden N, Holthuizen J, Pelkmans L, Van Der Sluijs P.** (2000) Rabaptin4, a novel effector of the small GTPase rab4a, is recruited to perinuclear recycling vesicles. *Biochem. J.* 346 Pt 3:593-601.
- Naslavsky N, Rahajeng J, Sharma M, Jovic M, Caplan S.** (2006) Interactions between EHD proteins and Rab11-FIP2: a role for EHD3 in early endosomal transport. *Mol. Biol. Cell.* 17(1):163-77.
- Nevins AK, Thurmond DC.** (2005) A direct interaction between Cdc42 and vesicle-associated membrane protein 2 regulates SNARE-dependent insulin exocytosis. *J. Biol. Chem.* 280(3):1944-52.
- Nicholls LI, Ainscow EK, Rutter GA.** (2002) Glucose-stimulated insulin secretion does not require activation of pyruvate dehydrogenase: impact of adenovirus-mediated overexpression of PDH kinase and PDH phosphate phosphatase in pancreatic islets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291(4):1081-8.
- Nielsen E, Severin F, Backer JM, Hyman AA, Zerial M.** (1999) Rab5 regulates motility of early endosomes on microtubules. *Nat. Cell. Biol.* 1(6):376-82.
- Nishimura H, Zarnowski MJ, Simpson IA.** (1993) Glucose transporter recycling in rat adipose cells. Effects of potassium depletion. *J. Biol. Chem.* ;268(26):19246-53.
- O'Brien RM, Granner DK.** (1991) Regulation of gene expression by insulin. *Biochem. J.* 278 (Pt 3):609-19.

- Odawara M, Kadowaki T, Yamamoto R, Shibasaki Y, Tobe K, Accili D, Bevins C, Mikami Y, Matsuura N, Akanuma Y, et al.** (1989) Human diabetes associated with a mutation in the tyrosine kinase domain of the insulin receptor. *Science*. 245(4913):66-8.
- Ogg S, Ruvkun G.** (1998) The *C. elegans* PTEN homolog, DAF-18, acts in the insulin receptor-like metabolic signaling pathway. *Mol. Cell*. 2(6):887-93.
- Okada T, Kawano Y, Sakakibara T, Hazeki O, Ui M.** (1994) Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin-induced glucose transport and antilipolysis in rat adipocytes. Studies with a selective inhibitor wortmannin. *J. Biol. Chem.* 269(5):3568-73.
- Olefsky J, Reaven GM, Farquhar JW.** (1974) Effects of weight reduction on obesity. Studies of lipid and carbohydrate metabolism in normal and hyperlipoproteinemic subjects. *J. Clin. Invest.* 53(1):64-76.
- Olefsky JM.** (1999) Insulin-stimulated glucose transport minireview series. *J. Biol. Chem.* 274(4):1863.
- Olson AL, Pessin JE.** (1996) Structure, function, and regulation of the mammalian facilitative glucose transporter gene family. *Annu. Rev. Nutr.* 16:235-56.
- Omata W, Shibata H, Li L, Takata K, Kojima I.** (2000) Actin filaments play a critical role in insulin-induced exocytotic recruitment but not in endocytosis of GLUT4 in isolated rat adipocytes. *Biochem. J.* 346 Pt 2:321-8.
- Ostermeier C, Brunger AT.** (1999) Structural basis of Rab effector specificity: crystal structure of the small G protein Rab3A complexed with the effector domain of rabphilin-3A. *Cell*. 96(3):363-74.
- Palacios S, Lalioti V, Martinez-Arca S, Chattopadhyay S, Sandoval IV.** (2001) Recycling of the insulin-sensitive glucose transporter GLUT4. Access of surface internalized GLUT4 molecules to the perinuclear storage compartment is mediated by the Phe5-Gln6-Gln7-Ile8 motif. *J. Biol. Chem.* 276(5):3371-83.
- Palade G.** (1975) Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science*. 189(4200):347-58.
- Park SY, Ha BG, Choi GH, Ryu J, Kim B, Jung CY, Lee W.** (2004) EHD2 interacts with the insulin-responsive glucose transporter (GLUT4) in rat adipocytes and may participate in insulin-induced GLUT4 recruitment. *Biochemistry*. 43(23):7552-62.
- Parpal S, Karlsson M, Thorn H, Stralfors P.** (2001) Cholesterol depletion disrupts caveolae and insulin receptor signaling for metabolic control via insulin receptor substrate-1, but not for mitogen-activated protein kinase control. *J. Biol. Chem.* 276(13):9670-8.
- Patki V, Buxton J, Chawla A, Lifshitz L, Fogarty K, Carrington W, Tuft R, Corvera S.** (2001) Insulin action on GLUT4 traffic visualized in single 3T3-L1 adipocytes by using ultra-fast microscopy. *Mol. Biol. Cell*. 12(1):129-41.
- Peden AA, Schonteich E, Chun J, Junutula JR, Scheller RH, Prekeris R.** (2004) The RCP-Rab11 complex regulates endocytic protein sorting. *Mol. Biol. Cell*. 15(8):3530-41.

