

# Untersuchungen zur hydrationsabhängigen Modulation des mTOR-Signalweges in Hepatomzellen

**Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

vorgelegt von  
Lisa Evelyn Richter  
aus Nürnberg

Düsseldorf 2008

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

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

Referent: PD Dr. rer. nat. Freimut Schliess

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Frank Wunderlich

Tag der mündlichen Prüfung: 24.4.2008

Teilergebnisse wurden in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Publikationen:**

C. Schäfer, T. Gehrman, L. Richter, V. Keitel, K. Köhrer, D. Häussinger und F. Schliess (2007); *Modulation of Gene Expression Profile by Hyperosmolarity and Insulin*, **Cellular Physiology and Biochemistry** 20:369-286

R. Lornejad-Schäfer, C. Schäfer, L. Richter, T. Grune, D. Häussinger und F. Schliess (2005); *Osmotic regulation of MG-132-induced MAP-kinase Phosphatase MKP-1 expression in H4IIE rat hepatoma cells*; **Cellular Physiology and Biochemistry**, 16:193-206

G. Mannack, D. Graf, M. Donner, L. Richter, B. Görg, S. vom Dahl, D. Häussinger und F. Schliess (2008); *Taurolithocholic acid-3 sulfat impairs Insulin signaling in cultured rat hepatocytes and perfused rat liver*; **Cellular Physiology and Biochemistry**, 21:137-150

### **Review:**

F. Schliess, L. Richter, S. vom Dahl und D. Häussinger (2006); *Cell hydration and mTOR-dependent signalling*; **Acta Physiology**, 187: 223-229

### **Tagungsbeiträge:**

L. Richter, D. Häussinger, F. Schliess (2005); *Cell hydration dependence of signaling via mTOR* (Vortrag); Abstract no. G3, **Signal Transduction Society (STS) 9th Joint Meeting**, Weimar

L. Richter, S. vom Dahl, D. Häussinger und F. Schliess (2006); *Hydratationsabhängigkeit der hepatischen Signaltransduktion von mTOR* (Poster); Abstract no 2.30, **GASL**, 22. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber, Leipzig

L. Richter, B. Görg, H. Steinbrenner, D. Häussinger und F. Schliess (2006); *Hyperosmotic insulin resistance in H4IIE rat hepatoma cells: does oxidative stress play a role?* (Poster); Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie, **57. Mosbacher Kolloquium**, „Redox Signaling: Mechanisms and Biological Impact“, Mosbach

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	<b>Zellhydratation</b>	<b>1</b>
1.1.1	Dynamik der Zellhydratation	1
1.1.2	Osmosensoren und osmosensitive Signaltransduktion	3
1.1.3	Zellhydratation und Leberfunktion	4
1.2	<b>Zellhydratation und mTOR-Signalweg</b>	<b>5</b>
1.2.1	mTOR-Signalweg	5
1.2.2	mTOR und Aminosäuren	8
1.2.3	Zelluläre Hydratation und Sensitivität gegen Insulin und Zytokine	8
1.3	<b>Zielsetzung</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>11</b>
2.1	<b>Material</b>	<b>11</b>
2.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	11
2.1.2	Lösungen und Puffer	11
2.1.3	Kits	13
2.1.4	Zellkultur	13
2.1.4.1	Zelllinien	13
2.1.4.2	Medien und Zusätze	13
2.1.4.3	In der Zellkultur eingesetzte Substanzen	14
2.1.5	Antikörper	14
2.1.6	Primer	14
2.2	<b>Methoden</b>	<b>15</b>
2.2.1	Kultivierung der Zelllinien	15
2.2.2	Proteinanalyse	15
2.2.2.1	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	15
2.2.2.2	SDS-Page	16
2.2.2.3	Western-Blot Analyse	16
2.2.2.4	Immundetektion	17
2.2.3	DCF und DAF-FM Messungen	18
2.2.4	Bestimmung des intrazellulären Aminosäure-Profiles	18
2.2.5	AMPK-Aktivitäts Assay	18
2.2.6	Reverse Transkription und quantitative Real-Time PCR (RT PCR)	19
2.2.7	DNA Mikroarray Hybridisierung	20
2.2.7.1	RNA-Isolierung und cDNA Synthese	20
2.2.7.2	Array Analyse	21
2.2.8	Statistische Auswertung	21
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>23</b>
3.1	<b>Charakterisierung der Osmosensitivität der 4E-BP1 Phosphorylierung</b>	<b>23</b>
3.1.1	Einfluss hyperosmotischer Dehydratation auf die 4E-BP1 Phosphorylierung	23
3.1.2	Osmolaritätsabhängigkeit der 4E-BP1 Phosphorylierung	24
3.1.3	Einfluss unterschiedlicher Osmolyte auf die 4E-BP1 Phosphorylierung	25
3.2	Pharmakologische Charakterisierung der hyperosmotisch induzierten Verminderung der 4E-BP1 Phosphorylierung	27
3.2.1	Beteiligung des Cytoskeletts	27
3.2.2	Rolle von Phosphatasen und Kinasen	28
3.2.3	Rolle von Proteinsynthese und Proteolyse	30
3.2.4	Rolle von oxidativem Stress und NO	31
3.3	<b>Einfluss von Epigallocatechin Gallat auf die 4E-BP1 Phosphorylierung</b>	<b>36</b>
3.3.1	EGCG als p38 MAPK Inhibitor?	36
3.3.2	Effekt des EGCG auf Komponenten des mTOR-Signalweges	37

---

<b>3.4</b>	<b>Beeinflussung der Aminosäure-Sensitivität des mTOR-Signalweges durch Hyperosmolarität</b> .....	<b>39</b>
3.4.1	Einfluss von Anisoosmolarität auf die intrazellulären Konzentrationen freier Aminosäuren	39
3.4.2	Rolle der PI 3-Kinase und gegen Rapamycin sensitiver mTOR-Signale für die hyperosmotische Unterdrückung der 4E-BP1 Phosphorylierung	41
3.4.3	Effekt von Hyperosmolarität auf die durch Leucin-induzierte Phosphorylierung des 4E-BP1 und der p70 S6-Kinase	43
<b>3.5</b>	<b>Rolle der AMPK bei der hyperosmotischen Unterdrückung der 4E-BP1 Phosphorylierung</b> .....	<b>45</b>
3.5.1	Hyperosmotisch induzierte AMPK-Aktivierung	45
3.5.2	Pharmakologische Charakterisierung der AMPK-Aktivierung	46
3.5.3	Rolle der AMPK bei der hyperosmotischen Unterdrückung der 4E-BP1 Phosphorylierung	47
<b>3.6</b>	<b>Osmosensitivität der Expression mTOR-abhängig regulierter Gene</b> .....	<b>49</b>
3.6.1	Hyperosmotische Suppression der Cyclin D1 Expression	49
3.6.2	Osmosensitivität der Igfbp 1 mRNA Expression	50
<b>3.7</b>	<b>Einfluss von Hyperosmolarität und Rapamycin auf das Genexpressionsprofil der humanen Huh7 Hepatoma-Zelllinie</b> .....	<b>52</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>56</b>
4.1	Pharmakologische Charakterisierung des hyperosmotischen Effekts auf die 4E-BP1 Phosphorylierung	57
4.2	Rolle von Aminosäuren für die Sensitivität des mTOR-Signalweges gegen Hyperosmolarität	62
4.3	Osmosensitivität der Phosphorylierung von Signalproteinen des mTOR-Weges	64
4.4	Rolle der AMP-aktivierten Proteinkinase bei der hyper-osmotischen Regulation des mTOR-Signalweges	65
4.5	Hyperosmotische Regulation der Cyclin D1- und IGFBP 1-Expression	67
4.6	Einfluss von Hyperosmolarität und Rapamycin auf das Genexpressionsprofil in humanen Hepatom-Zellen	69
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>71</b>
<b>6</b>	<b>Summary</b> .....	<b>72</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>73</b>
<b>8</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>83</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>85</b>
<b>10</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>86</b>
<b>11</b>	<b>Erklärung</b> .....	<b>94</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Zellhydratation

### 1.1.1 Dynamik der Zellhydratation

Der zelluläre Hydratationszustand ist dynamisch und kann sich innerhalb von Minuten verändern. Beeinflusst wird die zelluläre Hydratation durch Anisoosmolarität, Hormone, Nährstoffe und oxidativen Stress (Häussinger & Lang, 1991). Bereits geringe Schwankungen der Zellhydratation agieren als separates und potentes Signal in der Regulation des zellulären Metabolismus und der Genexpression (Häussinger & Lang, 1992; Häussinger et al., 1994; Häussinger, 1996; Schliess & Häussinger, 2003; Schliess & Häussinger).

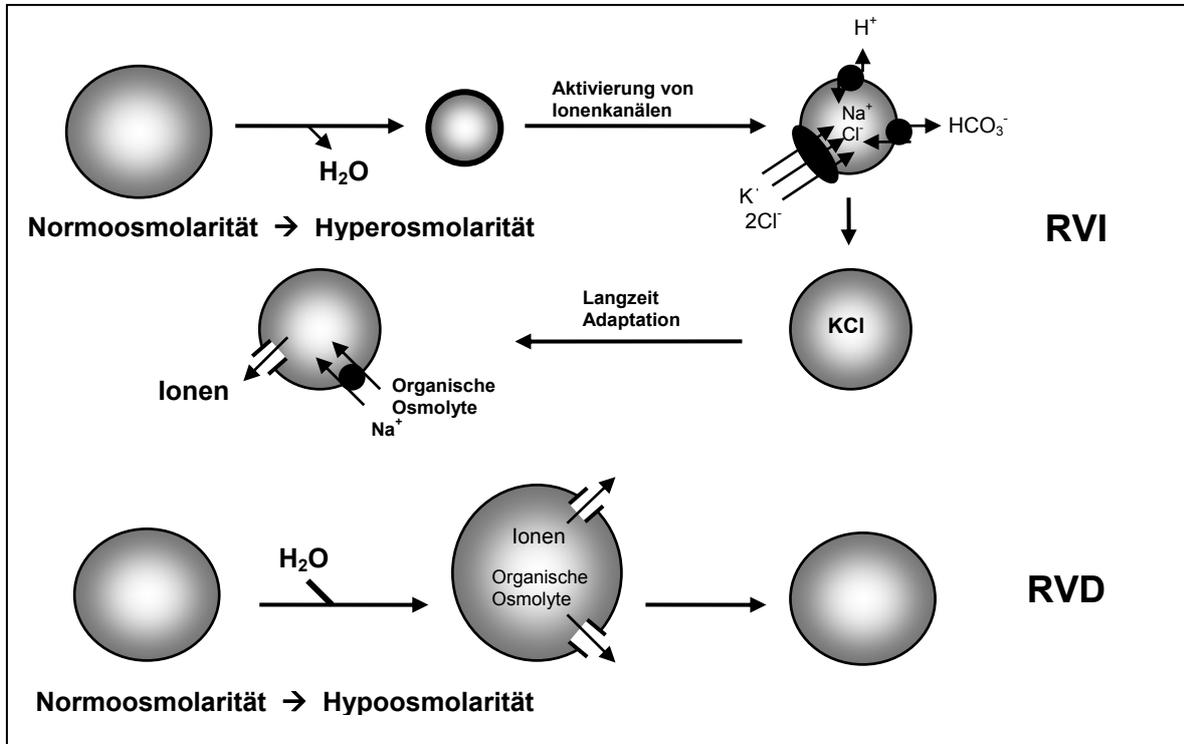
Hepatozyten, die hyper- oder hypoosmotischen Bedingungen ausgesetzt sind, reagieren, initial fast wie perfekte Osmometer, mit einer Zellvolumenabnahme bzw. Zellvolumenzunahme, bevor sie eine regulatorische Volumenzunahme (*regulatory volume increase*; RVI) bzw. Volumenabnahme (*regulatory volume decrease*; RVD) zeigen (siehe Abb. 1.1) (Häussinger et al., 1990; Häussinger et al., 1991, 2004; Graf & Häussinger 1996).

In der Rattenleber wird eine RVD als Antwort auf hypoosmotische Schwellung hauptsächlich durch die Freisetzung von anorganischen Ionen, wie  $K^+$ ,  $Cl^-$  und Bicarbonat sowie durch die Freisetzung organischer Osmolyte wie Taurin oder Betain erreicht (siehe Abb. 1.1) (Häussinger et al., 2004).

Die hyperosmotisch induzierte RVI wird in der Leber, zumindest zum Teil, durch parallele Aktivierung des  $Na^+/H^+$  und  $Cl^-/HCO_3^-$  Austausches und durch Aktivierung des  $Na^+/K^+/2Cl^-$  Transporters NKCC1 reguliert (Graf & Häussinger, 1996; Schliess et al., 2002; Häussinger et al., 2004) (siehe Abb. 1.1). Auf diesem Weg kommt es zu einer Erhöhung der intrazellulären Ionenstärke, was allerdings mit der Funktion unterschiedlicher Proteine interferieren kann. Eine Langzeitadaptation an dehydrierende Bedingungen wird über einen isoosmotischen Austausch von Ionen gegen kompatible organische Osmolyte erzielt (Schliess & Häussinger, 2002; Schliess et al., 2002).

Weder RVI noch RVD stellen das Ausgangsvolumen vollständig wieder her. Eine bleibende Volumenabweichung scheint als Signal zu wirken, welches zelluläre

Funktionen modifiziert. Die an RVI und RVD beteiligten Transportsysteme werden auch durch Wachstumsfaktoren und apoptotische Stimuli aktiviert, was dann zu Zellvolumenveränderungen unter isoosmotischen Bedingungen führt (Häussinger & Lang, 1992; Häussinger, 1996).



**Abb. 1.1 Osmolytstrategie und Zellvolumenregulation**

Hyperosmotisches Schumpfen induziert eine regulatorische Volumenzunahme (*regulatory volume increase*; RVI), während hypoosmotisches Schwellen eine regulatorische Volumenabnahme (*regulatory volume decrease*; RVD) verursacht. Kurzfristig ist RVI durch eine Elektrolytaufnahme reguliert, während eine Langzeit-Adaptation an dehydrierende Bedingungen durch einen isoosmotischen Austausch von Elektrolyten gegen kompatible organische Osmolyte geregelt ist. (Nach Schliess & Häussinger, 2005).

Etwas verallgemeinernd lässt sich feststellen, dass eine Volumenzunahme anabole Stoffwechselprozesse und die Proliferation fördert, während eine Zellvolumenabnahme zur Katabolie führt und Insulinresistenz vermittelt sowie die Zellen für apoptotische Signale sensitiviert (Häussinger & Lang, 1991; Häussinger & Lang, 1992; Häussinger et al., 1994; Häussinger, 1996; Schliess & Häussinger, 2003; Häussinger et al., 2004; Schliess et al., 2005). Anisoosmotisch exponierte Zellen und Gewebe sind ein geeignetes Modell, um zellvolumenabhängige Prozesse zu identifizieren und zu charakterisieren.

### 1.1.2 Osmosensoren und osmosensitive Signaltransduktion

Veränderungen der Zellhydratation werden durch sog. Osmosensoren registriert (*Osmosensing*). Die durch Zellhydratation regulierten Strukturen, nehmen Hydratationsänderungen wahr und aktivieren intrazelluläre Signalwege in Richtung der Effektoren (*Osmosignaling*) (Häussinger & Schliess, 1999; Weiergräber & Häussinger, 2000; Schliess & Häussinger, 2007; Schliess et al., 2007). Es wurde bereits eine Vielzahl an zellulären Signaltransduktionskomponenten charakterisiert, die durch anisotomisch herbeigeführte Zellvolumenänderungen aktiviert oder inhibiert werden (Häussinger & Schliess., 1999; Schliess & Häussinger, 2007). Die Integration des „Osmo-Signalweges“ im Kontext der durch Hormone und Substrate ausgelösten Signaltransduktion wird auch deutlich, wenn man betrachtet, dass z.B. Insulin oder Glutamin ihre vollen Wirkungsspektren über zellvolumenabhängig regulierte Signalprozesse entfalten (Häussinger & Lang, 1992; Schliess & Häussinger, 2003; Häussinger & Schliess, 2007)

Der genaue Mechanismus des *Osmosensing* ist noch unverstanden. Neuere Studien zeigen jedoch, dass das Integrinsystem als eines der Haupt-Osmosensoren in Hepatozyten fungiert (Häussinger et al., 2003; vom Dahl et al., 2003; Schliess et al., 2004). Integrine sind eine Familie aus extrazellulären Matrix-Adhäsions Molekülen, die in die Mechanotransduktion und in Wachstumsfaktor-induzierende-Signalwege involviert sind (Aplin et al., 1998). Immunohistochemische Färbungen zeigen in hypoosmotisch perfundierten Rattenlebern eine Aktivierung in Plasmamembran lokalisierten Integrine. Ähnliches zeigt sich wenn die Zellschwellung nicht durch Hypoosmolarität, sondern durch Insulin-induziert wird (Schliess et al., 2004). Integrin-inhibitorische Peptide entkoppeln die Zunahme des Hepatozytenvolumens von Effekten auf Signaltransduktion (MAP-Kinasen-Aktivierung), Metabolismus (Inhibition der autophagischen Proteolyse), volumenregulatorische Ionenflüsse und den hepatobiliären Transport (Häussinger et al., 2003; vom Dahl et al., 2003; Schliess et al., 2004)

Die Rolle der Integrine oder anderer Osmosensoren bezüglich des Zellschrumpfung ist hingegen noch weitgehend ungeklärt. Es ist jedoch beschrieben, dass Hyperosmolarität schnell oxidativen Stress auslöst (Reinehr et al., 2003a,b) mit einer anschließenden Aktivierung von Src-Kinasen und des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptores (*epidermal growth factors receptor*; EGF-R). Hyperosmotische De-

hydratation führt zur Aktivierung und *Clustering* von verschiedenen Rezeptortypen, die möglicherweise essentiell für die Initiation des Osmosignals sind (Rosette & Karin, 1996; Reinehr et al., 2002).

### 1.1.3 Zellhydratation und Leberfunktion

Anfang der 1990-er Jahre wurde das bis heute tragfähige Konzept entwickelt, dass Hydratationsänderungen einen eigenständigen Beitrag zur Regulation des zellulären Metabolismus und der Genexpression leisten (Häussinger & Lang 1991; Häussinger & Lang, 1992; Häussinger, 1996; Schliess & Häussinger et al., 2003). Die hepatische Zellhydratation nimmt einen wichtigen Einfluss auf Protein- und Kohlenhydratmetabolismus, Gallensäure-Transport, Proliferation und Empfindlichkeit der Leber gegen Oxidantien, Hitze und CD95-vermittelte Zytotoxizität (Häussinger et al., 2004).

Hypoosmotisch exponierte Hepatozyten zeigen eine Src-Kinasen vermittelte Aktivierung der MAP-kinasen Erk1/2<sup>MAPK</sup> und p38<sup>MAPK</sup> (vom Dahl et al., 2001b, 2003), welche in der perfundierten Rattenleber für den hypoosmotisch stimulierten Gallensäuretransport wichtig ist (Noé et al., 1996; Kurz et al., 2001; Häussinger et al., 2003). Weiterhin gibt es eine enge Korrelation zwischen autophagischer Proteolyse und dem hepatozellulären Hydratationsstatus (vom Dahl & Häussinger, 1996). Ein Anstieg der Zellhydratation um 1%, z.B. durch Insulin oder Hypoosmolarität, verursacht eine ca. 2%ige Inhibition der Proteolyse (vom Dahl et al., 1995; Häussinger et al., 2004).