- Pegorier JP, Le May C, Girard J.** (2004) Control of gene expression by fatty acids. *J. Nutr.* 134(9):2444S-2449S.
- Pei Z, Fraisl P, Berger J, Jia Z, Forss-Petter S, Watkins PA.** (2004) Mouse very long-chain Acyl-CoA synthetase 3/fatty acid transport protein 3 catalyzes fatty acid activation but not fatty acid transport in MA-10 cells. *J. Biol. Chem.* 279(52):54454-62.
- Peränen J, Auvinen P, Virta H, Wepf R, Simons K.** (1996) Rab8 promotes polarized membrane transport through reorganization of actin and microtubules in fibroblasts. *J. Cell. Biol.* 135(1):153-67.
- Pereira-Leal JB, Seabra MC.** (2001) Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. *J. Mol. Biol.* 313(4):889-901.
- Pessin JE, Thurmond DC, Elmendorf JS, Coker KJ, Okada S.** (1999) Molecular basis of insulin-stimulated GLUT4 vesicle trafficking. Location! Location! Location! *J. Biol. Chem.* 274(5):2593-6.
- Pessin JE, Saltiel AR.** (2000) Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 106(2):165-9.
- Peterson RT, Schreiber SL.** (1999) Kinase phosphorylation: Keeping it all in the family. *Curr. Biol.* 9(14):R521-4.
- Pfeffer SR.** (2001) Rab GTPases: specifying and deciphering organelle identity and function. *Trends Cell. Biol.* 11(12):487-91.
- Pfeiffer A, Bottcher A, Orso E, Kapinsky M, Nagy P, Bodnar A, Spreitzer I, Liebisch G, Drobnik W, Gempel K, Horn M, Holmer S, Hartung T, Multhoff G, Schutz G, Schindler H, Ulmer AJ, Heine H, Stelter F, Schutt C, Rothe G, Szollosi J, Damjanovich S, Schmitz G.** (2001) Lipopolysaccharide and ceramide docking to CD14 provokes ligand-specific receptor clustering in rafts. *Eur. J. Immunol.* 31(11):3153-64.
- Piper RC, Tai C, Kulesza P, Pang S, Warnock D, Baenziger J, Slot JW, Geuze HJ, Puri C, James DE.** (1993) GLUT-4 NH2 terminus contains a phenylalanine-based targeting motif that regulates intracellular sequestration. *J. Cell. Biol.* 121(6):1221-32.
- Ploug T, van Deurs B, Ai H, Cushman SW, Ralston E.** (1998) Analysis of GLUT4 distribution in whole skeletal muscle fibers: identification of distinct storage compartments that are recruited by insulin and muscle contractions. *J. Cell. Biol.* 142(6):1429-46.
- Ploug T, Ralston E.** (2002) Exploring the whereabouts of GLUT4 in skeletal muscle. *Mol. Membr. Biol.* 19(1):39-49.
- Pohl J, Ring A, Eehalt R, Schulze-Bergkamen H, Schad A, Verkade P, Stremmel W.** (2004) Long-chain fatty acid uptake into adipocytes depends on lipid raft function. *Biochemistry.* 43(14):4179-87.
- Pohl J, Ring A, Korkmaz U, Eehalt R, Stremmel W.** (2005) FAT/CD36-mediated long-chain fatty acid uptake in adipocytes requires plasma membrane rafts. *Mol. Biol. Cell.* 16(1):24-31.

- Pons S, Asano T, Glasheen E, Miralpeix M, Zhang Y, Fisher TL, Myers MG Jr, Sun XJ, White MF.** (1995) The structure and function of p55PIK reveal a new regulatory subunit for phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol. Cell. Biol.* 15(8):4453-65.
- Prekeris R, Davies JM, Scheller RH.** (2001) Identification of a novel Rab11/25 binding domain present in Eferin and Rip proteins. *J. Biol. Chem.* 276(42):38966-70.
- Prekeris R, Klumperman J, Scheller RH.** (2000) A Rab11/Rip11 protein complex regulates apical membrane trafficking via recycling endosomes. *Mol. Cell.* 6(6):1437-48.
- Press B, Feng Y, Hoflack B, Wandinger-Ness A.** (1998) Mutant Rab7 causes the accumulation of cathepsin D and cation-independent mannose 6-phosphate receptor in an early endocytic compartment. *J. Cell. Biol.* 140(5):1075-89.
- Qualmann B, Kessels MM.** (2002) Endocytosis and the cytoskeleton. *Int. Rev. Cytol.* 220:93-144.
- Randhawa VK, Bilan PJ, Khayat ZA, Daneman N, Liu Z, Ramlal T, Volchuk A, Peng XR, Coppola T, Regazzi R, Trimble WS, Klip A.** (2000) VAMP2, but not VAMP3/cellubrevin, mediates insulin-dependent incorporation of GLUT4 into the plasma membrane of L6 myoblasts. *Mol. Biol. Cell.* 11(7):2403-17.
- Rea S, Martin LB, McIntosh S, Macaulay SL, Ramsdale T, Baldini G, James DE.** (1998) Syndet, an adipocyte target SNARE involved in the insulin-induced translocation of GLUT4 to the cell surface. *J. Biol. Chem.* 273(30):18784-92.
- Reaven GM.** (1988) Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes.* 37(12):1595-607.
- Reaven GM, Lerner RL, Stern MP, Farquhar JW.** (1967) Role of insulin in endogenous hypertriglyceridemia. *J. Clin. Invest.* 46(11):1756-67.
- Reilein AR, Tint IS, Peunova NI, Enikolopov GN, Gelfand VI.** (1998) Regulation of organelle movement in melanophores by protein kinase A (PKA), protein kinase C (PKC), and protein phosphatase 2A (PP2A). *J. Cell. Biol.* 142(3):803-13.
- Ribon V, Printen JA, Hoffman NG, Kay BK, Saltiel AR.** (1998) A novel, multifunctional c-Cbl binding protein in insulin receptor signaling in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Cell. Biol.* 18(2):872-9.
- Ribon V, Saltiel AR.** (1997) Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the proto-oncogene product of c-Cbl in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. J.* 324 (Pt 3):839-45.
- Rietveld A, Simons K.** (1998) The differential miscibility of lipids as the basis for the formation of functional membrane rafts. *Biochim. Biophys. Acta.* 1376(3):467-79.
- Ringstad N, Gad H, Low P, Di Paolo G, Brodin L, Shupliakov O, De Camilli P.** (1999) Endophilin/SH3p4 is required for the transition from early to late stages in clathrin-mediated synaptic vesicle endocytosis. *Neuron.* 24(1):143-54.

- Roach WG, Chavez JA, Miinea CP, Lienhard GE.** (2007) Substrate specificity and effect on GLUT4 translocation of the Rab GTPase activating protein Tbc1d1. *Biochem. J.* [Epub ahead of print]
- Robinson LJ, Pang S, Harris DS, Heuser J, James DE.** (1992) Translocation of the glucose transporter (GLUT4) to the cell surface in permeabilized 3T3-L1 adipocytes: effects of ATP insulin, and GTP gamma S and localization of GLUT4 to clathrin lattices. *J. Cell. Biol.* 117(6):1181-96.
- Rodriguez OC, Cheney RE.** (2002) Human myosin-Vc is a novel class V myosin expressed in epithelial cells. *J. Cell. Sci.* 115(Pt 5):991-1004.
- Rogers S, Macheda ML, Docherty SE, Carty MD, Henderson MA, Soeller WC, Gibbs EM, James DE, Best JD.** (2002) Identification of a novel glucose transporter-like protein-GLUT-12. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 282(3):E733-8.
- Rogers SL, Gelfand VI.** (2000) Membrane trafficking, organelle transport, and the cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 12(1):57-62.
- Rudich A, Klip A.** (2003) Push/pull mechanisms of GLUT4 traffic in muscle cells. *Acta. Physiol. Scand.* 178(4):297-308.
- Russell RR 3rd, Bergeron R, Shulman GI, Young LH.** (1999) Translocation of myocardial GLUT-4 and increased glucose uptake through activation of AMPK by AICAR. *Am. J. Physiol.* 277(2 Pt 2):H643-9.
- Saltiel AR.** (2001) New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. *Cell.* 104(4):517-29.
- Saltiel AR, Kahn CR.** (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature.* 414(6865):799-806.
- Sano H, Kane S, Sano E, Miinea CP, Asara JM, Lane WS, Garner CW, Lienhard GE.** (2003) Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation. *J. Biol. Chem.* 278(17):14599-602.
- Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM.** (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science.* 307(5712):1098-101.
- Sasaki T, Minoshima S, Shiohama A, Shintani A, Shimizu A, Asakawa S, Kawasaki K, Shimizu N.** (2001) Molecular cloning of a member of the facilitative glucose transporter gene family GLUT11 (SLC2A11) and identification of transcription variants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289(5):1218-24.
- Satoh S, Nishimura H, Clark AE, Kozka IJ, Vannucci SJ, Simpson IA, Quon MJ, Cushman SW, Holman GD.** (1993) Use of bismannose photolabel to elucidate insulin-regulated GLUT4 subcellular trafficking kinetics in rat adipose cells. Evidence that exocytosis is a critical site of hormone action. *J. Biol. Chem.* 268(24):17820-9.

- Saxena SK, Singh M, Shibata H, Kaur S, George C.** (2006) Rab4 GTP/GDP modulates amiloride-sensitive sodium channel (ENaC) function in colonic epithelia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 340(2):726-33.
- Scapin SM, Carneiro FR, Alves AC, Medrano FJ, Guimaraes BG, Zanchin NI.** (2006) The crystal structure of the small GTPase Rab11b reveals critical differences relative to the Rab11a isoform. *J. Struct. Biol.* 154(3):260-8.
- Schafer DA.** (2002) Coupling actin dynamics and membrane dynamics during endocytosis. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 14(1):76-81.
- Scheper W, Zwart R, Baas F.** (2004) Rab6 membrane association is dependent of Presenilin 1 and cellular phosphorylation events. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 122(1):17-23.
- Schmidt A, Hall A.** (2002) Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes. Dev.* 16(13):1587-609.
- Schrimpf G.** (2002) *Gentechnische Methoden*
- Seabra MC.** (2000) Biochemistry of Rab geranylgeranyl transferase. In *Lipid Modifications of Proteins*. Edited by Tamanoi FA and Sigman DS: Academic Press. 131-154.
- Seabra MC, Wasmeier C.** (2004) Controlling the location and activation of Rab GTPases. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 16(4):451-7.
- Seino S, Seino M, Bell GI.** (1990) Human insulin-receptor gene. *Diabetes.* 39(2):129-33.
- Seino S, Miki T.** (2003) Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K⁺ channels. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 81(2):133-76.
- Semiz S, Park JG, Nicoloro SM, Furcinitti P, Zhang C, Chawla A, Leszyk J, Czech MP.** (2003) Conventional kinesin KIF5B mediates insulin-stimulated GLUT4 movements on microtubules. *EMBO J.* 22(10):2387-99.
- Sesti G, Federici M, Hribal ML, Lauro D, Sbraccia P, Lauro R.** (2001) Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders. *FASEB J.* 15(12):2099-111.
- Sharma PM, Egawa K, Huang Y, Martin JL, Huvar I, Boss GR, Olefsky JM.** (1998) Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity by adenovirus-mediated gene transfer and its effect on insulin action. *J. Biol. Chem.* 273(29):18528-37.
- Sheff D, Pelletier L, O'Connell CB, Warren G, Mellman I.** (2002) Transferrin receptor recycling in the absence of perinuclear recycling endosomes. *J. Cell. Biol.* 156(5):797-804.
- Shepherd PR, Nave BT, Siddle K.** (1995) 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.* 305 (Pt 1):25-8.