Hyperosmolarität *per se* stimuliert die Glykogenolyse und die autophagische Proteolyse und inhibiert gleichzeitig die Glykogensynthese und die Proteinsynthese (Häussinger & Lang, 1991; Häussinger, 1996). In der perfundierten Rattenleber konnte gezeigt werden, dass Hyperosmolarität die Insulin-induzierte K<sup>+</sup>-Aufnahme und die Aktivierung der p38<sup>MAPK</sup> verhindert (Schliess et al., 2001). Jedoch wird durch Hyperosmolarität die insulin-induzierte Phosphorylierung des Insulinrezeptors und des Insulinrezeptorsubstrats nicht beeinflusst (Chen et al., 1997; Schliess et al., 2001; Lornejad-Schäfer et al., 2003; Häussinger et al., 2004). Diese Befunde legen nahe, dass eine hyperosmotisch herbeigeführte Dehydratation die Insulin-induzierte Zellschwellung und Proteolysehemmung unterhalb oder auf Ebene der PI 3-Kinase inhibiert. Möglicherweise ist die Inhibition der Insulin-induzierten Zellschwellung ein wesentlicher Mechanismus in der Entwicklung einer Insulinresistenz unter dehydrierenden Bedingungen (Schliess et al., 2001; Häussinger et al., 2004). Eine

zelluläre Dehydratation könnte auch bei der Antagonisierung von Insulineffekten durch Glukagon, Harnstoff und reaktive Sauerstoffspezies in Hepatozyten von Bedeutung sein (vom Dahl et al., 1991b; Saha et al., 1993; Häussinger et al., 2004).

## 1.2 Zellhydratation und mTOR-Signalweg

### 1.2.1 mTOR-Signalweg

Das *mammalian Target of Rapamycin* (mTOR) ist eine hoch konservierte Serin/ Threonin-Kinase und wichtiger Teil des gegen Insulin- und Aminosäuren sensitiven Signalnetzwerks. Dem mTOR kommt eine wesentliche Bedeutung in der Regulation von Transkription, Translation und Proteolyse zu (Schliess & Häussinger, 2003; Häussinger et al., 2004; Schliess et al., 2006; Hay & Sonenberg, 2006; Mamane et al., 2006).

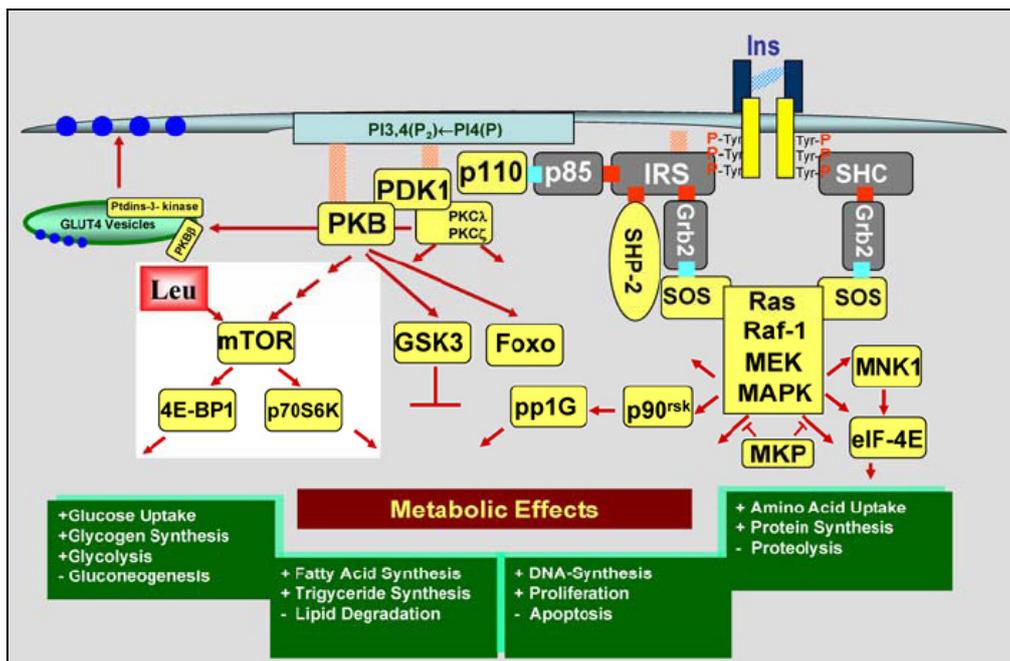


Abb. 1.2: Insulinsignalweg

Das Schema zeigt Teile des Insulinsignaling-Netzwerkes. Insulin und Leucin aktivieren den *mammalian Target of Rapamycin* (mTOR) Signalweg und führen so zu einer Aktivierung der p70 ribosomalen S6 Protein Kinase (p70 S6K) und des an den eukaryotischen Initiationsfaktor 4E bindenden Proteins (4E-BP1). (Nach Schliess & Häussinger, 2003).

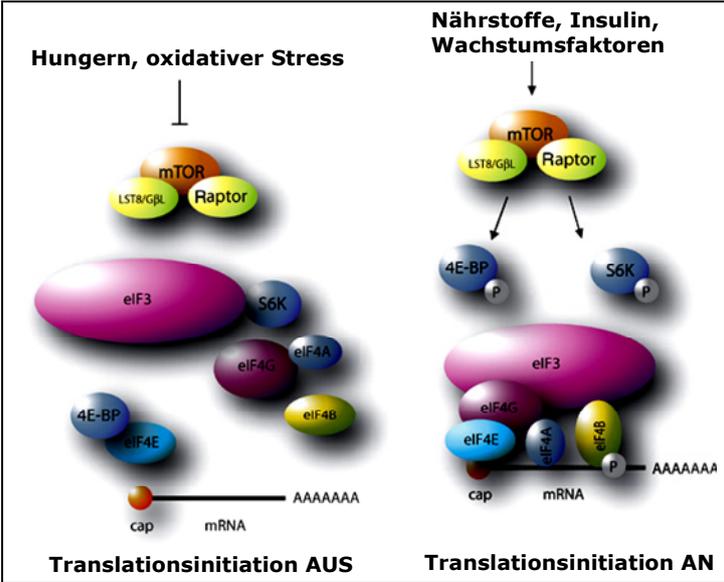
mTOR wird in einer von der PI 3-Kinase abhängigen Weise durch Insulin stimuliert (siehe Abb. 1.2). Insulinsensitive Proteine zwischen der PI 3-Kinase und mTOR sind die Protein Kinase B (PKB), das *Tuberous Sclerosis Complex heterodimer* (TSC1/2) und das zu der Gruppe der GTP-bindenden Proteine gehörende *Ras-homolog-enriched-in-brain* (Rheb). TSC1/2 agiert als ein Rheb-GTPase aktivierendes Enzym (Rheb-GAP) und trägt so zur Inaktivierung des mTOR bei. Insulin inhibiert die Rheb-

GTPase Aktivität durch den TSC1/2-Komplex und erhöht somit das GTP-Rheb/GDP-Rheb Verhältnis, was zu einer Aktivierung von mTOR führt (Raught et al., 2001; Harris & Lawrence, 2003; Avruch et al., 2005). Um eine Bindung und dadurch bedingte Phosphorylierung von Effektoren zu ermöglichen komplexiert mTOR mit Raptor (*regulatory associated protein of mTOR*) und LST8 (*lethal with sec thirteen 8*) (siehe Abb. 1.2; Abb. 1.3) (Harris & Lawrence, 2003; Avruch et al., 2005, Schliess et al., 2006).

Zwei gut charakterisierte Effektoren des mTOR-Signalweges, sind die p70 ribosomale S6 Kinase (p70 S6K) und das an den eukaryotischen Initiationsfaktor 4E bindende Protein (4E-BP)1. Diese Faktoren sind in die Regulation der Translation involviert sowie an der Regulation der Biosynthese von Ribosomen und der autophagischen Proteolyse beteiligt (Dennis et al., 2001; Raught et al., 2001; Rohde et al., 2001).

P70 S6-Kinase vermittelt eine Phosphorylierung des ribosomalen Proteins S6, welches an der 40S Untereinheit des Ribosoms lokalisiert ist. S6 reguliert die Translation von mRNAs die einen 5' TOP-Anhang (*5' terminal Oligopyrimidine tract*) aufweisen. Diese mRNAs kodieren primär für ribosomale Proteine sowie für weitere in der Translationsmaschinerie benötigte Komponenten (Proud, 2004; Schliess et al., 2006). Des Weiteren reguliert die p70 S6-Kinase die Transkription von Genen, deren Produkte in der ribosomalen Biogenese eine Rolle spielen (rRNA, ribosomale Proteine) (Hannan et al., 2003; Hay & Sonenberg, 2004).

Der eukaryotische Initiationsfaktor eIF-4E kann an das Cap-bindende Protein der mRNA binden. Die Cap-Struktur ist eine schützende m<sup>7</sup>GpppN (7-Methylguanositriphosphat, wobei N jedes Nukleotid sein kann) Modifizierung am 5'-Ende jeder zellulären eukaryotischen mRNA und erhöht deren Stabilität (Gingras et al., 1996; Mamane et al., 2006). Unphosphoryliertes 4E-BP1 bindet an eIF-4E und hemmt dadurch dessen Kopplung an die mRNA und den Translations-Initiationskomplex eIF-4F, der zur Initiation der Cap-abhängigen Translation benötigt wird. Der Komplex enthält neben dem eIF-4E noch die ATP-abhängige Helikase eIF-4A sowie das eIF-4G (siehe Abb. 1.3). Durch eine mTOR-abhängige Phosphorylierung des 4E-BP1 löst sich eIF-4E und wird Teil des Initiationskomplex eIF-4F. Es kommt zur Initiation der Cap-abhängigen Translation (siehe Abb. 1.3) (Proud et al., 2004, Mamane et al., 2006).



**Abb. 1.3 mTOR-abhängiger Signalweg zu den Effektoren 4E-BP1 und p70 S6-Kinase**

Eine Aktivierung des mTOR durch z.B. Insulin führt zu einer Phosphorylierung des an den eukaryotischen Initiationsfaktor 4E bindenden Proteins (4E-BP)1. Dies führt zur Freisetzung des eIF-4E, welcher dann Teil des Initiationskomplexes eIF-4F wird, der für die Cap-abhängige Translation benötigt wird. Durch Aktivierung der p70 ribosomalen S6 Kinase (p70 S6K) wird S6 phosphoryliert und löst seine Bindung zum eukaryotischen Initiationsfaktor eIF3, wobei dieser auch Teil des eIF-4F Komplexes wird. Es kommt zu einer Initiation der Cap-abhängigen Translation (Nach Mamane et al., 2006)

Weitere Effektoren des mTORs sind die eukaryotische Elongationsfaktor 2-Kinase (eEF2K), die Glykogensynthase, der Hypoxiafaktor 1α (*Hypoxia Inducible Factor*, HIF 1α), die Protein-Phosphatase 2A (PP2A) und STAT3 (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) (Harris & Lawrence, 2003; Avruch et al., 2005; Schliess et al., 2006).

Die Regulation des mTOR unterliegt, neueren Studien nach zu urteilen, nicht nur dem PI 3Kinase- bzw. PKB-abhängigen Signalweg. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Aktivierung der AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) zu einem abgeschwächten mTOR-Signal führt. Die AMPK ist eine Serin/Threonin Kinase, gilt als Energiesensor und reguliert zelluläre Metabolismen. Eine Aktivierung erfolgt durch ein erhöhten [AMP]/[ATP] Quotienten, AMP bindet an die Kinase, was eine allosterische Konformationsänderung mit sich bringt und zu einer Phosphorylierung der katalytischen Untereinheit führt (Stein et al., 2000). Eine AMPK-Aktivierung verursacht eine Unterdrückung ATP-verbrauchender Prozesse wie die Proteinsynthese und eine Aktivierung ATP-liefernder Prozesse wie der Fettsäureoxidation. Nach neuesten Erkenntnissen nimmt die AMPK direkten Einfluss auf die mTOR-Aktivität. So führt die Aktivierung der AMPK zu einer mTOR-Inhibierung auf noch weitgehend ungeklärte Weise. Jedoch ist bereits eine direkte Inhibierung durch Phosphorylierung des mTOR an der Position Ser<sup>2446</sup> (Violetti et al.,

2006), sowie eine indirekte Inhibierung über Inaktivierung des Tuberins (TSC2) (Towler & Hardie, 2007) durch die AMPK beschrieben worden.

### **1.2.2 mTOR und Aminosäuren**

Um eine vollständige mTOR-Aktivierung durch Insulin zu erreichen bedarf es zusätzlicher Co-Signale, die durch intrazelluläre Aminosäuren generiert werden. Eine besondere Bedeutung kommt hier dem Leucin zu. Das durch Aminosäuren ausgelöste *Signaling* zu mTOR geschieht in einer PI 3-Kinase- und PKB-unabhängigen Weise (van Sluijters et al., 2000). In einer hohen Dosis stimulieren Aminosäuren auch ohne Insulinsignal einer Phosphorylierung der mTOR-Effektoren (Dubbelhuis & Meijer, 2002). Aminosäuren agieren direkt am Carboxylende der katalytischen Domäne des mTORs und verursachen auf eine noch ungeklärte Weise eine Erhöhung der Rheb-Bindung an das Aminonende der katalytischen Domäne des mTOR (Long et al., 2005).

Interessanterweise kann in H4IIE Rattenhepatomzellen eine durch aminosäurefreies Kulturmedium verursachte Depletion an intrazellulären Aminosäuren durch Stimulation der autophagischen Proteolyse kompensiert werden. Wird die autophagischen Proteolyse inhibiert, führt die Verarmung des intrazellulären Pools freier Aminosäuren zu einer Insulinresistenz des mTOR-abhängigen Signalweges (Shigemitsu et al., 1999). Es wurde vermutet, dass es durch Aminosäurearmut zu einer Aktivierung der AMP aktivierten Proteinkinase (AMPK) kommt, wodurch eine mTOR-Inhibierung vermittelt wird (Dubbelhuis & Meijer, 2002).

### **1.2.3 Zelluläre Hydratation und Sensitivität gegen Insulin und Zytokine**

Eine Dehydratation von Zielgeweben des Insulins trägt zur Entwicklung von Insulinresistenz bei. Bei schwer diabetischen Patienten können endokrine und metabolische Entgleisungen zum Teil bereits durch eine adäquate Rehydratation rückgängig gemacht werden. Auch die Sensitivität gegen therapeutisch appliziertes Insulin kann über eine Rehydratation enorm verbessert werden (Page et al., 1974). Umgekehrt führt eine experimentell an gesunden Probanden herbeigeführte systemische Hyperosmolarität zu Insulinresistenz (Bratusch-Marrain & DeFronzo,

1983). Eine hyperosmotisch induzierte Insulinresistenz konnte auch in isolierten Geweben und Zellkulturmodellen beobachtet werden (Komjati et al., 1989).

Einige der durch Hyperosmolarität beeinflussten Komponenten des Insulin-signalweges sind in der Nähe von mTOR lokalisiert. So beruht die hyperosmotisch herbeigeführte Inhibierung der durch Insulin-induzierten Glukoseaufnahme, Glykogensynthese und Lipogenese auf einer hyperosmotischen Inaktivierung der PKB (Meier et al., 1998; Chen et al., 1997). Die hyperosmotische Unterdrückung der PKB Aktivierung führt seinerseits zu einem abgeschwächten Vermögen des Insulins die mTOR-Effektoren p70 S6-Kinase und 4E-BP1 zu aktivieren und so seine positiven Effekte in Richtung der Proteinsynthese und des Zellwachstums zu entfalten (Chen et al., 1997). In H4IIE Rattenhepatomzellen war Hyperosmolarität allerdings ohne Einfluss auf die Insulin-induzierte PKB Phosphorylierung (Lornejad-Schäfer et al., 2003). Dennoch kam es zu einer Beeinträchtigung der p70 S6-Kinasen und 4E-BP1-Phosphorylierung durch Insulin, die mit einer Verzögerung der MAP-Kinasen-Phosphatase 1 (MKP 1) Induktion durch Insulin in Zusammenhang gebracht wurde (Lornejad-Schäfer et al., 2003). Eine nähere Charakterisierung des hyperosmotischen Einflusses auf Signalkomponenten des mTOR-Signalweges in Leberzellen stand allerdings bei Beginn der hier vorgelegten Arbeit noch aus.

Auch durch Zytokine aktivierte Signalwege unterliegen der Beeinflussung durch den zellulären Hydratationszustand. Es konnte gezeigt werden, dass Hyperosmolarität in H4IIE-Zellen einen beschleunigten proteasomalen Abbau des *signal transducer and activator of transcription* (STAT3) verursacht und damit einhergehend Komponenten der Akut-Phase-Antwort auf IL6 und IL22 unterdrückt (Lornejad-Schäfer et al., 2005). In kultivierten Rattenhepatozyten verursacht Hyperosmolarität eine Verminderung der gp130-Expression (Graf et al., 2006).