- Shepherd PR, Withers DJ, Siddle K.** (1998) Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem. J.* 333 (Pt 3):471-90.
- Shewan AM, Marsh BJ, Melvin DR, Martin S, Gould GW, James DE.** (2000) The cytosolic C-terminus of the glucose transporter GLUT4 contains an acidic cluster endosomal targeting motif distal to the dileucine signal. *Biochem. J.* 350 Pt 1:99-107.
- Shewan AM, van Dam EM, Martin S, Luen TB, Hong W, Bryant NJ, James DE.** (2003) GLUT4 recycles via a trans-Golgi network (TGN) subdomain enriched in Syntaxins 6 and 16 but not TGN38: involvement of an acidic targeting motif. *Mol. Biol. Cell.* 14(3):973-86.
- Shibata H, Omata W, Suzuki Y, Tanaka S, Kojima I.** (1996) A synthetic peptide corresponding to the Rab4 hypervariable carboxyl-terminal domain inhibits insulin action on glucose transport in rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* 271(16):9704-9.
- Shigematsu S, Khan AH, Kanzaki M, Pessin JE.** (2002) Intracellular insulin-responsive glucose transporter (GLUT4) distribution but not insulin-stimulated GLUT4 exocytosis and recycling are microtubule dependent. *Mol. Endocrinol.* 16(5):1060-8.
- Shin OH, Couvillon AD, Exton JH.** (2001) Arfophilin is a common target of both class II and class III ADP-ribosylation factors. *Biochemistry.* 40(36):10846-52.
- Shin OH, Ross AH, Mihai I, Exton JH.** (1999) Identification of arfophilin, a target protein for GTP-bound class II ADP-ribosylation factors. *J. Biol. Chem.* 274(51):36609-15.
- Shoelson SE, White MF, Kahn CR.** (1988) Tryptic activation of the insulin receptor. Proteolytic truncation of the alpha-subunit releases the beta-subunit from inhibitory control. *J. Biol. Chem.* 263(10):4852-60.
- Simons K, Ehehalt R.** (2002) Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J. Clin. Invest.* 110(5):597-603.
- Simonsen A, Lippe R, Christoforidis S, Gaullier JM, Brech A, Callaghan J, Toh BH, Murphy C, Zerial M, Stenmark H.** (1998) EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature.* 394(6692):494-8.
- Simopoulos AP.** (2002) Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *J. Am. Coll. Nutr.* 21(6):495-505.
- Singer P, Gnauck G, Honigmann G, Thielke H, Schliack V, Lauter J.** (1977) Triglycerides, free fatty acids and cholesterol after fat loading and heparin injection in diabetics with and without hyperlipoproteinemia as well as after clofibrate treatment. *Dtsch. Z. Verdau. Stoffwechselkr.* 37(1):27-37.
- Slot JW, Geuze HJ, Gigengack S, James DE, Lienhard GE.** (1991) Translocation of the glucose transporter GLUT4 in cardiac myocytes of the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 88(17):7815-9.
- Smart EJ, Graf GA, McNiven MA, Sessa WC, Engelman JA, Scherer PE, Okamoto T, Lisanti MP.** (1999) Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol. Cell. Biol.* 19(11):7289-304.

Soldati T, Shapiro AD, Svejstrup AB, Pfeffer SR. (1994) Membrane targeting of the small GTPase Rab9 is accompanied by nucleotide exchange. *Nature*. 369(6475):76-8.

Spencer ML, Theodosiou M, Noonan DJ. (2004) NPDC-1, a novel regulator of neuronal proliferation, is degraded by the ubiquitin/proteasome system through a PEST degradation motif. *J. Biol. Chem.* 279(35):37069-78.

Stahl A, Hirsch DJ, Gimeno RE, Punreddy S, Ge P, Watson N, Patel S, Kotler M, Raimondi A, Tartaglia LA, Lodish HF. (1999) Identification of the major intestinal fatty acid transport protein. *Mol. Cell.* 4(3):299-308.

Stahl A, Gimeno RE, Tartaglia LA, Lodish HF. (2001) Fatty acid transport proteins: a current view of a growing family. *Trends Endocrinol. Metab.* 12(6):266-73.

Stahl A. (2004) A current review of fatty acid transport proteins (SLC27). *Pflugers Arch.* 447(5):722-7.

Stamnes M. (2002) Regulating the actin cytoskeleton during vesicular transport. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 14(4):428-33.

Standaert ML, Galloway L, Karnam P, Bandyopadhyay G, Moscat J, Farese RV. (1997) Protein kinase C-zeta as a downstream effector of phosphatidylinositol 3-kinase during insulin stimulation in rat adipocytes. Potential role in glucose transport. *J. Biol. Chem.* 272(48):30075-82.