### **1.3 Zielsetzung**

Eine hepatozelluläre Dehydratation führt zu Katabolie und Insulinresistenz. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, am Modell hyperosmotisch exponierter Hepatomzellen den Einfluss einer Dehydratation auf die Aktivität von Effektoren des mTOR (4E-BP1, p70 S6-Kinase) sowie deren Sensitivität gegen Insulin zu charakterisieren. Darüber hinaus sollten vergleichend Genexpressions-profile von hyperosmotisch und mit Rapamycin behandelten Hepatomzellen aufgenommen werden, um abschätzen zu können, in welchem Ausmaß eine Unterdrückung des mTOR-Signalweges dehydratationsbedingte Genexpressions-änderungen vermittelt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

- Acrylamid 4K-Lösung (30%) Mix 29:1: Applichem, Darmstadt
- Multimark Multi-Colored Standard: Invitrogen, Karlsruhe
- Full Range Rainbow Marker: Amersham, Biosciences, Freiburg
- Bio Rad Protein Assay: BIO RAD, München
- Brij-35: Applichem, Darmstadt
- BSA (Rinderserumalbumin), Fraktion V: Roth, Karlsruhe
- Complete Protease-Inhibitor-Cocktail (Tabletten): Roche, Mannheim
- ECL Western Blotting Detektionssystem: Perkin Elmer Lifesciences, Boston, USA
- Hyperfilm: Amersham, Freiburg
- Filterpapier: Whatman, Maidstone, England
- H<sub>2</sub>DCF-DA (2',7'-Dichlorodihydrofluorescein): Invitrogen, Karlsruhe
- DAF-FM DA (4-Amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate): Invitrogen, Karlsruhe
- SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix UDG: Applied Biosystems, Warrington
- Protran<sup>®</sup> Nitrocellulose Transfer Membrane: Schleicher & Schuell Bioscience, Dassel
- Probenverdünnungspuffer: Onken Laborservice, Gründau
- Papierquadrate aus Filterpapier: Schleicher & Schuell Bioscience, Dassel
- Polyethylenglykol 8000: Applichem, Darmstadt
- SAMS Peptid: Upstate, New York
- Scintillationsflüssigkeit: Perkin Elmer, Boston, USA
- Sojabohnen Trypsin Inhibitor: Applichem, Darmstadt
- Ultra Gaps coated Slides mit Barcode: Corning, New York, USA
- Weitere Chemikalien für das molekulare Labor im höchsten Reinheitsgrad: Merck, Darmstadt; Sigma/Aldrich (Steinheim) MP Biomedicals (Eschwege), Applichem (Darmstadt), Serva (Heidelberg)

#### 2.1.2 Lösungen und Puffer

APS	10	%	(w/v)
RL-Lysispuffer	20	mM	Tris pH 7,4
	140	mM	NaCl
	10	mM	NaF
	10	mM	Natriumpyrophosphat × 10 H <sub>2</sub> O
	0,1	%	Triton X-100
	1	mM	EDTA
	1	mM	EGTA
	1	mM	Natriumorthovanadat
	20	mM	β-Glycerophosphat
10 × TBS (pH 7,6)	200	mM	Tris
	1,5	M	NaCl

1 × TBST	900 ml	dH <sub>2</sub> O
	100 ml	10 × TBS (pH 7,6)
	1 ml	Tween-20
1 × Elektrophoresepuffer	25 mM	Tris
	4 mM	SDS
	250 mM	Glycin
1 × Blottingpuffer	60 %	dH <sub>2</sub> O
	20 %	5 × Blotting Puffer
	20 %	Methanol
2 × SDS Ladungspuffer	60 ml	10 % SDS
	15 ml	dH <sub>2</sub> O
	15 ml	1 M Tris pH 6,8
	30 ml	Glycerol
	20 ml	Bromphenolblau (1 %)
		vor Verwendung 800 µl Puffer + 200 µl 1 M DTT
Blockierungslösung	1 %	(w/v) BSA in TBST
Krebs-Henseleit-Puffer	11 mM	D-Glukose
	1,2 mM	MgSO <sub>4</sub>
	1,2 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	4,7 mM	KCl
	1182 mM	NaCl
	0,5 mM	CaCl <sub>2</sub>
	25 mM	NaHCO <sub>3</sub>
2 x AMPK Lysispuffer	50 mM	Tris pH 7,5
	50 mM	NaF
	1 mM	Sodium Pyrophosphat
	1 mM	EDTA
	1 mM	EGTA
	250 mM	Mannitol
	1 %	Triton X100 (v:v)
1xAMPK Lysispuffer frisch zufügen:	0,2 mM	Orthovanadat
	1 M	DTT
	1 Tabl.	Protease Inhibitor von Roche/10ml
	5 µg/µl	Trypsininhibitor aus Sojabohnen
Resuspendierpuffer	0,2 mM	OrthoVanadat
	100 mM	Tris-HCl pH 7,5
	1 mM	EGTA
	1 mM	EDTA
	1 mM	DTT
	50 mM	Sodium Pyrophosphat
	1 mM	Benzamidine
	4 µg/ml	Trypsininhibitor
	0,02 %	Sodium Acid
	10 %	Glycerol
AMPK Reaktionspuffer	20 mM	Hepes NaOH pH7
	0,4 mM	DTT
	0,01 %	Brij-35
	0,3 mM	AMP

$\gamma$ $^{32}\text{P}$ ATP Mix	10 $\mu\text{l}$	$^{32}\text{P}$ ATP 1mCi/100 $\mu\text{l}$ (3000Ci/mM)
	90 $\mu\text{l}$	ATP Mix Puffer
ATP Mix-Puffer	10 $\mu\text{l}$	750 mM $\text{MgCl}_2$
	10 $\mu\text{l}$	5 mM ATP
	70 $\mu\text{l}$	$\text{dH}_2\text{O}$
SAMS Peptid Arbeitslösung	80 $\mu\text{M}$	SAMS (HMRSAMSGLHLVKRR) Peptid in AMPK Reaktionspuffer

### 2.1.3 Kits

Tab. 2.1.: Überblick über die verwendeten Kits

Kit	Firma, Ort
RNeasy Kit	Qiagen, Hilden
SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems, Weiterstadt
QuantiTect Reverse Transcriptions Kit	Qiagen, Hilden
CyScribe First Strand cDNA Labelling Kit	Amersham, Freiburg
PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden

### 2.1.4 Zellkultur

#### 2.1.4.1 Zelllinien

Tab 2.2.: Übersicht der verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Zelltyp	Anmerkung
H4IIE	Ratten Hepatomzellen	Niwa et al., 1979
Huh7	Humane Hepatomzellen	Nakabayashi et al., 1982

#### 2.1.4.2 Medien und Zusätze

- Basierend auf dem handelsüblichen DMEM F12 (1:1) Medium mit dem Unterschied: 900mg/L Glukose (Ref.nr. 041-95535)  
Invitrogen, Karlsruhe
- Basierend auf dem handelsüblichen DMEM F12 (1:1) Medium mit dem Unterschied: 900mg/L Glukose und w/o NaCl (Ref.nr. 041-95534)  
Invitrogen, Karlsruhe
- DMEM F12 (1:1) Glutamax Medium: Invitrogen, Karlsruhe
- Trypsin EDTA: Invitrogen: Karlsruhe
- Fötale Kälberserum: Biomol, Hamburg

- Dulbeccos-PBS: Invitrogen, Karlsruhe

### 2.1.4.3 In der Zellkultur eingesetzte Substanzen

Sämtliche Antioxidantien, Osmolyte, Inhibitoren oder Aktivatoren die im Rahmen der Zellkulturversuche eingesetzt wurden, entsprachen der höchst zu erwerbenden Reinheit und wurden, wenn nicht aufgelistet, von Sigma/Aldrich (Steinheim), Calbiochem oder Merck (Darmstadt) bezogen.

Selenoprotein P: Eigenherstellung der Biochemie/Molekularbiologie I  
(Dr. rer. nat. H. Steinbrenner)  
myo-Inositol: Biomol, München  
Z-VAD-FMK (Pan Caspase Inhibitor): R&D Systems, Minneapolis, USA  
Z-DEVD-FMK (Caspase-3 Inhibitor): R&D Systems, Minneapolis, USA

### 2.1.5 Antikörper

Alle verwendeten Antikörper, wenn nicht anders aufgelistet, stammen von Cell Signaling (Boston, USA)

Cyklin D1: Santa Cruz, Santa Cruz, USA  
MKP-1 (M18): Santa Cruz, Santa Cruz, USA  
GAPDH: Bioriginal, Sarco, USA  
PKB/ P-PKB: Transduktion Laboratories, New York, USA  
ECL Anti-rabbit IgG: Amersham, Freiburg  
ECL Anti-mouse IgG: Amersham, Freiburg

### 2.1.6 Primer

Die gebrauchsfertigen Primer wurden von Qiagen (Hilden) erworben.

- *Insulin like growth factor binding Protein (Igfbp 1)*; Ratte:  
Rn\_Igfbp1\_1\_SG QuantiTect Primer Assay (200) (QT00190841)
- *Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (Hprt)*; Ratte:  
Rn\_Hprt\_1\_SG QuantiTect Primer Assay (200) (QT00365722)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Kultivierung der Zelllinien

Die H4IIE Rattenhepatomzellen wurden in „Dulbecco´s modified Eagle Medium“ (DMEM) F12 mit 900mg/l Glukose plus 10% fötales Kälberserum (FCS) kultiviert, während die humanen Zelllinie Huh7 in „Dulbecco´s modified Eagle Medium“ (DMEM) F12 mit Glutamax plus 10% fötales Kälberserum (FCS) kultiviert wurden. Die Zelllinien wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> gehalten

Vor den Versuchen wurden die Zellen über Nacht im Kultivierungsmedium, jedoch ohne FCS Zusatz, gehungert, mit dem Ziel die Zellen auf ein Zellzyklusstadium (G0/G1) zu synchronisieren.

Um hyperosmotisches Medium herzustellen wurden 1,66 g NaCl pro 100 ml DMEM F12 (900 mg/L Glukose) w/o NaCl (siehe 2.1.4.2) versetzt und steril filtriert. Durch ein Mischungsverhältnis von 2:3 mit DMEM F12 (900 mg/L Glukose) wurde ein *hyperosmotisches* Medium mit 405 mosmol/L erhalten.

Hypoosmotisches Medium (205 mosmol/l) wurde durch eine 2:3 Mischung des DMEM F12 Mediums (900 mg/L Glukose) w/o NaCl mit DMEM F12 (900 mg/L Glukose) hergestellt.

Die Versuche wurden stets mit FCS-freien Medien durchgeführt.

Bei den Zelllinien die im Glutamax-haltigem Medium kultiviert wurden, wurde die Hyperosmolarität durch Zugabe von 50 mM NaCl mittels einer 5 M Stocklösung eingestellt. Diese Methode der Osmolaritätseinstellung wurde ebenfalls bei den Versuchen der AMPK-Aktivitätsmessung durchgeführt.

### 2.2.2 Proteinanalyse

#### 2.2.2.1 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Zellen wurden in RL-Puffer lysiert und bei 14.000 x g und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand enthält nun das geklärte Lysat, wobei die Konzentrationsbestimmung der Proteine nach Bradford (1976) mit Hilfe des BioRad-Protein-Assays erfolgte. Für die Messung wurden 5 µl Lysat, 795 µl dH<sub>2</sub>O und 200 µl Bradfordreagenz in einer Einwegküvette gemischt und anschließend die Extinktion

bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 595 \text{ nm}$  in einem LKB Biochrom Ultrospec Plus gemessen. Die Proteinmenge wurde durch Multiplikation eines gerätspezifischen-Eichfaktors von 3,8 mit der gemessenen Extinktion in  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  berechnet.

### 2.2.2.2 SDS-Page

Es wurde, wenn nicht anders erwähnt,  $50\mu\text{g}$  Gesamtprotein des Zelllysats mittels der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Zur Vorbereitung der Proben wurden diese mit der gleichen Volumenmenge an 2 x SDS Ladungspuffer (siehe 2.1.2) vermengt und bei  $95^\circ\text{C}$  5 Minuten denaturiert.

Die Proteine wurden elektrophoretisch in einer vertikalen, diskontinuierlichen SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese) nach Lämmli (1970) aufgetrennt. Je nach Größe der aufzutrennenden Proteine variiert man die Prozentigkeit der PAA-Gele (Tab 2.3). Als Größenstandards wurden Rainbow Marker (*Full Range*) (Amersham, Freiburg) und Multimark (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Die Elektrophorese wurde in einer vertikalen Flachgelapparatur mit Elektrophorese-puffer für ca. 3-4 h bei 260 Volt durchgeführt. Nach Ende der Elektrophorese wurde das Trenngel für die Western-Blot-Analyse verwendet (siehe 2.2.2.3).

Tab. 2.3: Zusammensetzung von Polyacrylamidgelen

Trenngel	8 %	10 %	12 %	15 %	Sammelgel	5 %
<b>Acrylamid-Stock</b>	8,0 ml	10,0 ml	12,0 ml	15,0 ml	<b>Acrylamid-Stock</b>	3,4 ml
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	13,9 ml	11,9 ml	9,9 ml	6,9 ml	<b>dH<sub>2</sub>O</b>	13,6 ml
<b>1,5 M Tris (pH 8,8)</b>	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml	<b>1 M Tris (pH 6,8)</b>	2,5 ml
<b>10 % SDS</b>	300 $\mu\text{l}$	300 $\mu\text{l}$	300 $\mu\text{l}$	300 $\mu\text{l}$	<b>10 % SDS</b>	200 $\mu\text{l}$
<b>10 % APS</b>	300 $\mu\text{l}$	300 $\mu\text{l}$	300 $\mu\text{l}$	300 $\mu\text{l}$	<b>10 % APS</b>	200 $\mu\text{l}$
<b>TEMED</b>	12 $\mu\text{l}$	12 $\mu\text{l}$	12 $\mu\text{l}$	12 $\mu\text{l}$	<b>TEMED</b>	20 $\mu\text{l}$

### 2.2.2.3 Western-Blot Analyse

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine im PAA-Gel wurden diese durch die „semi-dry“-Blot-Methode (Kyse-Anderson et al., 1984) auf eine Nitrocellulose-membran (Protran Nitrocellulose Transfer Membrane, Schleicher und Schuell, Dassel) transferiert. Dazu wurde das kontinuierliche Puffersystem nach Bjerrum und Schäfer-Nielsen (1986) verwendet. Die Filterpapiere (Whatman Ltd., Maidstone,

England) zwischen den Graphitelektroden werden dabei mit einem einheitlichen 1 x Blottingpuffer (siehe 2.1.2) getränkt und dienen als Pufferreservoir.

Die Blots wurden wie folgt aufgebaut: Auf die untere Graphitplatte (Anode) der Blotapparatur (Biometra Fast Blot, Göttingen) wurden drei Lagen Filterpapier gelegt. Darauf wurde die Nitrocellulosemembran, das PAA-Gel und schließlich drei weitere Filterpapiere platziert. Den äußeren Abschluss bildete die Kathode der Blotapparatur. Es wurde eine Stromstärke von 1 mA pro cm<sup>2</sup> angelegt. Der Proteintransfer wurde nach einer Transferzeit von 1-2 h beendet.

Bei Proteinen über 100 kDa wurde die Tank Blot Variante des Western Blottings angewandt (Towbin et al., 1979). Hierzu wurde das oben beschriebene Whatmann-filter, Nitrocellulosemembran, SDS Gel Paket in der gleichen Reihenfolge angeordnet, jedoch wurde es nicht von Graphit Platten umhüllt, sondern in eine sog. Quetschkammer eingespannt, die ihrerseits in einen mit 1 x Blottingpuffer (siehe 2.1.2) befüllten Tank, gehängt wurde. Die Transferzeit konnte durch den starken Überfluss des Puffers und einer integrierten Kühlung auf ca. 16 Stunden ausgedehnt werden. Der Transfer wurde bei 400 mA durchgeführt.

#### **2.2.2.4 Immundetektion**

Um freie Bindungsstellen auf der Membran nach erfolgreichem Transfer der Proteine zu blockieren, wurde diese mit einer Blockierungslösung (1% w/vBSA in 1 x TBST) für ca. 15 Minuten schüttelnd bei RT inkubiert. Die Membran wurde nun über Nacht mit dem jeweiligen ersten Antikörper in 1 x TBST (siehe 2.1.2) bei 4°C schüttelnd inkubiert. Nachfolgend wurde die Membran zweimal mit TBST für jeweils 10 min gewaschen und dann mit dem sekundär Antikörper in 1 x TBST bei RT für ca. eine Stunde inkubiert. Danach wurde die Membran wieder zweimal mit 1 x TBST für jeweils 10 Minuten gewaschen, woraufhin der sekundär Antikörper mit Hilfe des ECL-Systems (Perkin Elmer, Boston, USA) detektiert wurde. Die Exposition erfolgte auf einem ECL-Hyperfilm (Amersham, Freiburg).

### 2.2.3 DCF und DAF-FM Messungen

Die Messung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) erfolgte mittels des Fluoreszenzfarbstoffes 2',7'-Dichlorodihydrofluoresceindiazetat (H<sub>2</sub>DCF-DA; Invitrogen, Karlsruhe). Die Messung der Stickstoffradikale erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes 4-Amino-5-Methyamino-2',7'-Difluorofluoreszeindiacetat (DAF-FM; Invitrogen, Karlsruhe). Die Zellen wurden 10 min vor Messbeginn mit 100 µM des membranpermeablen DCF-DA bzw. DAF-FM Farbstoff vorinkubiert. Direkt vor Messbeginn wurden die Zellen mit PBS gewaschen und die Fluoreszenzänderung in einem stehenden Bad aus PBS, bei einer Extinktion von Ex/Em=485/538 über einen Zeitraum von 2-3 Minuten im *Fluoroskan Ascent FL* (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold) gemessen.

### 2.2.4 Bestimmung des intrazellulären Aminosäure-Profiles

Die Zellen wurden nach Inkubation unter den verschiedenen Kulturbedingungen mit eiskaltem PBS so schnell wie möglich gewaschen und mit RL-Puffer lysiert.

Um alle Festbestandteile zu entfernen wurden die Proben 5 Minuten bei 14.000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 10% (v/v) Sulfosalicylsäure-Dihydrat zur Enteiweißung versetzt und die gefällten Proteine pelletiert (5 min, 10.000 x g, RT). Der Überstand wurde nun mit dem gleichen Volumenanteil an Probenverdünnungspuffer (Onken Laborservice; Gündau) vermengt, auf den Aminosäureanalysator (Biotronik LC 3000 von Eppendorf, Maintal) nach Herstellerprotokoll aufgetragen und automatisch von dem Gerät quantifiziert.

Die erhaltenen Konzentrationen (µmol/L) wurden auf die vorher bestimmte Gesamtproteinmenge (µg/µl) bezogen und auf die unter normoosmotischen Bedingungen erhaltenen Konzentrationen normiert.

### 2.2.5 AMPK-Aktivitäts Assay

Nach Versuchsdurchführung wurden die Kulturschalen auf Eis gelegt und die Zellen mit eiskaltem PBS schnellst möglich gewaschen. Die Zellen wurden mit 400 µl Lysispuffer lysiert und durch eine 20 minütige Zentrifugation bei 14.000 x g, 4°C aufgereinigt. Der Überstand wurde bei -80°C verwahrt.

Nachfolgend wurde die AMPK durch eine Polyethylenglykol (PEG) Aufreinigung angereichert. Dazu wurden zu dem Zelllysat 2,5% PEG8000 zugefügt und 10 Minuten schüttelnd bei RT inkubiert. Die ausgefallene Fraktion wurde mittels einer Zentrifugation (10min, 10.000 x g, 4°C) pelletiert, wobei das Pellet verworfen wurde. Zum Überstand wurden nun 6% PEG8000 zugefügt und erneut 10 min schüttelnd bei RT inkubiert. Durch eine erneute Zentrifugation (10min, 10.000 x g, 4°C) wurde die ausgefallene Fraktion pelletiert und diesmal der Überstand verworfen. Das Pellet wurde nun in 10-30 µl Resuspendierpuffer (siehe 2.1.2) aufgenommen. Anschließend wurde die Proteinkonzentration nach Bradford (siehe 2.2.2.1) bestimmt.

Um die Aktivität der AMPK zu messen, wurde ein radioaktiver Assay angewandt. Dazu wurden jeweils 25 µg Protein mit Resuspendierpuffer auf ein Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt und diese nach folgendem Schema eingesetzt.

Mix pro Probe:

10	µl	AMPK Reaktionspuffer (siehe 2.1.2)
10	µl	80µM SAMS Peptid-Arbeitslösung (siehe 2.1.2)
10	µl	Aufgereinigtes Lysat (25µg)
10	µl	$\gamma$ <sup>32</sup> P ATP Mix (siehe 2.1.2)

Die Ansätze wurden nun bei 30°C für 10 min inkubiert und nachfolgend jeweils 35 µl auf 1cm<sup>2</sup> große Filterpapierquadrat (Schleicher & Schuell, Dassel) gespottet. Die Papierquadrate wurden mindestens 10 Minuten getrocknet, bevor sie dreimal mit 0,75% Phosphorsäure für jeweils 20 Minuten und einmal mit Aceton für 30 Minuten gewaschen wurden. Nachfolgend wurden die Papierquadrate erneut getrocknet, in 5 ml Szintillationsflüssigkeit gegeben und in einem *Gamma-Counter* (2000CA *TriCarb Liquid Scintillations Analyzer*; United Packard) die *Counts per minute* (CPM) gemessen.

Die erhaltenen Werte wurden auf einen unter normoosmotischen Bedingung erhaltenen Kontrollwertes normiert.

## 2.2.6 Reverse Transkription und quantitative Real-Time PCR

Die Gesamt-RNA wurde über RNeasy Säulen (Qiagen, Hilden) nach Herstellerprotokoll aufgereinigt.

Änderungen des Igfbp 1 mRNA-Expressionsniveaus in H4IIE wurden mit Hilfe der quantitativen *Real-Time* PCR (RT-PCR) ermittelt. Die mRNA wurde dazu in einem

ersten, separaten Schritt in cDNA umgeschrieben. Für die Reverse Transkription wurde das *QuantiTect Reverse Transcriptions Kit* (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Die Analyse der Genexpression wurde mittels RT-PCR (ABI 7500 Real Time PCR System) durchgeführt. Der PCR-Ansatz wurde mit *SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Warrington GB) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur Standardisierung der relativen mRNA-Spiegel wurde die endogene Kontrolle Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (Hprt) verwendet. Die verwendeten Oligonukleotide sind dem Abschnitt 2.1.6 zu entnehmen.

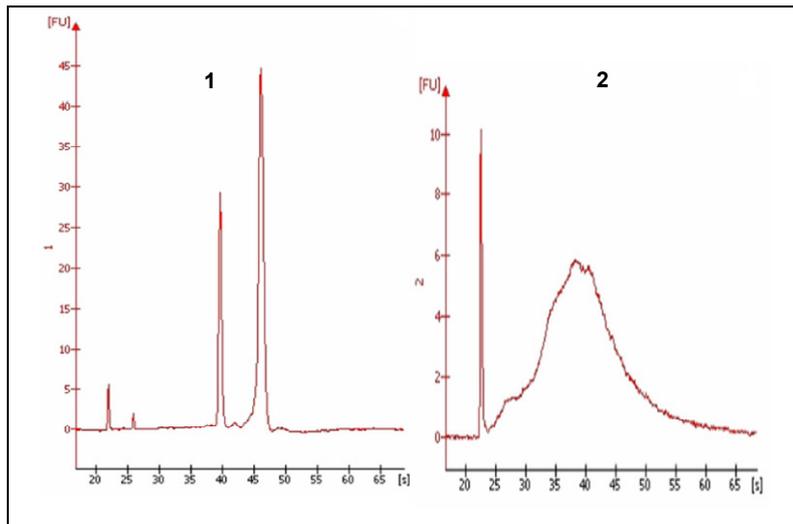
Die PCR-Zyklen wurden wie folgt gewählt: 2 min 50°C, 10 min 95°C, danach folgten 40 Zyklen mit 15 Sek. bei 95°C und 1 min bei 60°C.

Die amplifizierte DNA wurde im Anschluss an die PCR über die Erstellung einer Schmelzkurve überprüft.

## **2.2.7 DNA Mikroarray Hybridisierung**

### **2.2.7.1 RNA-Isolierung und cDNA Synthese**

Die Gesamt-RNA wurde über RNeasy Säulen (Qiagen, Hilden) nach Herstellerprotokoll aufgereinigt. Die RNA Menge und Qualität wurde sowohl spektroskopisch (Absorption bei 220 – 350 nm) gemessen als auch nach Herstellerprotokoll durch Kapillarelektrophorese (Bioanalyzer, Agilent Technologies, Palo Alto, USA) kontrolliert. Das Ergebnis wurde als Elektropherogramm dargestellt, aus dem die Größe der RNA abgelesen werden kann (Abb. 2.1). Die Synthese der Fluoreszenz-markierten cDNA wurde mittels des CyScribe-Kits (Amersham, Freiburg) mit markierten Cy3-dUTPs (Perkin Elmer, Boston, USA) gemäß dem Herstellerprotokoll mit 50 µg der präparierten RNA durchgeführt. Überschüssiger Farbstoff wurde durch nachfolgende Aufreinigung mit QIAquick PCR Säulen (Qiagen, Hilden) entfernt.



**Abb. 4: Elektropherogramme. (1) RNA-Analyse:** Total-RNA-Probe mit guter Qualität bei der die 18s rRNA als kleinerer und die 28s rRNA als größerer Peak zu erkennen ist. **(2) Amplifizierte RNA:** Bei der amplifizierten RNA handelt es sich um eine homogene Verteilung unterschiedlich langer RNA-Fragmente. Die Größe variiert und liegt im Mittel bei etwa 1500 Basen.

### 2.2.7.2 Array Analyse

Die Fluoreszenz markierten cDNAs wurden in 220 µl Hybridisierung-Puffer (5 x SSC, 4 x Denhardts-Lösung, 200mM Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub>, 0,05% SDS, 50% Formamide, pH8) gelöst. Daraufhin wurde die DNA bei 95°C für 10 min denaturiert und in eine ASP Hybridisierungsstation (Amersham, Freiburg) injiziert. Das ASP verfährt nach folgendem Programm: 1h Vorhybridisierung, 12 h Hybridisierung bei 42°C in Hybridisierungs-Puffer, 60 Sek bei 30°C waschen in 2 x SSC / 0,05% SDS und zweimal für jeweils 60 Sek mit 2 x SSC waschen.

Die hybridisierten Oligonukleotide wurden anhand eines Fuji FLA 8000-Scanners (Raytest, Straubenhardt) mit den folgenden Parametern visualisiert:

Anregung 532 nm, Emissionsfilter 570 nm, Auflösung 10 µm, Scangeschwindigkeit 200 mm/s, Photomultiplier-Spannung 100%.

Die gescannten Bilder wurden mit dem AIDA Array Analyzer (Raytest, Straubenhardt) analysiert. Die Fluoreszenzintensitäten jedes Spots wurden integriert und die Hintergrundintensität subtrahiert. Die erhaltenen Werte wurden für die Normalisierungsannäherung verwendet.

### 2.2.8 Statistische Auswertung

Die densitometrischen Auswertungen der Western Blots erfolgten unter Anwendung des *Scion Image* Analyse-Programms.

Änderungen der 4E-BP1-Phosphorylierung wurden durch Vergleich der Quotienten zwischen den Intensitäten von  $\gamma$  und  $\alpha$  Bande festgestellt. Dabei wurden die unter hyperosmotischen Bedingungen erhaltenen Quotienten auf die unter der jeweiligen normoosmotischen Kontrollbedingung gefundenen 4E-BP1-Phosphorylierung normiert.

Von allen anderen Proteinen wurden die Änderungen der Phosphorylierung auf die Gesamtexpression des Proteins normiert. Die unter normoosmotischen Bedingungen erhaltene Phosphorylierung wurde dabei gleich eins gesetzt.

Insgesamt wurden alle Ergebnisse als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M (Standardabweichung vom Mittelwert) von  $n \geq 3$  dargestellt. Für die statistische Analyse wurde der Student-t-Test durchgeführt. p-Werte unter 0,05 wurden als signifikant angesehen.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Charakterisierung der Osmosensitivität der 4E-BP1-Phosphorylierung

Der zelluläre Hydratationszustand beeinflusst wesentlich die Wirkung von Insulin. So kann eine Dehydratation der Leberzelle eine Insulinresistenz bewirken (vom Dahl et al., 1991, Schliess et al., 2001; Schliess & Häussinger, 2003). Der *Crosstalk* zwischen dehydratationsbedingten Signalen, wie sie durch Hyperosmolarität verursacht werden, mit insulinsensitiven Signalen soll anhand der im Folgenden beschriebenen Experiment am Beispiel mTOR-vermittelter Signale untersucht werden. Da die Bestimmung der mTOR-Aktivität aufgrund der Dissoziation mTOR-assoziiierter Proteine bei der mTOR Immunopräzipitation *per se* mit einem Verlust der mTOR-Aktivität einhergeht (Raught et al., 2001), konzentrierte sich die vorgelegte Arbeit auf Phosphorylierungsänderungen der mTOR-Effektoren 4E-BP1 und p70 S6-Kinase.

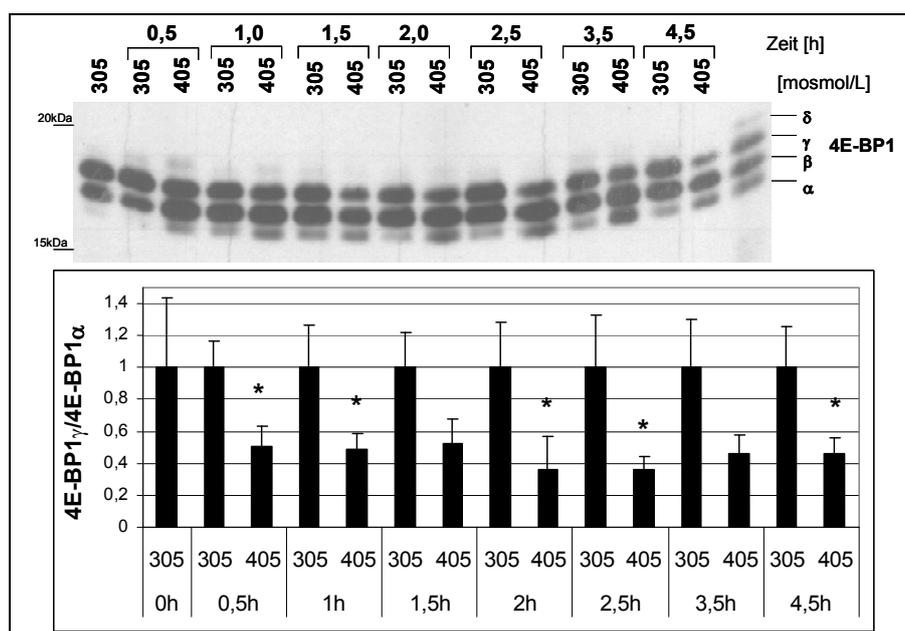
#### 3.1.1 Einfluss hyperosmotischer Dehydratation auf die 4E-BP1-Phosphorylierung

Dem *mammalian target of Rapamycin*, mTOR wird eine zentrale Rolle bei der Signaltransduktion des Insulins zugeschrieben. Es reguliert u.a. die Phosphorylierung des an den eukaryotischen Initiationsfaktor 4E bindenden Proteins 4E-BP1 (Gingras et al., 1998; Hay & Sonenberg, 2004). Änderungen des 4E-BP1-Proteins bzw. dessen Phosphorylierungsstadien spiegeln daher Änderungen der mTOR-Aktivität wieder.

Um den Einfluss einer zellulären Dehydratation auf den Phosphorylierungszustand des 4E-BP1 zu untersuchen wurden H4IIE Rattenhepatomzellen über unterschiedliche Zeiträume mit hyperosmotischem (405 mosmol/l), oder normosmotischem (305 mosmol/l, Kontrolle) Medium inkubiert. Es ist bekannt, dass das 4E-BP1-Protein mit steigender Phosphorylierung eine verminderte elektrophoretische Mobilität in der SDS PAGE, d.h. einen *Shift* zu scheinbar höheren Molekulargewichten aufweist, der sich im Western Blot darstellen lässt (Lynch et al., 2000). Die oberste Bande ( $\delta$ -Bande) stellt die am stärksten phosphorylierte Form des Proteins

dar, während die unterste Bande ( $\alpha$ -Bande) die unphosphorylierte Form repräsentiert (Abb. 3.1).

Wie die Abb. 3.1 zeigt, induzierte eine hyperosmotische Exposition der H4IIE-Zellen eine verminderte 4E-BP1-Phosphorylierung, was an einer Abschwächung der  $\gamma$ -Bande bei zugleich verstärkter Ausprägung der  $\alpha$  Bande erkennbar ist. Die Quantifizierungen der 4E-BP1 Immunreaktivitäten im Western Blot zeigte eine signifikant verminderte 4E-BP1-Phosphorylierung bereits nach 30 min, die über mindestens 4,5 h anhielt (Abb. 3.1 unten).



**Abb. 3.1: Hyperosmolarität führt zu einer verminderten 4E-BP1-Phosphorylierung in H4IIE Zellen: Zeitverlauf**

H4IIE Rattenheptomzellen wurden mit normosmotischem (305 mosmol/L) bzw. hyperosmotischem (405 mosmol/L) Medium über die angegebenen Zeiträume inkubiert. Änderungen der Phosphorylierungszustände des 4E-BP1 wurden durch Inkubation von Western Blots mit einem 4E-BP1-spezifischen Antikörper analysiert und die Änderungen der Intensitäten der 4E-BP1  $\gamma$  und  $\alpha$  Banden densitometrisch ausgewertet und graphisch dargestellt. Als Übersicht aller möglichen 4E-BP1-Phosphorylierungszustände wurde (ganz rechts im Blot) das Lysat einer mit Leucin perfundierten Rattenleber aufgetragen.

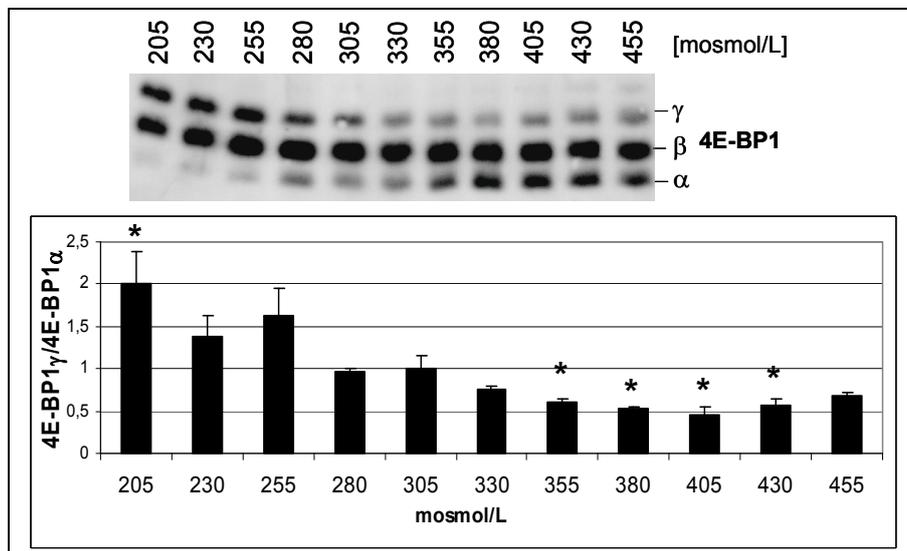
(Mittelwerte  $\pm$  SEM; n = 7; \*, durch Hyperosmolarität signifikant (p  $\leq$  0,05) verminderte 4E-B1 Phosphorylierung)

### 3.1.2 Osmolaritätsabhängigkeit der 4E-BP1-Phosphorylierung

Um die Osmolaritätsabhängigkeit der 4E-BP1-Phosphorylierung zu überprüfen, wurden H4IIE Zellen mit Medien mit ansteigender Osmolarität (205 mosmol/L bis 455 mosmol/L) inkubiert, wobei die Osmolarität in 25 mosmol/L Schritten erhöht wurde.

Die Western Blot Analyse (Abb. 3.2) ergab einen signifikanten Anstieg der 4E-BP1-Phosphorylierung unter hypoosmotischen Bedingungen (205 mosmol/L) im Vergleich

zu der unter normoosmotischen Bedingung (305 mosmol/L) erhaltenen. Bereits bei einer Hyperosmolarität von 355 mosmol/L konnte eine signifikante Abnahme der 4E-BP1-Phosphorylierung nachgewiesen werden, deren Ausmaß ähnlich der von höheren Osmolaritäten (bis zu 430 mosmol/L) verursachten Phosphorylierungsabnahme war (Abb. 3.2).



**Abb. 3.2: Osmolaritätsabhängigkeit der 4E-BP1-Phosphorylierung in H4IIE-Zellen**

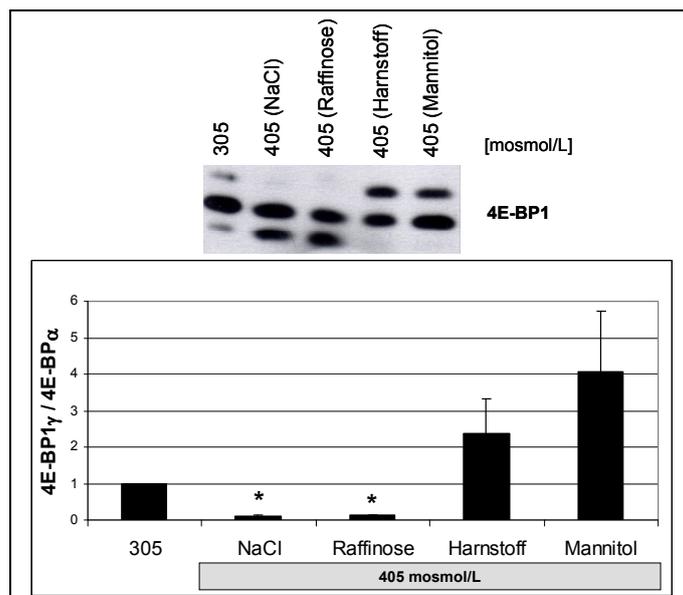
H4IIE Rattenhepatomzellen wurden in Medien der angegebenen Osmolaritäten für 2,5 h inkubiert. Die 4E-BP1-Phosphorylierungszustände wurden mittels Western Blot visualisiert und die Änderung der 4E-BP1-Phosphorylierung densitometrisch verfolgt und auf die Phosphorylierung der unter der normoosmotischen Kontrollbedingung (305 mosmol/L) erhaltenen normiert.

(Mittelwerte  $\pm$  SEM; n = 3; \*, Phosphorylierung signifikant verschieden ( $p \leq 0,05$ ) von der unter normoosmotischen Kontrollbedingung (305 mosmol/L) erhaltenen)

### 3.1.3 Einfluss unterschiedlicher Osmolyte auf die 4E-BP1-Phosphorylierung

In den unter 3.1.1 und 3.1.2 beschriebenen Experimenten wurde die Osmolarität der Medien durch Variation der NaCl Konzentration verändert. Um festzustellen ob die hyperosmotisch induzierte Verminderung der 4E-BP1-Phosphorylierung durch eine Erhöhung der Ionenstärke, verursacht durch den Zusatz des NaCl, durch die Erhöhung der Osmolarität *per se* oder durch die Zellschrumpfung herbeiführt wird, wurde im Folgenden die Hyperosmolarität (405 mosmol/L) durch drei alternative Osmolyte nämlich Raffinose (nicht zellpermeabler Osmolyt), Harnstoff (permeabler Osmolyt) und Mannitol (semi-permeabler Osmolyt) eingestellt.

Lediglich Raffinose führte ähnlich wie NaCl zu einer signifikanten Verminderung der 4E-BP1-Phosphorylierung (Abb. 3.3), während Mannitol und Harnstoff keine Abnahme der 4E-BP1-Phosphorylierung erzeugten.