Standaert ML, Bandyopadhyay G, Perez L, Price D, Galloway L, Poklepovic A, Sajan MP, Cenni V, Sirri A, Moscat J, Toker A, Farese RV. (1999) Insulin activates protein kinases C-zeta and C-lambda by an autophosphorylation-dependent mechanism and stimulates their translocation to GLUT4 vesicles and other membrane fractions in rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* 274(36):25308-16.

Stenbit AE, Tsao TS, Li J, Burcelin R, Geenen DL, Factor SM, Houseknecht K, Katz EB, Charron MJ. (1997) GLUT4 heterozygous knockout mice develop muscle insulin resistance and diabetes. *Nat. Med.* 3(10):1096-101.

Stremmel W, Lotz G, Strohmeyer G, Berk PD. (1985) Identification, isolation, and partial characterization of a fatty acid binding protein from rat jejunal microvillous membranes. *J. Clin. Invest.* 75(3):1068-76.

Subtil A, Lampson MA, Keller SR, McGraw TE. (2000) Characterization of the insulin-regulated endocytic recycling mechanism in 3T3-L1 adipocytes using a novel reporter molecule. *J. Biol. Chem.* 275(7):4787-95.

Sutton RB, Fasshauer D, Jahn R, Brunger AT. (1998) Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature*. 395(6700):347-53.

Suzuki K, Kono T. (1980) Evidence that insulin causes translocation of glucose transport activity to the plasma membrane from an intracellular storage site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 77(5):2542-5.

Terada S, Hirokawa N. (2000) Moving on to the cargo problem of microtubule-dependent motors in neurons. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10(5):566-73.

Terauchi Y, Tsuji Y, Satoh S, Minoura H, Murakami K, Okuno A, Inukai K, Asano T, Kaburagi Y, Ueki K, Nakajima H, Hanafusa T, Matsuzawa Y, Sekihara H, Yin Y, Barrett JC, Oda H, Ishikawa T, Akanuma Y, Komuro I, Suzuki M, Yamamura K, Kodama T, Suzuki H, Yamamura K, Kodama T, Suzuki H, Koyasu S, Aizawa S, Tobe K, Fukui Y, Yazaki Y, Kadowaki T. (1999) Increased insulin sensitivity and hypoglycaemia in mice lacking the p85 alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Nat. Genet.* 21(2):230-5.

Thurmond DC, Ceresa BP, Okada S, Elmendorf JS, Coker K, Pessin JE. (1998) Regulation of insulin-stimulated GLUT4 translocation by Munc18c in 3T3L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 273(50):33876-83.

Thurmond DC, Pessin JE. (2000) Discrimination of GLUT4 vesicle trafficking from fusion using a temperature-sensitive Munc18c mutant. *EMBO J.* 19(14):3565-75.

Till M, Kolter T, Eckel J. (1997) Molecular mechanisms of contraction-induced translocation of GLUT4 in isolated cardiomyocytes. *Am. J. Cardiol.* 80(3A):85A-89A.

Tong P, Khayat ZA, Huang C, Patel N, Ueyama A, Klip A. (2001) Insulin-induced cortical actin remodeling promotes GLUT4 insertion at muscle cell membrane ruffles. *J. Clin. Invest.* 108(3):371-81.

Tsakiridis T, McDowell HE, Walker T, Downes CP, Hundal HS, Vranic M, Klip A. (1995) Multiple roles of phosphatidylinositol 3-kinase in regulation of glucose transport, amino acid transport, and glucose transporters in L6 skeletal muscle cells. *Endocrinology.* 136(10):4315-22.

Tuxworth RI, Titus MA. (2000) Unconventional myosins: anchors in the membrane traffic relay. *Traffic.* 1(1):11-8.

Uhlig M, Passlack W, Eckel J. (2005) Functional role of Rab11 in GLUT4 trafficking in cardiomyocytes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 235(1-2):1-9.

Uldry M, Ibberson M, Horisberger JD, Chatton JY, Riederer BM, Thorens B. (2001) Identification of a mammalian H(+)-myo-inositol symporter expressed predominantly in the brain. *EMBO J.* 20(16):4467-77.

Ullrich A, Bell JR, Chen EY, Herrera R, Petruzzelli LM, Dull TJ, Gray A, Coussens L, Liao YC, Tsubokawa M, et al. (1985) Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature.* 313(6005):756-61.

Ullrich O, Horiuchi H, Bucci C, Zerial M. (1994) Membrane association of Rab5 mediated by GDP-dissociation inhibitor and accompanied by GDP/GTP exchange. *Nature.* 368(6467):157-60.

Ullrich O, Reinsch S, Urbe S, Zerial M, Parton RG. (1996) Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. *J. Cell. Biol.* 135(4):913-24.