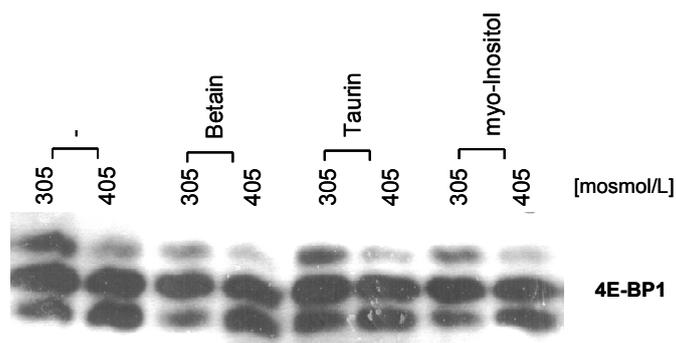
**Abb. 3.3: Rolle der Zellschrumpfung für die hyperosmotisch verminderte 4E-BP1-Phosphorylierung**

H4IIE Rattenhepatomzellen wurden für 2,5 h mit normoosmotischem (305 mosmol/L, Kontrolle) oder hyperosmotischem (405 mosmol/L) Medien inkubiert, bei denen die Osmolarität durch Zugabe von 50 mM NaCl, 100 mM Raffinose (impermeabler Osmolyt), 100 mM Harnstoff (permeabler Osmolyt) oder 100 mM Mannitol (semipermeabler Osmolyt) erhöht wurde. Die 4E-BP1-Phosphorylierungsänderungen wurden mittels Western Blot analysiert und densitometrisch wie im Methodenteil beschrieben quantifiziert und auf die Phosphorylierung der Kontrollbedingung (305 mosmol/L) normiert.

(Mittelwerte  $\pm$  SEM; n = 4; \*, 4E-BP1-Phosphorylierung signifikant ( $p \leq 0,05$ ) verschieden von der unter unter der normoosmotischen Kontrollbedingung erhaltenen)

Kompatible organische Osmolyte schützen Zellen vor unterschiedlichen Stressoren und erlauben eine Adaptation der Zellen an hyperosmotische Bedingungen (Warskulat et al., 1997; Schliess & Häussinger, 2002b). Anhand des nachfolgend beschriebenen Versuchs sollte ermittelt werden, ob die kompatiblen Osmolyte Betain, myo-Inositol und Taurin die hyperosmotische Verminderung der 4E-BP1-Phosphorylierung beeinflussen.

Um eine intrazelluläre Akkumulation der Osmolyte zu ermöglichen (Warskulat et al. 1997) wurden die Zellen über Nacht mit 5 mM des jeweiligen Osmolyten vorinkubiert und dann für weitere 2,5 h mit normoosmotischem (305 mosmol/L) Kontrollmedium oder hyperosmotischem (405 mosmol/L) Medium inkubiert. Abb. 3.4. zeigt, dass keiner der drei verwendeten kompatiblen organischen Osmolyte den hyperosmotischen Effekt auf die 4E-BP1-Phosphorylierung beeinflusst



**Abb. 3.4: Betain, Taurin und myo-Inositol beeinflussen den hyperosmotischen Effekt auf die 4E-BP1-Phosphorylierung nicht**

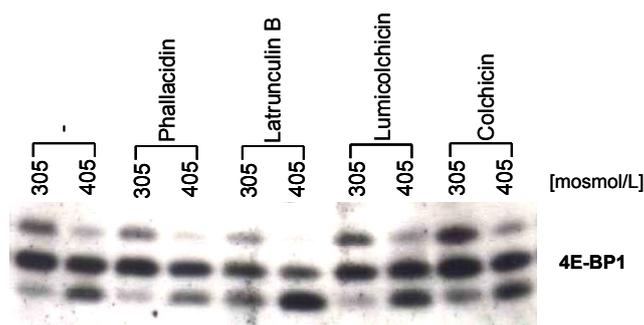
H4IIE Rattenhepatomzellen wurden für 2,5 h mit normoosmotischem (305 mosmol/L) bzw. hyperosmotischem (405 mosmol/L) Medium inkubiert, wobei wie angegeben zusätzlich jeweils 5 mM Betain, Taurin bzw. myo-Inositol zugegeben wurde. Die Zellen wurden bereits über Nacht mit den Osmolyten vorinkubiert. Gezeigt ist ein repräsentativer Blot von 8-10 unabhängigen Versuchen.

## 3.2 Pharmakologische Charakterisierung der hyperosmotisch induzierten Verminderung der 4E-BP1-Phosphorylierung

Mit den nachfolgend beschriebenen Experimenten sollte mittels spezifisch wirkender Inhibitoren an der hyperosmotischen Unterdrückung der 4E-BP1-Phosphorylierung beteiligte Signalelemente identifiziert werden.

### 3.2.1 Beteiligung des Zytoskeletts

Zellvolumenänderungen verursachen Umstrukturierungen der Mikrofilamente und der Mikrotubuli (Theodoropoulos et al., 1992; Häussinger et al., 1994 b), denen eine Bedeutung beim „*Osmosignaling*“ zukommen kann (vom Dahl et al., 2001). Es war daher zu klären, ob das Zytoskelett eine Rolle bei der Vermittlung des hyperosmotischen Effekts auf die 4E-BP1-Phosphorylierung spielt. Deshalb wurde der Effekt verschiedener Modulatoren des Zytoskeletts auf die hyperosmotische Unterdrückung der 4E-BP1-Phosphorylierung untersucht. Zum Einsatz kamen Phalloidin (Stabilisierung des Aktin-Zytoskeletts, Philips et al., 1989), Latrunkulin B (Depolymerisation des Aktinzytoskeletts, Spector et al., 1998), Colchicin (Depolymerisation der Mikrotubuli, Bonfoco et al., 1995) sowie das inaktive Colchicin-Analogon Lumicolchicin. Wie Abb. 3.5 zeigt, vermochte keiner der eingesetzten Inhibitoren die hyperosmotisch reduzierte 4E-BP1-Phosphorylierung zu beeinflussen.



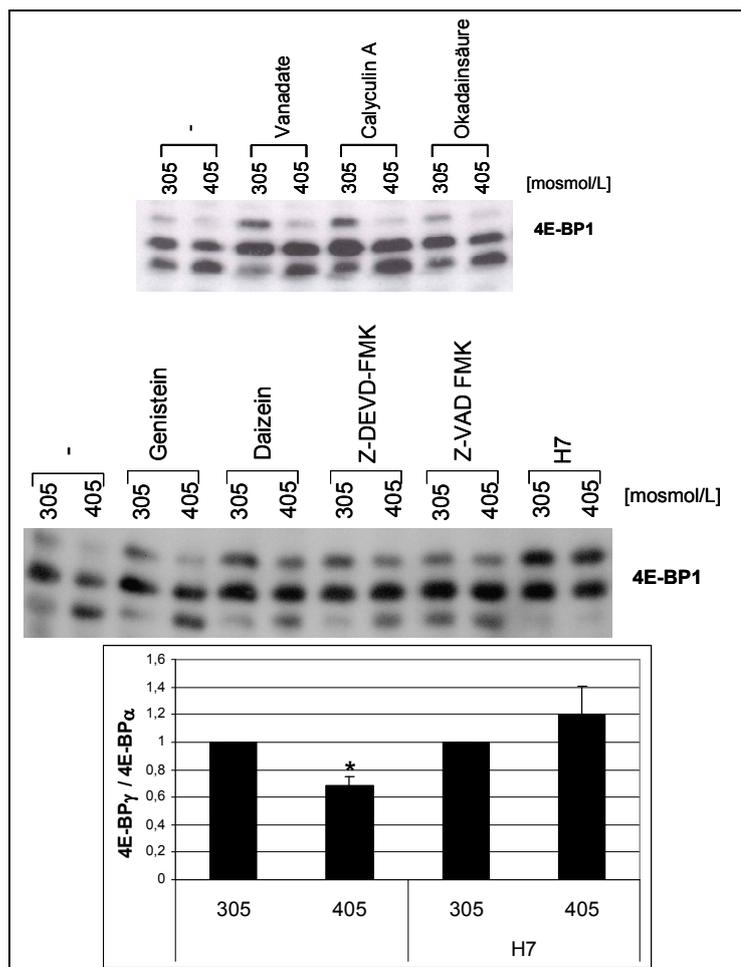
**Abb. 3.5: Keine Beteiligung des Zytoskeletts an der hyperosmotischen Unterdrückung der 4E-BP1-Phosphorylierung**

H4IIE Rattenhepatomzellen wurden über 2,5 h mit normosmotischem (305 mosmol/L) bzw. hyperosmotischem (405 mosmol/L) Medium inkubiert. Die angegebenen Inhibitoren wurden bereits 30 Minuten vor Einstellung der Osmolarität dem Kulturmedium zugesetzt. Es wurden 1  $\mu$ M Phalloidin, 10  $\mu$ M Latrunculin B, 10  $\mu$ M Colchicin sowie 10  $\mu$ M Lumicolchicin eingesetzt. Gezeigt ist eine repräsentative Western Blot Analyse (n=6).

### 3.2.2 Rolle von Phosphatasen und Kinasen

Um zu untersuchen, ob Proteinphosphatasen an der hyperosmotischen Unterdrückung der 4E-BP1-Phosphorylierung beteiligt sind wurden der Tyrosin-Phosphatase-Inhibitor Vanadat (Gordon, 1991; Huyer et al., 1997) und die Serin/Threonin-Phosphataseinhibitoren Calyculin A (Suganuma et al., 1990) und Okadainsäure (Haystead et al., 1989, Hardie et al., 1991) verwendet. Um die Beteiligung von Proteinkinasen abzuschätzen kamen der Tyrosinkinase-Inhibitor Genistein (Abler et al., 1992), das inaktive Analogon Daidzein und der breit wirkende Kinase-Inhibitor H7 (Kawamoto & Hidaka, 1984) zum Einsatz.

Da durch Vanadat, Calyculin A oder Okadainsäure die verringerte hyperosmotische 4E-BP1-Phosphorylierung unbeeinflusst blieb, ist ein zentraler Beitrag von Tyrosin- oder Serin-/Threonin-Phosphatasen unwahrscheinlich (Abb. 3.6, oben). Auch Genistein war ohne Effekt, was die Beteiligung von Tyrosinkinasen unwahrscheinlich macht. Der Proteinkinase-Inhibitor H7 war jedoch in der Lage die hyperosmotisch induzierte Unterdrückung der 4E-BP1-Phosphorylierung aufzuheben (Abb. 3.6, unten).



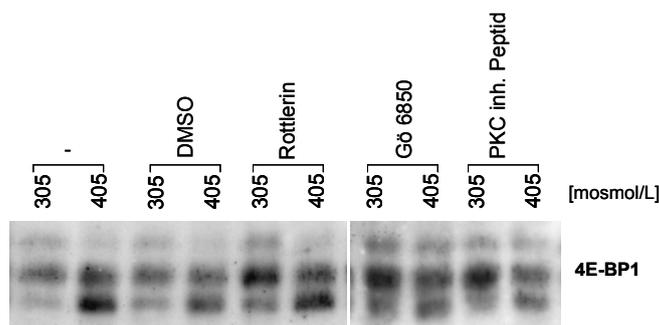
**Abb. 3.6: Rolle von Kinasen, Phosphatasen und Caspasen bei der hyperosmotischen Unterdrückung der 4E-BP1-Phosphorylierung**

H4IIE Rattenhepatomzellen wurden für 2,5 h mit normoosmotischem (305 mosmol/L) bzw. hyperosmotischem (405 mosmol/L) Medium inkubiert. Die angegebenen Inhibitoren wurden bereits 30 Minuten zuvor zugesetzt. Folgende Konzentrationen wurden verwendet. Phosphatase Inhibitoren: 500  $\mu$ M Vanadat, 5 nM Calyculin A, 20 nM Okadainsäure; Kinase-Inhibitoren: 100  $\mu$ M Genestein, 100  $\mu$ M Daizein, 20  $\mu$ M H7; Caspase-Inhibitoren: 20  $\mu$ M Z-DEVD-FMK, 20  $\mu$ M Z-VAD FMK. Gezeigt ist ein repräsentativer Western Blot (n=3-7). Die densitometrische Auswertung zeigte eine H7 vermittelte signifikante Antagonisierung der hyperosmotisch induzierten Unterdrückung der 4E-BP1-Phosphorylierung.

(Mittelwerte  $\pm$  SEM; n = 7; \*, Quotient signifikant verschieden ( $p \leq 0,05$ ) zum normoosmotischen Quotienten)

H7 wird in der Literatur u.a. als Inhibitor der PKC beschrieben (Kawamoto & Hidake, 1984; Quick et al., 1992). Daher wurde durch Verwendung der spezifischer wirkenden PKC-Inhibitoren Rottlerin (Wang et al., 2003), dem PKC $\zeta$ -inhibitorischen Peptid (Standaert et al., 1997) und Gö 6850 (Martiny-Baron et al., 1993) die Rolle der PKC näher untersucht.

Keiner der verwendeten PKC-Inhibitoren konnte den gleichen Effekt erzielen wie H7. Daher scheint der PKC keine signifikante Rolle bei der hyperosmotisch induzierten Verminderung der 4E-BP1-Phosphorylierung zuzukommen.



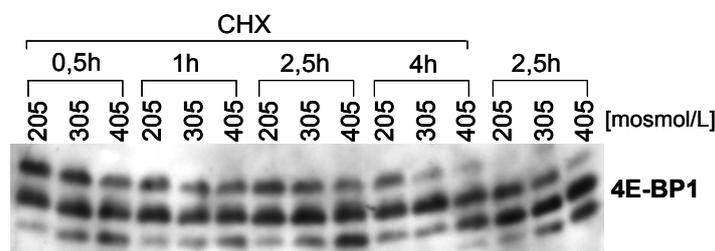
**Abb. 3.7: Keine Beteiligung der PKC an der hyperosmotischen Unterdrückung der 4E-BP1-Phosphorylierung**

H4IIE Rattenhepatomzellen wurden für 2,5 h mit hyperosmotischem (405 mosmol/L) bzw. normoosmotischem (305 mosmol/L) Medium inkubiert. In den gekennzeichneten Proben wurden außerdem 500 nM Rottlerin, 50  $\mu$ M PKC $\zeta$  inhibitorisches Peptid oder 10  $\mu$ M Gö 6850 zugesetzt. Die Inhibitoren wurden 30 Minuten vor Versuchsbeginn mit den Zellen vorinkubiert, wobei das Peptid 2h mit den Zellen vorinkubiert wurde um eine vollständige Aufnahme in die Zellen zu gewährleisten. Als Kontrolle wurden hier 2,5 $\mu$ l DMSO verwendet. Die Proben wurden nachfolgend per Western Blot und eines spezifischen Antiköpers analysiert. Der gezeigte Blot wird repräsentativ gezeigt (n=4-7).

### 3.2.3 Rolle von Proteinsynthese und Proteolyse

Im Anbetracht der dargelegten Befunde ist es denkbar, dass der hyperosmotisch induzierten Verminderung der 4E-BP1-Phosphorylierung ein beschleunigter Abbau des phosphorylierten 4E-BP1 bei gleichzeitiger *de novo* Synthese von nicht phosphoryliertem 4E-BP1 zugrunde liegt.

Um die Beteiligung einer *de novo* 4E-BP1-Synthese an der Osmosensitivität der 4E-BP1-Phosphorylierung zu überprüfen, wurde der Proteinsynthese-Inhibitor Cycloheximid (CHX, Kominek et al., 1975) eingesetzt. H4IIE-Zellen wurden in Gegenwart von CHX hypo- (205 mosmol/L), normo- (305 mosmol/L) oder hyperosmotisch (405 mosmol/L) inkubiert.



**Abb. 3.8: Cycloheximid ist ohne Einfluss auf die Osmosensitivität der 4E-BP1-Phosphorylierung**

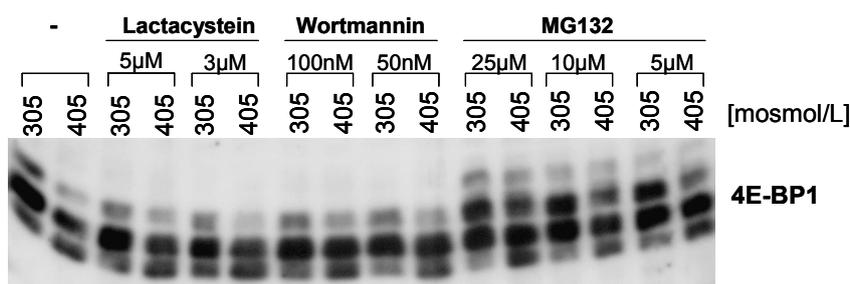
H4IIE Rattenhepatomzellen wurden über die angegebenen Zeitspannen hypo- (205 mosmol/L), normo- (305 mosmol/L) oder hyperosmotisch (405 mosmol/L) in Abwesenheit oder in Gegenwart von 5 mg/ml Cycloheximid (CHX) inkubiert. Gezeigt ist eine repräsentative Western Blot Analyse (n=5).

Wie Abb. 3.8 zeigt blieb die Osmosensitivität der 4E-BP1-Phosphorylierung auch in Gegenwart von CHX erhalten. Interessanterweise führt CHX *per se* zu einer weiteren

Verringerung der elektrophoretischen Mobilität von 4E-BP1 (vgl. die 2,5 h Inkubationen in Abwesenheit und Gegenwart von CHX, Abb. 3.8).

Eine mögliche Rolle des Proteinabbaus wurde mittels Inhibitoren der proteasomalen Proteolyse (Lactacystein, MG132) (Lee & Goldberg, 1998; Cross et al., 1995) sowie der autophagischen Proteolyse (Wortmannin) (Häussinger & Schliess, 1999) untersucht.

Es zeigte sich, dass auch in Gegenwart der Proteolyse-Inhibitoren die 4E-BP1-Phosphorylierung unter hyperosmotischen Bedingungen vermindert wurde (Abb. 3.9).



**Abb. 3.9: Proteolyseinhibitoren sind ohne Einfluss auf die hyperosmotische Beeinträchtigung der 4E-BP1-Phosphorylierung**

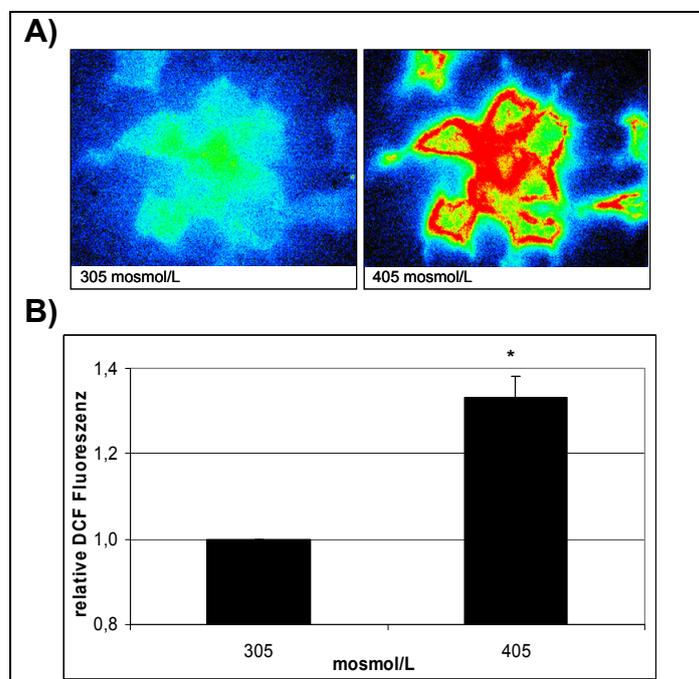
H4IIE-Zellen wurden in normoosmotischem (305 mosmol/L) bzw. hyperosmotischem (405 mosmol/L) Medium inkubiert. Zusätzlich wurden die Zellen mit den angegebenen Inhibitoren inkubiert, wobei diese bereits 30 Minuten zuvor zugefügt wurden. Gezeigt ist eine repräsentative Western Blot-Analyse (n= 5).

Hyperosmolarität erhöht in Hepatozyten (Reinehr et al., 2002) und H4IIE-Zellen (Lornejad-Schäfer et al., 2005) die Aktivität von Caspasen und es wurde berichtet, dass 4E-BP1 in Fibroblasten-Zelllinien der Ratte und der Maus einer Spaltung durch Caspasen unterzogen werden kann (Tee & Proud, 2000). Wie in Abb. 3.6 gezeigt ist, waren die Caspase-Inhibitoren Z-DEVD-FMK (Nicholson et al., 1995) und Z-VAD-FMK (Misaghi et al., 2004) ohne Effekt auf die hyperosmotische Unterdrückung der 4E-BP1-Phosphorylierung, so dass eine Beteiligung von Caspasen nicht in Betracht kommt.

### 3.2.4 Rolle von oxidativem Stress und NO

Hyperosmolarität steigert in primären Hepatozyten die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) (Reinehr et al., 2003). Der beschriebene Effekt von Antioxidantien auf die hyperosmotische Induktion der MKP-1 mRNA-Expression in H4IIE-Zellen (Schliess et al., 1998) ist ein indirekter Hinweis darauf, dass es auch dort unter dem Einfluss von Hyperosmolarität zur Bildung von ROS kommt. Daher wurde der Einfluss von Inhibitoren auf die hyperosmotische Unterdrückung der 4E-BP1-Phosphorylierung betrachtet, die die ROS-Bildung verhindern können.

Eingangs wurde mittels eines spezifischen Fluoreszenzindikators  $H_2DCF\text{-}DA$  (Dichlorodihydrofluorescein Diacetat) (Sanchez et al., 1999) ein hyperosmotisch induzierter signifikanter ROS Anstieg in den verwendeten H4IIE Rattenhepatomzellen nachgewiesen (Abb. 3.10).



**Abb. 3.10: Hyperosmotisch induzierte ROS Bildung**

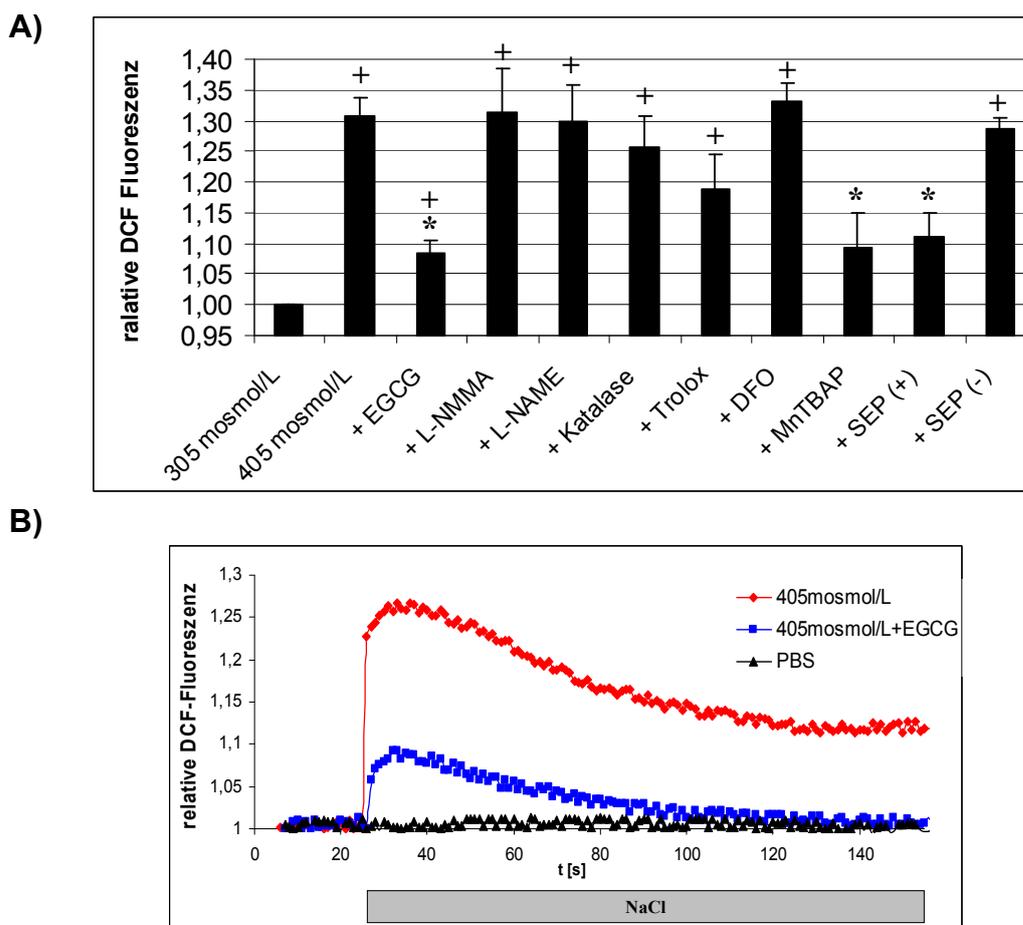
H4IIE Rattenhepatomzellen wurden 10 min mit dem ROS-spezifischen Fluoreszenzindikator  $H_2DCF\text{-}DA$  (Dichlorodihydrofluorescein Diacetat) vorinkubiert. Daraufhin wurde die Osmolarität des Mediums auf 405 mosmol/L erhöht und die relative Fluoreszenzänderung gemessen

**A)** Mikroskopische Durchlichtaufnahme in Falschfarbendarstellung der DCF-beladenen H4IIE Zellen; **links:** ROS Bildung unter normosmotischer (305 mosmol/L) Bedingung; **rechts:** ROS Bildung unter hyperosmotischer (405 mosmol/L) Bedingung.

**B)** Relative Fluoreszenzänderung durch Hyperosmolarität in H4IIE Zellen.

(Mittelwerte  $\pm$  SEM; n = 15; \*, signifikanter ( $p \leq 0,05$ ) Fluoreszenzanstieg durch hyperosmotische Belastung)

In weiteren Versuchen wurde überprüft ob die hyperosmotisch induzierte ROS-Produktion durch verschiedene Antioxidantien zu blockieren ist. Es wurden hier das Flavonoid Epigallocatechin Gallat (EGCG), die NOS-Inhibitoren L-NMMA und L-NAME (Knowles & Moncada, 1994), Katalase, das wasserlösliche Vitamin E-Derivat Trolox, der Eisenchelator Desferoxamin, das metallorganische Mangan Superoxiddismutase Mimetikum MnTBAP (Scabo et al., 1996), Selenoprotein P (SeP) sowie einer SeP Kontrolle verwendet. Das SeP wurde dabei aus dem Kulturüberstand von mit Natrium-Selenit ( $Na_2SeO_3$ ) inkubierten HepG2-Zellen gewonnen, die dadurch zu einer SeP-Expression angeregt wurden und im Kulturüberstand SeP anreicherten. Die Kontrolle stellt einen Kultur-Überstand von HepG2-Zellen dar, die nicht mit Natrium-Selenit inkubiert wurden und daher kein SeP generieren konnten (Steinbrenner et al., 2006a,b).



**Abb. 3.11: Einfluss von Antioxidantien auf die hyperosmotische ROS-Produktion in H4IIE-Zellen**

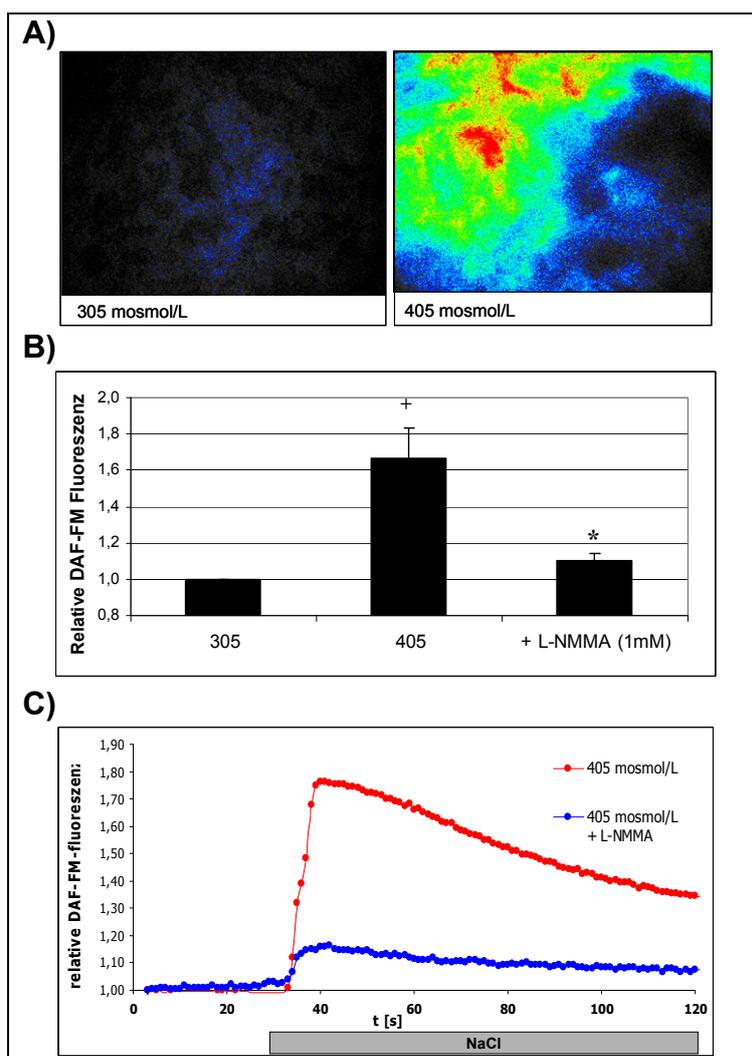
**A)** H4IIE Rattenhepatomzellen wurden 10 min mit dem Fluoreszenzindikator  $H_2DCFDA$  vorinkubiert. Nachfolgend wurde die Zellen in PBS überführt und Hyperosmolarität (405 mosmol/L) durch eine Erhöhung der NaCl-Konzentration eingestellt und die Änderung der Fluoreszenzintensität gemessen. Die Inhibitoren wurden bereits 30 Minuten vor Adjustierung der Osmolarität zugesetzt. Es wurden folgende Konzentrationen eingesetzt: 30  $\mu M$  EGCG, 1 mM L-NMMA, 1 mM L-NAME, 8000 U Katalase, 500  $\mu M$  Trolox, 100  $\mu M$  Desferoxamin (DFO), 40  $\mu M$  MnTBAP, 2 nM Sep/ SeP(-).

(Mittelwerte  $\pm$  SEM;  $n \geq 3$ ; +, signifikanter ( $p \leq 0,05$ ) Fluoreszenzanstieg im Vergleich zur dem unter normo-osmotischer (305 mosmol/L) Kontrolle gefundenen; \*, signifikante Verminderung ( $p \leq 0,05$ ) des hyperosmotisch verursachten Fluoreszenzanstiegs.

**B)** Exemplarische Messkurven der DCF-Fluoreszenz unter dem Einfluss von Hyperosmolarität in Abwesenheit (rot) / Gegenwart (blau) von EGCG bzw. unter normoosmotischer Kontrollbedingungen (schwarz). Aufnahme der Messwerte im Sekundentakt in einem Zeitrahmen von 2,7 min und graphisch als Verlauf aufgetragen.

Die hyperosmotisch bedingte ROS-Induktion konnte signifikant durch EGCG, MnTBAP sowie durch SeP gehemmt werden (Abb. 3.11).

Unter Verwendung eines NO spezifischen Fluoreszenzfarbstoffs, DAF-FM Diacetat (Kojima et al., 1999) konnte außerdem eine signifikante hyperosmotisch induzierte NO Produktion nachgewiesen werden, die durch den NOS-Inhibitor L-NMMA nahezu vollständig blockiert wurde (Abb. 3.12).



**Abb. 3.12 Hyperosmotisch induzierte NO Produktion**

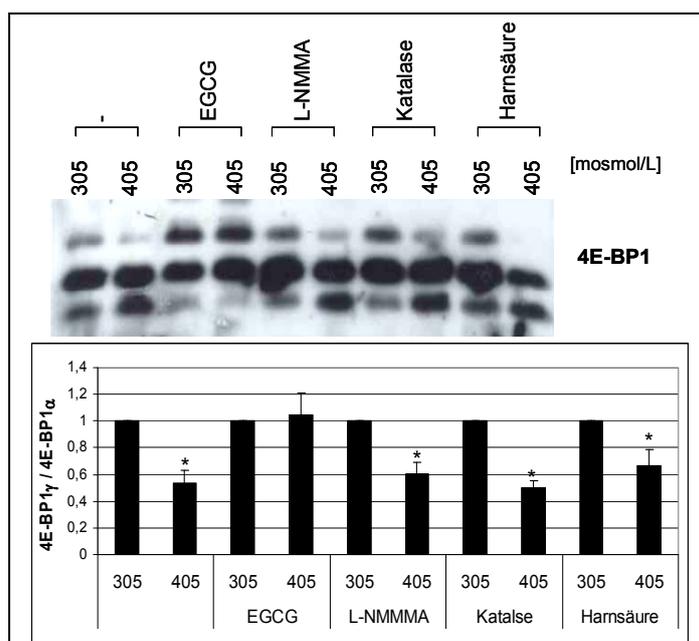
H4IIE Rattenhepatomzellen wurden 10 min mit dem NO spezifischen DAF-FM Farbstoff vorinkubiert. Durch Zugabe von 50 mM NaCl wurde die Hyperosmolarität eingestellt und die relative Fluoreszenzänderung gemessen. 1 mM L-NMMA wurde als Breitbandinhibitor der NO-Synthase verwendet und dient hier dem spezifischen NO Nachweis. Der Inhibitor wurde 30 Minuten vor Versuchsbeginn mit den Zellen vorinkubiert.

**A)** mikroskopische Durchlichtaufnahme in Falschfarbendarstellung der DAF-FM inkubierten H4IIE-Zellen; **links:** NO Bildung unter normoosmotischer (305 mosmol/L) Bedingung; **rechts:** NO Bildung unter hyperosmotischer (405 mosmol/L) Bedingungen.

**B)** Relative Fluoreszenzänderung durch hyperosmotisch induzierte NO Produktion in H4IIE-Zellen. (Mittelwerte  $\pm$  SEM; n = 3; +, signifikant verschiedener ( $p \leq 0,05$ ) Fluoreszenzanstieg im Vergleich zum normoosmotisch verursachten; \*, signifikant verschiedener ( $p \leq 0,05$ ) Fluoreszenzanstieg im Vergleich zum hyperosmotisch verursachten;)

**c)** exemplarischer Verlauf der hyperosmotisch induzierten NO Entwicklung in Ab- (rot) und Anwesenheit (blau) von L-NMMA Zugabe. Aufnahme der Messwerte im Sekundentakt in einem Zeitrahmen von 2,7 min und graphisch als Verlauf aufgetragen.

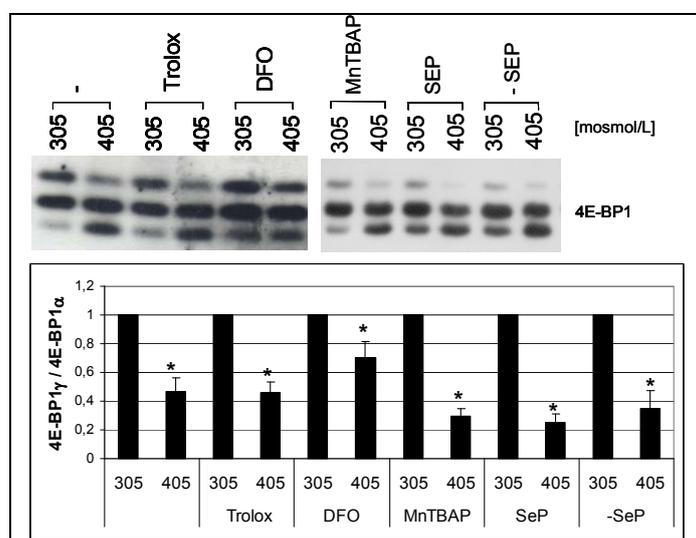
In weiteren Experimenten wurde der Effekt verschiedener Antioxidantien und des NOS-Hemmstoffs L-NMMA auf die hyperosmotische Unterdrückung der 4E-BP1-Phosphorylierung untersucht.



**Abb. 3.13: Effekt von Antioxidantien auf die hyperosmotisch induzierte Verminderung der 4E-BP1-Phosphorylierung (I)**

H4IIE Rattenhepatomzellen wurden für 2,5 h mit normoosmotischem (305 mosmol/L) bzw. hyperosmotischem (405 mosmol/L) Medium inkubiert. Die Medien wurden wie angegeben zusätzlich mit verschiedenen Antioxidantien versetzt. Diese wurden bereits 30 Minuten zuvor zugesetzt. Es wurden 30  $\mu$ M EGCG, 1 mM L-NMMA, 8000 Units Katalase und 200  $\mu$ M Harnsäure verwendet. Die Phosphorylierungszustände des 4E-BP1 wurden im Western Blot visualisiert und die 4E-BP1-Phosphorylierung wie im Methodenteil beschrieben densitometrisch quantifiziert.

(Mittelwerte  $\pm$  SEM; n = 4-8; \*, 4E-BP1-Phosphorylierung signifikant ( $p \leq 0,05$ ) unterschiedlich zu der unter der jeweiligen normoosmotischen Kontrollbedingung erhaltenen).



**Abb. 3.14: Effekt von Antioxidantien auf die hyperosmotisch induzierte Verminderung der 4E-BP1-Phosphorylierung (II)**

H4IIE Rattenhepatomzellen wurden für 2,5 h mit normoosmotischem (305 mosmol/L) bzw. hyperosmotischem (405 mosmol/L) Medium inkubiert. Die Medien wurden wie angegeben zusätzlich mit verschiedenen Antioxidantien versetzt. Diese wurden bereits 30 Minuten zuvor zugesetzt. Es wurden 500  $\mu$ M Trolox, 100  $\mu$ M Desferoxamin (DFO), 40  $\mu$ M MnTBAP, 2 nM Selenoprotein P (SeP)/ SeP Kontrolle (-SeP) eingesetzt.

Die Proben wurden nachfolgend mittels eines Western Blots und eines spezifischen Antikörpers auf die 4E-BP1-Phosphorylierung untersucht und densitometrisch wie im Methodenteil beschrieben quantifiziert.