- Ullrich A, Schlessinger J.** (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell.* 61(2):203-12.
- Unger RH.** (2002) Lipotoxic diseases. *Annu. Rev. Med.* 53:319-36.
- Uphues I, Kolter T, Goud B, Eckel J.** (1994) Insulin-induced translocation of the glucose transporter GLUT4 in cardiac muscle: studies on the role of small-molecular-mass GTP-binding proteins. *Biochem. J.* 301 (Pt 1):177-82.
- Uphues I, Kolter T, Goud B, Eckel J.** (1995) Failure of insulin-regulated recruitment of the glucose transporter GLUT4 in cardiac muscle of obese Zucker rats is associated with alterations of small-molecular-mass GTP-binding proteins. *Biochem. J.* 311(Pt 1):161-6.
- Valentijn JA, Valentijn K, Pastore LM, Jamieson JD.** (2000) Actin coating of secretory granules during regulated exocytosis correlates with the release of rab3D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97(3):1091-5.
- Vannucci SJ, Maher F, Simpson IA.** (1997) Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia. *Glia.* 21(1):2-21.
- van der Blik AM, Meyerowitz EM.** (1991) Dynamin-like protein encoded by the *Drosophila shibire* gene associated with vesicular traffic. *Nature.* 351(6325):411-4.
- Vaughan PS, Miura P, Henderson M, Byrne B, Vaughan KT.** (2002) A role for regulated binding of p150(Glued) to microtubule plus ends in organelle transport. *J. Cell. Biol.* 158(2):305-19.
- Vetter IR, Wittinghofer A.** (2001) The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science.* 294(5545):1299-304.
- Villalba M, Wente SR, Russell DS, Ahn JC, Reichelderfer CF, Rosen OM.** (1989) Another version of the human insulin receptor kinase domain: expression, purification, and characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 86(20):7848-52.
- Vitale G, Rybin V, Christoforidis S, Thornqvist P, McCaffrey M, Stenmark H, Zerial M.** (1998) Distinct Rab-binding domains mediate the interaction of Rabaptin-5 with GTP-bound Rab4 and Rab5. *EMBO J.* 17(7):1941-51.
- Vogt B, Carrascosa JM, Ermel B, Ullrich A, Haring HU.** (1991) The two isoforms of the human insulin receptor (HIR-A and HIR-B) follow different internalization kinetics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 177(3):1013-8.
- Wada T, Sasaoka T, Ishiki M, Hori H, Haruta T, Ishihara H, Kobayashi M.** (1999) Role of the Src homology 2 (SH2) domain and C-terminus tyrosine phosphorylation sites of SH2-containing inositol phosphatase (SHIP) in the regulation of insulin-induced mitogenesis. *Endocrinology.* 140(10):4585-94.
- Wagner W, Bielli P, Wacha S, Ragnini-Wilson A.** (2002) Mlc1p promotes septum closure during cytokinesis via the IQ motifs of the vesicle motor Myo2p. *EMBO J.* 21(23):6397-408.

- Wakabayashi Y, Dutt P, Lippincott-Schwartz J, Arias IM.** (2005) Rab11a and myosin Vb are required for bile canalicular formation in WIF-B9 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 102(42):15087-92.
- Wallace DM, Lindsay AJ, Hendrick AG, McCaffrey MW.** (2002) The novel Rab11-FIP/Rip/RCP family of proteins displays extensive homo- and hetero-interacting abilities. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 292(4):909-15.
- Wallberg-Henriksson H, Zierath JR.** (2001) GLUT4: a key player regulating glucose homeostasis? Insights from transgenic and knockout mice. *Mol. Membr. Biol.* 18(3):205-11.
- Wang Q, Somwar R, Bilan PJ, Liu Z, Jin J, Woodgett JR, Klip A.** (1999) Protein kinase B/Akt participates in GLUT4 translocation by insulin in L6 myoblasts. *Mol. Cell. Biol.* 19(6):4008-18.
- Wang X, Kumar R, Navarre J, Casanova JE, Goldenring JR.** (2000) Regulation of vesicle trafficking in madin-darby canine kidney cells by Rab11a and Rab25. *J. Biol. Chem.* 275(37):29138-46.
- Watkins PA, Pevsner J, Steinberg SJ.** (1999) Human very long-chain acyl-CoA synthetase and two human homologs: initial characterization and relationship to fatty acid transport protein. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty. Acids.* 60(5-6):323-8.
- Watson RT, Shigematsu S, Chiang SH, Mora S, Kanzaki M, Macara IG, Saltiel AR, Pessin JE.** (2001) Lipid raft microdomain compartmentalization of TC10 is required for insulin signaling and GLUT4 translocation. *J. Cell. Biol.* 154(4):829-40.
- Watson RT, Kanzaki M, Pessin JE.** (2004) Regulated membrane trafficking of the insulin-responsive glucose transporter 4 in adipocytes. *Endocr. Rev.* 25(2):177-204.
- Wei J, Fain S, Harrison C, Feig LA, Baleja JD.** (2006) Molecular dissection of Rab11 binding from coiled-coil formation in the Rab11-FIP2 C-terminal domain. *Biochemistry.* 45(22):6826-34.
- Welch MD, Mullins RD.** (2002) Cellular control of actin nucleation. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 18:247-88.
- Wennerberg K, Rossman KL, Der CJ.** (2005) The Ras superfamily at a glance. *J. Cell. Sci.* 118(Pt 5):843-6.
- White MF.** (1997) The insulin signalling system and the IRS proteins. *Diabetologia.* 40 Suppl 2:S2-17.
- White MF, Kahn CR.** (1994) The insulin signaling system. *J. Biol. Chem.* 269(1):1-4.
- White J, Johannes L, Mallard F, Girod A, Grill S, Reinsch S, Keller P, Tzschaschel B, Echard A, Goud B, Stelzer EH.** (1999) Rab6 coordinates a novel Golgi to ER retrograde transport pathway in live cells. *J. Cell. Biol.* 147(4):743-60.
- World Health Organization (WHO).** (1999) Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and Its Complications: Report of a WHO Consultation.