(Mittelwerte  $\pm$  SEM; n = 4-6; \*, 4E-BP1-Phosphorylierung signifikant ( $p \leq 0,05$ ) unterschiedlich zu der unter der jeweiligen normoosmotischen Kontrollbedingung erhaltenen)

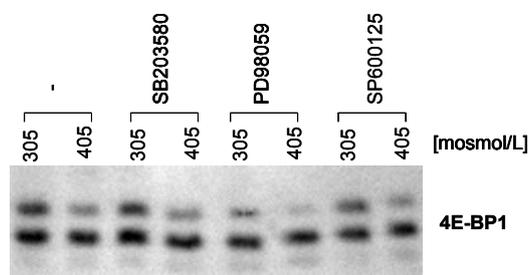
Es stellte sich heraus, dass lediglich EGCG eine signifikante Inhibierung der hyperosmotisch induzierten Verminderung der 4E-BP1-Phosphorylierung mit sich brachte (Abb. 3.13). Alle anderen verwendeten Inhibitoren einschließlich MnTBAP, SeP und L-NMMA, deren antioxidative bzw. NOS-hemmende Wirkung in H4IIE-Zellen gezeigt wurde (Abb. 3.11 und 3.12) ließen den hyperosmotischen Effekt auf die 4E-BP1-Phosphorylierung unbeeinflusst (Abb. 3.13-14).

### 3.3 Einfluss von Epigallocatechin Gallat auf die 4E-BP1-Phosphorylierung

In Abschnitt 3.2.4 konnte gezeigt werden, dass EGCG als einziges der verwendeten Antioxidanten in der Lage war die hyperosmotische Unterdrückung der 4E-BP1-Phosphorylierung zu inhibieren. Es ist daher denkbar, dass der Effekt des EGCG auf die 4E-BP1-Phosphorylierung nicht auf seiner antioxidativen Wirkung beruht. Daher sollte die Wirkungsweise des EGCGs näher charakterisiert werden.

#### 3.3.1 EGCG als p38 MAPK Inhibitor?

EGCG wird in der Literatur als Inhibitor des p38<sup>MAPK</sup> Signalwegs beschrieben (Bain et al., 2003). Mittels spezifischer Inhibitoren der MAP-Kinasen-Signalwege, nämlich SB 203580 (Inhibitor der p38<sup>MAPK</sup>), PD 98059 (Inhibitor der MAP-Kinase-Kinase oberhalb von ERK-1/2) sowie SP 600125 (Inhibitor der JNKs) sollte eine mögliche Beteiligung der MAPK an der hyperosmotischen Unterdrückung der 4E-BP1-Phosphorylierung charakterisiert werden.



**Abb. 3.15: Ausschluss der Beteiligung von MAP-Kinasen an der hyperosmotisch verminderten 4E-BP1-Phosphorylierung**

H4IIE Rattenhepatomzellen wurden für 2,5 h mit hyperosmotischem (405 mosmol/L) bzw. normoosmotischem (305 mosmol/L) Medium inkubiert. 30 Minuten zuvor wurden die Inhibitoren zugesetzt. Es wurden hier 20  $\mu$ M SB203580 (p38 Inhibitor), 20  $\mu$ M PD98059 (MEK Inhibitor) bzw. 50  $\mu$ M SP600125 (JNK Inhibitor) zugefügt. Eine repräsentative Western Blot-Analyse ist gezeigt (n=7).

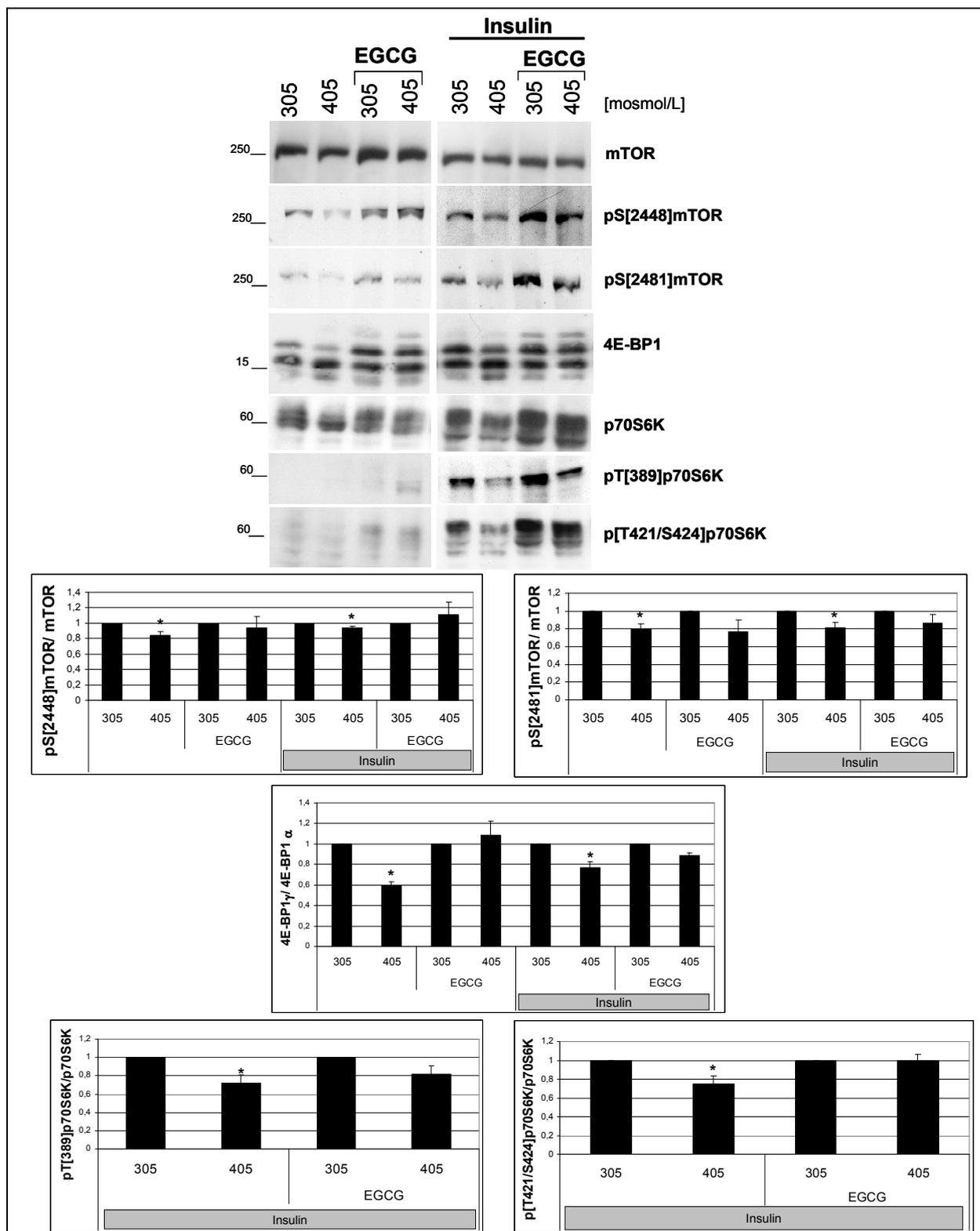
Es stellte sich heraus, dass keiner der verwendeten Inhibitoren die hyperosmotisch verursachte Unterdrückung der 4E-BP1-Phosphorylierung verhindern konnte, weswegen MAP-Kinasen keine wesentliche Rolle bei der Vermittlung des hyperosmotischen Effekts auf die 4E-BP1-Phosphorylierung spielen (Abb. 3.15).

### 3.3.2 Effekt des EGCG auf Komponenten des mTOR-Signalweges

Im Folgenden sollte die Sensitivität von Komponenten des mTOR-Signalweges gegen Hyperosmolarität untersucht werden sowie deren Beeinflussung durch EGCG. Dazu wurden H4IIE-Zellen mit EGCG normo- und hyperosmotisch exponiert, wobei die Untersuchungen hierzu zusätzlich auch an mit Insulin stimulierten Zellen durchgeführt wurden. (Abb. 3.16).

Die Quantifizierung der Phosphorylierung von mTOR an Ser<sup>2448</sup> und Ser<sup>2481</sup>, die für eine mTOR-Aktivierung relevant ist (Reynolds et al., 2002; Navé et al., 1999; Peterson et al., 2000) zeigt, dass sowohl basal als auch in Gegenwart von Insulin unter hyperosmotischen Bedingungen eine signifikant verminderte mTOR-Phosphorylierung auftrat, was durch EGCG *per se* antagonisiert werden konnte (Abb. 3.16). Interessanterweise konnte durch EGCG an Position Ser<sup>2448</sup> zusätzlich eine starke Steigerung der Phosphorylierung induziert werden, welche an der zweiten Position (Ser<sup>2481</sup>) nicht ausgemacht werden konnte.

Dieses Ergebnis zeigte sich ebenfalls auf Ebene des mTOR-Effektors 4E-BP1. Auch hier wurde die hyperosmotisch reduzierte 4E-BP1-Phosphorylierung durch EGCG aufgehoben und zwar in Ab- und Anwesenheit von Insulin (Abb. 3.16). Der zweite betrachtete mTOR-Effektor, p70 S6-Kinase wird erst durch Insulin an den für die Aktivierung relevanten Positionen Thr<sup>389</sup> und Thr<sup>421</sup>/Ser<sup>424</sup> (Bae et al., 2007; Pullen et al., 1997; Duan et al., 1999) messbar phosphoryliert, weshalb nur in Gegenwart von Insulin quantifiziert wurde. Hyperosmotische Exposition führte zu einer signifikanten Abnahme der Phosphorylierung der p70 S6-Kinase. Die hyperosmotische Herabsetzung der Phosphorylierung konnte auch hier durch EGCG antagonisiert werden (Abb. 3.16). Es zeigte sich also, dass EGCG auf Ebene des mTORs und seinen Effektoren zu einer Inhibierung der hyperosmotischen Verminderung der Phosphorylierung führt. Insgesamt zeigten die untersuchten Komponenten des mTOR-Signalweges in An- und Abwesenheit von Insulin eine hyperosmotische Reduktion der Phosphorylierung, die durch EGCG antagonisiert wurde.



**Abb. 3.16** Charakterisierung des EGCG-Effekts auf die hyperosmotische Beeinflussung von Komponenten des mTOR-Signalweges

H4IIE Rattenhepatomzellen wurden für 2,5 h mit hyperosmotischem (405 mosmol/L) bzw. normoosmotischem (305 mosmol/L) Medium in Gegenwart und Abwesenheit von 100 nM Insulin inkubiert. Wie angegeben wurde zusätzlich 30  $\mu$ M EGCG 30 Minuten vor Einstellung der Osmolarität und Insulinzugabe zugefügt. Die Phosphorylierungszustände von mTOR und p70 S6-Kinase wurden im Western Blot mittels phosphospezifischer Antikörper analysiert, während Änderungen der 4E-BP1-Phosphorylierung über Änderungen der elektrophoretischen Mobilität dargestellt wurden. Die Quantifizierung der Phosphorylierungs-Änderungen erfolgte durch Densitometrie wie im Methodenteil beschrieben.

(Mittelwerte  $\pm$  SEM; n  $\geq$  4; \*, signifikant verschieden (p  $\leq$  0,05) zur Phosphorylierung unter der jeweiligen normoosmotischen Kontrollbedingung)

### **3.4 Beeinflussung der Aminosäure-Sensitivität des mTOR-Signalweges durch Hyperosmolarität**

Um eine vollständige mTOR-Aktivierung zu erreichen bedarf es zusätzlicher Signale, die durch intrazelluläre Aminosäuren, insbesondere Leucin, generiert werden (Einleitung, Abb. 1.2). Das durch Aminosäuren ausgelöste *Signaling* zu mTOR geschieht in einer von der PI 3-Kinase und PKB unabhängigen Weise (van Sluijters et al., 2000). Denkbar ist, dass es unter dem Einfluss von Hyperosmolarität zu Veränderungen des intrazellulären Aminosäureprofils kommt, die mit einer verminderten Aktivität des mTOR-Signalweges einhergehen könnten. Eine andere Möglichkeit ist, dass Hyperosmolarität die Effizienz von Aminosäuren bezüglich einer Stimulation des mTOR-Signalweges herabsetzt, also eine „Aminosäureresistenz“ des mTOR-Signalweges herbeiführt, um auf diese Weise die Phosphorylierung von mTOR-Effektoren herabzusetzen. Um dies zu untersuchen wurde das Aminosäureprofil in H4IIE-Zellen unter normo- und hyperosmotischen Bedingungen aufgenommen. Ferner wurden Experimente durchgeführt, bei denen der PI 3-Kinase Signalweg und somit der von Aminosäuren unabhängige Weg zu mTOR durch Wortmannin (Häussinger & Schliess, 1999; Cross et al., 1995) sowie das *Signaling* via mTOR durch Rapamycin (Sabers et al., 1995; McMohan et al., 2002) blockiert wurde. Schließlich wurde die Sensitivität der Phosphorylierung des 4E-BP1 und der p70 S6-Kinase in Abwesenheit extrazellulärer Aminosäuren studiert.

#### **3.4.1 Einfluss von Anisoosmolarität auf die intrazellulären Konzentrationen freier Aminosäuren**

Um das intrazelluläre Aminosäureprofil der H4IIE-Zellen zu erfassen wurden die Aminosäuren wie im Methodenteil beschrieben extrahiert, derivatisiert und über HPLC quantifiziert. Die zellulären Konzentrationen der freien Aminosäuren sind der Tabelle 3.1 zu entnehmen, während die relativen, auf 305 mosmol/L normierten Werte in Abbildung 3.19 graphisch dargestellt ist.

Durch hypoosmotische Exposition zeigte sich eine signifikant verminderte Konzentration von Taurin (Tau), Threonin (Tre), Serin (Ser), Asparagin (Asn), Glycin (Gly), Methionin (Met), Tyrosin (Tyr) und Phenylalanin (Tab. 3.1, Abb. 3.19).

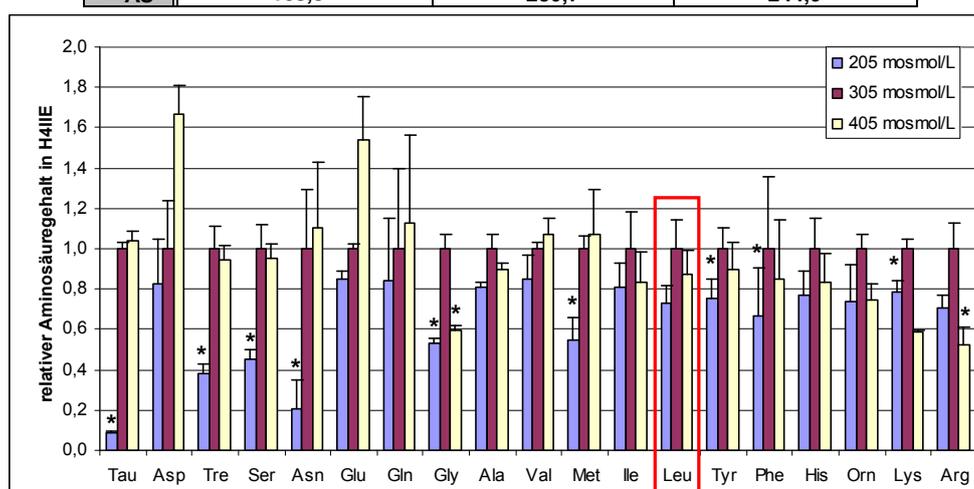
**Tab. 3.1 Intrazelluläres Aminosäureprofil in H4IIE-Zellen:**

H4IIE Rattenhepatomzellen wurden für 2,5 h in hypoosmotischem (205 mosmol/L), normoosmotischem (305 mosmol/L) bzw. hyperosmotischem (405 mosmol/L) Medium inkubiert. Intrazelluläre Aminosäuren wurden wie in 2.2.4 beschrieben extrahiert und mittels eines Aminosäureanalysators quantifiziert.

Zur Auswertung wurden die erhaltenen Aminosäurekonzentrationen (nmol/L) auf die vorher bestimmte Gesamtproteinmenge ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) bezogen (man erhält nmol/ $\mu\text{g}$ ). Ferner sind die Mittelwerte der Summen aller Aminosäurekonzentrationen innerhalb einer Bedingung angegeben.

Die hier angegebenen Werte sind Mittelwerte von n=3 Versuchen; \*, signifikant verschieden ( $p \leq 0,05$ ) zu dem unter normoosmotischen Bedingungen erhaltenen Werten.

Intrazellulärer Aminosäuregehalt in H4IIE-Zellen			
	MW 205 $\pm$ SEM	MW 305 $\pm$ SEM	MW 405 $\pm$ SEM
	[nmol/ $\mu\text{g}$ ]	[nmol/ $\mu\text{g}$ ]	[nmol/ $\mu\text{g}$ ]
Tau	2,0 $\pm$ 0,1*	22,8 $\pm$ 0,7	23,7 $\pm$ 1,2
Asp	2,5 $\pm$ 0,7	3,1 $\pm$ 0,7	5,1 $\pm$ 0,4
Tre	7,3 $\pm$ 0,9*	19,0 $\pm$ 2,2	17,9 $\pm$ 1,4
Ser	4,7 $\pm$ 0,6*	10,5 $\pm$ 1,3	10,0 $\pm$ 0,7
Asn	0,2 $\pm$ 0,1*	0,9 $\pm$ 0,3	1,0 $\pm$ 0,3
Glu	14,0 $\pm$ 0,7	16,5 $\pm$ 0,4	25,4 $\pm$ 3,5
Gln	47,6 $\pm$ 17,5	56,5 $\pm$ 22,2	63,6 $\pm$ 24,6
Gly	55,9 $\pm$ 2,8*	105,1 $\pm$ 7,3	62,7 $\pm$ 2,1*
Ala	6,1 $\pm$ 0,2	7,6 $\pm$ 0,5	6,8 $\pm$ 0,3
Val	1,9 $\pm$ 0,2	2,2 $\pm$ 0,1	2,3 $\pm$ 0,2
Met	0,4 $\pm$ 0,1*	0,8 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,2
Ile	1,9 $\pm$ 0,3	2,3 $\pm$ 0,4	1,9 $\pm$ 0,3
Leu	2,4 $\pm$ 0,3	3,3 $\pm$ 0,5	2,9 $\pm$ 0,4
Tyr	2,6 $\pm$ 0,3*	3,4 $\pm$ 0,4	3,1 $\pm$ 0,5
Phe	0,8 $\pm$ 0,3*	1,1 $\pm$ 0,4	1,0 $\pm$ 0,3
His	2,9 $\pm$ 0,5	3,8 $\pm$ 0,6	3,2 $\pm$ 0,5
Orn	2,0 $\pm$ 0,5	2,7 $\pm$ 0,2	2,0 $\pm$ 0,2
Lys	7,1 $\pm$ 0,5	9,1 $\pm$ 0,4	5,4 $\pm$ 0,0
Arg	6,3 $\pm$ 0,6	9,0 $\pm$ 1,1	4,7 $\pm$ 0,7*
$\Sigma_{AS}$	168,8*	280,7	244,9

**Abb. 3.17: Graphische Darstellung der normalisierten Aminosäurekonzentrationen in H4IIE-Zellen**

H4IIE-Zellen wurden für 2,5 h in hypoosmotischem (205 mosmol/L, blaue Balken), normoosmotischem (305 mosmol/L, rote Balken) bzw. hyperosmotischem (405 mosmol/L, gelbe Balken) Medium inkubiert. Die intrazellulären Aminosäuren wurden dann wie in 2.2.4 beschrieben extrahiert und mittels eines Aminosäureanalysators quantifiziert.