- Whyte JR, Munro S.** (2002) Vesicle tethering complexes in membrane traffic. *J. Cell. Sci.* 115(Pt 13):2627-37.
- Widberg CH, Bryant NJ, Girotti M, Rea S, James DE.** (2003) Tomosyn interacts with the t-SNAREs syntaxin4 and SNAP23 and plays a role in insulin-stimulated GLUT4 translocation. *J. Biol. Chem.* 278(37):35093-101.
- Wiese RJ, Mastick CC, Lazar DF, Saltiel AR.** (1995) Activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3'-kinase is not sufficient for the hormonal stimulation of glucose uptake, lipogenesis, or glycogen synthesis in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 270(7):3442-6.
- Wilcke M, Johannes L, Galli T, Mayau V, Goud B, Salamero J.** (2000) Rab11 regulates the compartmentalization of early endosomes required for efficient transport from early endosomes to the trans-golgi network. *J. Cell. Biol.* 151(6):1207-20.
- Wilden PA, Kahn CR, Siddle K, White MF.** (1992) Insulin receptor kinase domain autophosphorylation regulates receptor enzymatic function. *J. Biol. Chem.* 267(23):16660-8.
- Wilson GM, Fielding AB, Simon GC, Yu X, Andrews PD, Hames RS, Frey AM, Peden AA, Gould GW, Prekeris R.** (2005) The FIP3-Rab11 protein complex regulates recycling endosome targeting to the cleavage furrow during late cytokinesis. *Mol. Biol. Cell.* 16(2):849-60.
- Wood IS, Trayhurn P.** (2003) Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br. J. Nutr.* 89(1):3-9.
- Wright EM.** (2001) Renal Na(+)-glucose cotransporters. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 280(1):F10-8.
- Yaekura K, Julyan R, Wicksteed BL, Hays LB, Alarcon C, Sommers S, Poitout V, Baskin DG, Wang Y, Philipson LH, Rhodes CJ.** (2003) Insulin secretory deficiency and glucose intolerance in Rab3A null mice. *J. Biol. Chem.* 278(11):9715-21.
- Yamashita A, Sugiura T, Waku K.** (1997) Acyltransferases and transacylases involved in fatty acid remodeling of phospholipids and metabolism of bioactive lipids in mammalian cells. *J. Biochem. (Tokyo).* 122(1):1-16.
- Yang J, Holman GD.** (1993) Comparison of GLUT4 and GLUT1 subcellular trafficking in basal and insulin-stimulated 3T3-L1 cells. *J. Biol. Chem.* 268(7):4600-3.
- Yang C, Coker KJ, Kim JK, Mora S, Thurmond DC, Davis AC, Yang B, Williamson RA, Shulman GI, Pessin JE.** (2001) Syntaxin 4 heterozygous knockout mice develop muscle insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 107(10):1311-8.
- Yi Z, Yokota H, Torii S, Aoki T, Hosaka M, Zhao S, Takata K, Takeuchi T, Izumi T.** (2002) The Rab27a/granophilin complex regulates the exocytosis of insulin-containing dense-core granules. *Mol. Cell. Biol.* 22(6):1858-67.
- Zawalich WS, Rasmussen H.** (1990) Control of insulin secretion: a model involving Ca²⁺, cAMP and diacylglycerol. *Mol. Cell. Endocrinol.* 70(2):119-37.

Zawalich WS, Zawalich KC. (1996) Species differences in the induction of time-dependent potentiation of insulin secretion. *Endocrinology*. 137(5):1664-9.

Zeigerer A, Lampson MA, Karylowski O, Sabatini DD, Adesnik M, Ren M, McGraw TE. (2002) GLUT4 retention in adipocytes requires two intracellular insulin-regulated transport steps. *Mol. Biol. Cell*. 13(7):2421-35.

Zeigerer A, McBrayer MK, McGraw TE. (2004) Insulin stimulation of GLUT4 exocytosis, but not its inhibition of endocytosis, is dependent on RabGAP AS160. *Mol. Biol. Cell*. 15(10):4406-15.

Zeng J, Ren M, Gravotta D, De Lemos-Chiarandini C, Lui M, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Xu G, Shen TH, Morimoto T, Adesnik M, Sabatini DD. (1999) Identification of a putative effector protein for rab11 that participates in transferrin recycling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 96(6):2840-5.

Zeng Y, Tao N, Chung KN, Heuser JE, Lublin DM. (2003) Endocytosis of oxidized low density lipoprotein through scavenger receptor CD36 utilizes a lipid raft pathway that does not require caveolin-1. *J. Biol. Chem*. 278(46):45931-6.

Zerial M, McBride H. (2001) Rab proteins as membrane organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol*. 2(2):107-17.

Zhou YT, Grayburn P, Karim A, Shimabukuro M, Higa M, Baetens D, Orci L, Unger RH. (2000) Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 97(4):1784-9.

Zhou QL, Park JG, Jiang ZY, Holik JJ, Mitra P, Semiz S, Guilherme A, Powelka AM, Tang X, Virbasius J, Czech MP. (2004) Analysis of insulin signalling by RNAi-based gene silencing. *Biochem. Soc. Trans*. 32(Pt 5):817-21.

Zorzano A, Munoz P, Camps M, Mora C, Testar X, Palacin M. (1996) Insulin-induced redistribution of GLUT4 glucose carriers in the muscle fiber. In search of GLUT4 trafficking pathways. *Diabetes*. 45 Suppl 1:S70-81.

7. Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Schematische Darstellung der weiterführenden Signalwege des Insulinrezeptors.	8
Abb. 1.2	Schematische Darstellung des PI3-Kinase-Signalweges.	11
Abb. 1.3	Schematische Darstellung des Cbl/CAP-Signalweges.	14
Abb. 1.5	Regulation der Aktivität von Ras-GTPasen.	29
Abb. 2.1	Schematische Darstellung des Western Blotting nach dem Semi-Dry-Verfahren.	65
Abb. 3.1	Expression von Rab11a, Rip11 und Rab11-FIP2 in verschiedenen Zelllinien bzw. Geweben der Spezies Ratte.	67
Abb. 3.2	Gesamt-RNA aus H9c2-hIR-Zellen.	68
Abb. 3.3	Auswertung der ZM-Werte aus zwei Läufen.	69
Abb. 3.4	Amplifikation der mRNA von Rab11a und Rab11b durch Real-Time-PCR.	70
Abb. 3.5	Vektorkarte pCMV-HA-hIRS1.	71
Abb. 3.6	Aufreinigung Vektor pCMV-HA und PCR-Produkt Rab11a.	72
Abb. 3.7	Vektorkarte pCMV-HA-Rab11a und Restriktionsanalyse.	73
Abb. 3.8	Überexpression HA-Rab11a in H9c2-hIR-Zellen.	74
Abb. 3.9	Immunopräzipitation HA-Rab11a.	74
Abb. 3.10	Elektroporation von H9c2-hIR-Zellen.	75
Abb. 3.11	Adhärenz und Akt-Aktivierung nach der Elektroporation.	76
Abb. 3.12	Insulinkinetik der GTP-Beladung von HA-Rab11a.	78
Abb. 3.13	Hemmung der PI3-Kinase und GTP-Beladung von HA-Rab11a.	79
Abb. 3.14	Genrepression von Akt und Einfluss auf das Insulinsignal.	81
Abb. 3.15	Genrepression von Akt und GTP-Beladung von HA-Rab11a.	82
Abb. 3.16	Genrepression von Rab11a, Rip11 und Rab11-FIP2 in H9c2-hIR-Zellen nach 48 Stunden.	83
Abb. 3.17	Einfluss der Überexpression von GLUT4myc auf die Genrepression von Rab11a, Rip11 und FIP2.	84
Abb. 3.18	Einfluss der Genrepression von Rab11a, Rip11 und FIP2 auf die Überexpression von GLUT4myc.	85
Abb. 3.19	Einfluss der Überexpression von FAT/CD36 auf die Genrepression von Rab11a, Rip11 und FIP2.	86
		144

Abb. 3.20	Einfluss der Genrepression von Rab11a, Rip11 und FIP2 auf die Überexpression von FAT/CD36.	87
Abb. 3.21	Translokation von GLUT4myc unter Einfluss der Genrepression von Rab11a, Rip11 und Rab11-FIP2.	88
Abb. 3.22	Inkrement des membranständigen GLUT4myc.	89
Abb. 3.23	Relative Steigerung der GLUT4myc-Translokation durch Insulin.	90
Abb. 3.24	Aktivierung der AMPK.	91
Abb. 3.25	Translokation von FAT/CD36 unter Einfluss der Genrepression von Rab11a, Rip11 und Rab11-FIP2.	92
Abb. 3.26	Inkrement des membranständigen FAT/CD36.	93
Abb. 3.27	Relative Steigerung der FAT/CD36-Translokation durch Sorbitol.	94
Abb. 4.1	Modell der insulinabhängigen Rab11a-Aktivierung	103
Abb. 4.2	Modell der Funktion von Rab11a in der GLUT4-Internalisierung.	109

7.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1	Klassifizierung der Na ⁺ -unabhängigen Glucosetransporter der GLUT-Familie.	17
Tab. 1.2	Familien der Ras-GTPasen-Superfamilie.	28
Tab. 2.1	Typischer Reaktionsansatz einer Polymerasekettenreaktion.	48
Tab. 2.2	Schematischer Ablauf einer Polymerasekettenreaktion.	49
Tab. 2.3	Typischer Reaktionsansatz einer Mutagenese-PCR.	49
Tab. 2.4	Schematischer Ablauf einer Mutagenese-PCR.	50
Tab. 2.5	Prinzipieller Reaktionsansatz für eine Restriktionsanalyse.	53
Tab. 2.6	Reaktionsansatz einer Reversen Transkription mit Omniscript.	56
Tab. 2.7	Primer für Real-Time-PCR.	57
Tab. 2.8	Einfacher Reaktionsansatz für die Real-Time-PCR.	57
Tab. 2.9	Schematischer Ablauf einer Real-Time-PCR mit TempRamp.	58

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jürgen Eckel, in dessen Arbeitsgruppe ich diese Arbeit erstellen konnte. Er brachte dieser Arbeit stets höchstes Interesse entgegen und viele gemeinsame Diskussionen ermöglichten ein erfolgreiches Fortschreiten der Dissertation. Des Weiteren brachte die durch ihn ermöglichte Teilnahme und Mitwirkung an Kongressen und Veröffentlichungen immer neue entscheidende Anregungen für die wissenschaftliche Arbeit.

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

Frau Birgit Hurow im Sekretariat von Prof. Eckel und allen meinen Kollegen im Labor möchte ich für die Unterstützung und besonders für die in den letzten Jahren geschaffene Arbeitsatmosphäre danken, die nicht nur im Laboraltag vieles auf eine familiäre Weise vereinfachte und ermöglichte.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die durch die Balance von unermüdlicher Unterstützung und Ansporn mir persönlich in allen Lebenslagen zur Seite stehen. Auch meiner Freundin Regina danke ich für ihre Geduld und Liebe, durch die auch sie letztendlich meine Dissertation ermöglicht hat.