Aufgetragen sind hier die auf 305 mosmol/L normierten Mittelwerte  $\pm$  SEM von n=3; \*, signifikant verschieden ( $p \leq 0,05$ ) zu den unter normoosmotischen Bedingungen erhaltenen Werten.

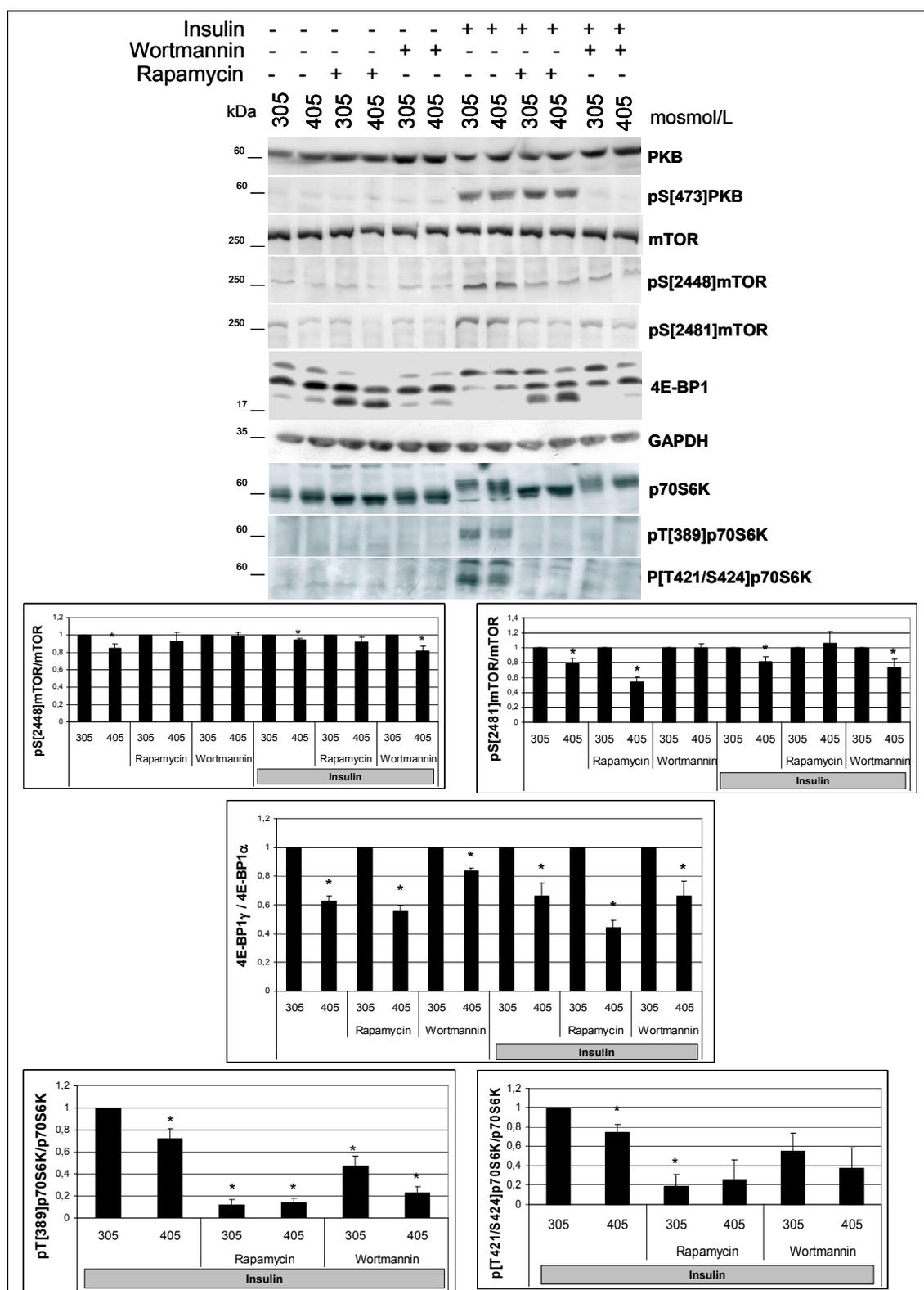
Die hypoosmotisch induzierte signifikante Taurin-Ausschüttung kann hier als Kontrolle gewertet werden, da sie in H4IIE-Zellen bereits beschrieben wurde (Warskulat et al., 1997). Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die Abgabe von Aminosäuren eine Rolle bei der Volumenregulation hypoosmotisch geschwollener H4IIE-Zellen spielt.

Durch Hyperosmolarität wurden weitaus weniger Aminosäuren in ihrer Konzentration beeinflusst. Hier lagen die Aminosäuren Glycin (Gly) und Arginin (Arg) signifikant vermindert vor. Die Konzentration von Leucin wurde in H4IIE-Zellen weder durch normo-, noch durch hyperosmotische Exposition signifikant beeinflusst (Abb. 3.19). Es ist daher unwahrscheinlich, dass eine Änderung der intrazellulären Leucin-Konzentration zur Osmosensitivität der 4E-BP1-Phosphorylierung beiträgt. Bei der Betrachtung der Summe der Konzentrationen aller erfassten Aminosäuren konnte festgestellt werden, daß es durch Hypoosmolarität zu einer signifikanten Ausschüttung von Aminosäuren kommt, während unter hyperosmotischen Bedingungen keine signifikante Änderung der Gesamtkonzentration der Aminosäuren beobachtet wurde.

### **3.4.2 Rolle der PI 3-Kinase und gegen Rapamycin sensitiver mTOR-Signale für die hyperosmotische Unterdrückung der 4E-BP1-Phosphorylierung**

Wie die Abb. 3.18 zeigt bleibt die Sensitivität der Phosphorylierung des 4E-BP1 gegen Hyperosmolarität in Gegenwart von Wortmannin erhalten. Dies ist unabhängig davon, ob die H4IIE-Zellen mit Insulin stimuliert sind oder nicht und lässt vermuten, dass der hyperosmotischen Unterdrückung der 4E-BP1-Phosphorylierung keine Osmosensitivität des PI 3-Kinase/PKB-Signals zugrunde liegt.

In Übereinstimmung mit früheren Befunden (Lornejad-Schäfer et al., 2003) zeigt die Abb. 3.18, dass die durch Insulin-induzierte PKB Ser<sup>473</sup>-Phosphorylierung durch Hyperosmolarität unbeeinflusst bleibt. Die Wirksamkeit des Wortmannins zeigt sich in der vollständigen Verhinderung der Insulin-induzierten PKB Ser<sup>473</sup>-Phosphorylierung. Interessanterweise bleibt eine hyperosmotische Unterdrückung der 4E-BP1-Phosphorylierung auch in Gegenwart von Rapamycin erhalten, sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von Insulin (Abb. 3.18).



**Abb. 3.18: Charakterisierung der Osmosensitivität *upstream* und *downstream* von mTOR mittels des PI 3-kinase Hemmstoffs Wortmannin und des mTOR-Inhibitors Rapamycin**

H4IIE Rattenhepatomzellen wurden für 2,5 h mit hyperosmotischem (405 mosmol/L) bzw. normoosmotischem (305 mosmol/L) Medium inkubiert, wie angezeigt in Gegenwart von 500 nM Rapamycin, 100 nM Wortmannin bzw. 100 nM Insulin. Die Inhibitoren Rapamycin und Wortmannin wurden bereits 30 Minuten vor Einstellung der Osmolarität dem Medium zugefügt. Die Phosphorylierungszustände wurden im Western Blot visualisiert und wie im Methodenteil beschrieben densitometrisch quantifiziert.

(Mittelwerte  $\pm$  SEM; n = 6; \*, Phosphorylierung signifikant verschieden (p  $\leq$  0,05) von der unter der jeweiligen normoosmotischen Bedingung)

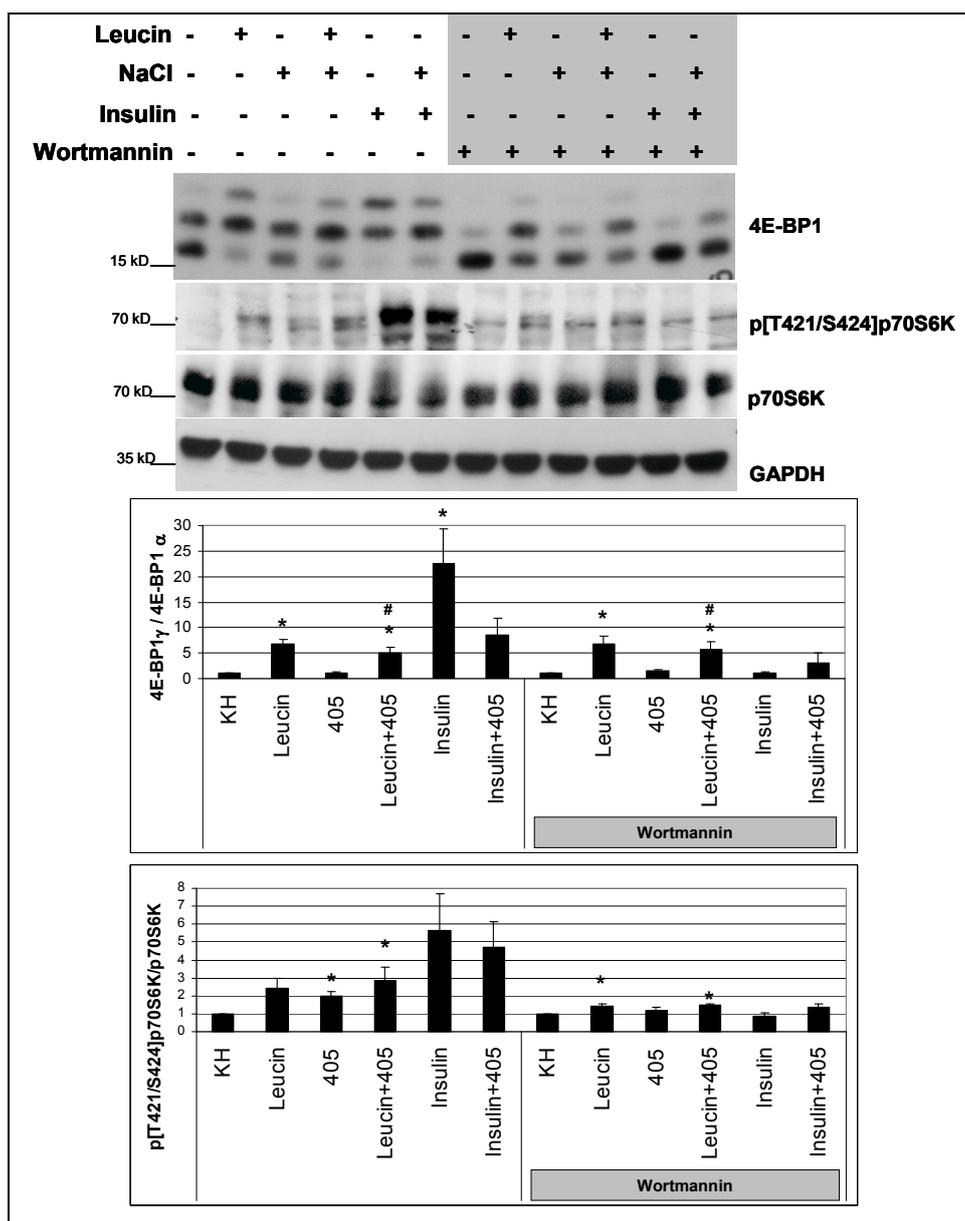
Auch die durch Insulin-induzierte Phosphorylierung der p70 S6-Kinase wird durch Hyperosmolarität unterdrückt und ist, im Unterschied zur 4E-BP1-Phosphorylierung, durch Wortmannin und Rapamycin vollständig hemmbar. mTOR zeigte eine signifikant verminderte Phosphorylierung an Ser<sup>2448</sup> und Ser<sup>2481</sup> durch Hyperosmolarität, was auch in Gegenwart von Insulin beobachtet wurde (Abb. 3.18). *Per se* führte Insulin an beiden Positionen zu einem Anstieg der mTOR-Phosphorylierung (Abb. 3.18).

In Gegenwart von Rapamycin konnte keine signifikante Beeinflussung der Phosphorylierung in Position Ser<sup>2448</sup> durch Hyperosmolarität festgestellt werden und zwar in Abwesenheit oder in Gegenwart von Insulin. An der Position Ser<sup>2481</sup> kommt es allerdings in Abwesenheit von Insulin auch in Gegenwart von Rapamycin zu einer hyperosmotisch verminderten Phosphorylierung, die in Gegenwart von Insulin ausblieb (Abb. 3.18).

In Gegenwart von Wortmannin zeigte sich in Abwesenheit von Insulin keine Osmosensitivität des mTORs mehr, während unter Insulineinfluss es zu einer signifikant hyperosmotisch reduzierten mTOR-Phosphorylierung kam (Abb. 3.18).

### **3.4.3 Effekt von Hyperosmolarität auf die durch Leucin-induzierte Phosphorylierung des 4E-BP1 und der p70 S6-Kinase**

Leucin ist ein starker Aktivator des mTOR-Signalweges (Shigemitsu et al., 1999; Lynch et al., 2000) und wurde im folgenden Experiment eingesetzt, um den Einfluss von Hyperosmolarität auf den Aminosäure-abhängigen Weg zu den mTOR-Effektoren 4E-BP1 und p70 S6-Kinase zu untersuchen. Dazu wurden die H4IIE-Zellen ohne Aminosäure-Zusatz in Krebs-Henseleit (KH) Puffer für eine Stunde vorinkubiert, wobei die Zellen für die restliche Versuchsdauer in KH-Puffer inkubiert blieben. Um die Bereitstellung intrazellulärer Aminosäuren durch autophagische Proteolyse zu unterbinden (Blommaart et al., 1997; Shigemitsu et al., 1999), wurden einige Experimente in Gegenwart von Wortmannin durchgeführt. Wortmannin hemmt die autophagische Proteolyse in Leberzellen (Shigemitsu et al., 1999; Häussinger et al., 1999).



**Abb. 3.19: Hyperosmolarität vermindert nicht die Leucin induzierte Phosphorylierung des 4E-BP1 und der p70 S6-Kinase**

H4IIE Rattenhepatomzellen wurden für 1 h in Krebs-Henseleit Puffer (KH) vorinkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen für 2,5 h mit 800  $\mu$ M Leucin oder 100 nM Insulin versetzt. Wo angezeigt wurde Hyperosmolarität durch Zugabe von 50 mM NaCl eingestellt. In den gekennzeichneten Versuchen wurde 100 nM Wortmannin zugegen, um die intrazelluläre Produktion von Aminosäuren durch autophagische Proteolyse zu unterdrücken. Änderungen der Phosphorylierungszustände von 4E-BP1 und p70 S6-Kinase wurden durch Western Blot-Analyse verfolgt und wie im Methodenteil beschrieben densitometrisch quantifiziert.

(Mittelwerte  $\pm$  SEM; n = 6; \*, Phosphorylierung signifikant verschieden ( $p \leq 0,05$ ) zu der unter der normoosmotischen (KH) Bedingung, #, signifikant verschieden zur der unter der hyperosmotischen Bedingung erhaltenen).

Wie Abb. 3.19 zeigt lässt sich wie erwartet (Shigemitsu et al., 1999) feststellen, dass unter aminosäurefreien Bedingungen die 4E-BP1-Phosphorylierung *per se* stark herabgesetzt war. Sowohl 4E-BP1 als auch die p70 S6-Kinase zeigten unter dem Einfluss von Leucin eine signifikant erhöhte Phosphorylierung, die durch Hyperosmolarität nur leicht beeinflusst wurde. Die Inhibierung der Proteolyse durch

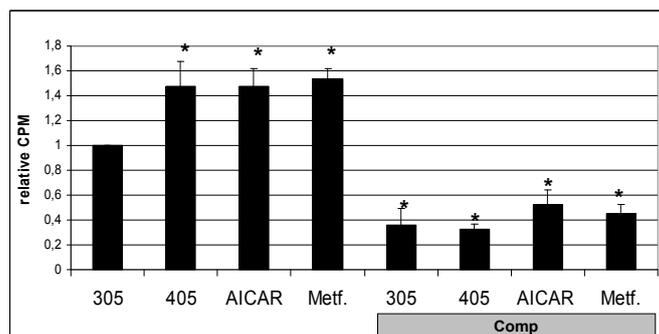
Wortmannin änderte dieses Verhalten nicht. Als Kontrolle der Reaktionsfähigkeit der Zellen wurde Insulin zugeben, was in Abwesenheit von Wortmannin zu einer signifikant gesteigerten Phosphorylierung des 4E-BP1 und der p70 S6-Kinase führte. Unter hyperosmotischen Bedingungen war die Insulin-induzierte Phosphorylierung des 4E-BP1 wieder deutlich abgesenkt. In Gegenwart des PI 3 Kinase Inhibitors Wortmannin konnte Insulin unter Aminosäure-freien Bedingungen keine zusätzliche 4E-BP1-Phosphorylierung mehr induzieren (Abb. 3.18). Auch die Leucin-induzierte Phosphorylierung der p70 S6-Kinase war durch Hyperosmolarität nicht beeinflusst (Abb. 3.18). Insgesamt konnte festgestellt werden, dass es unter hyperosmotischer Bedingung nicht zu einer Leucinresistenz kommt, sondern die Phosphorylierung der mTOR-Effektoren eine Sensitivität gegenüber Leucin beibehalten.

### **3.5 Rolle der AMPK bei der hyperosmotischen Unterdrückung der 4E-BP1-Phosphorylierung**

Hyperosmolarität verursacht einen osmotischen Stress (Reinehr et al., 2003a,b), von dem in einigen Zelltypen gezeigt ist, dass er die *AMP-activated-Proteinkinase* (AMPK) aktivieren kann (Smith et al., 2005; Xi et al., 2001). Im folgenden Abschnitt sollte anhand von spezifischen Aktivatoren und Inhibitoren ermittelt werden ob der AMPK bei der hyperosmotisch verminderten 4E-BP1-Phosphorylierung eine Bedeutung zukommt.

#### **3.5.1 Hyperosmotisch induzierte AMPK-Aktivierung**

Um zu untersuchen ob Hyperosmolarität in den H4IIE-Zellen eine AMPK-Aktivierung mit sich bringt, wurde ein Assay eingesetzt mit dem die Aktivität der AMPK überprüft wurde. Dazu wurden die Proben wie im Methodenteil beschrieben mit einem synthetisch hergestellten Substrat, das „SAMS Peptid“ (HMRSAMSGLHLVKRR), sowie radioaktiv markiertem [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP inkubiert und in einem  $\gamma$ -Counter die *counts per minute* (CPM) gemessen.



**Abb. 3.20: AMPK-Aktivierung durch Hyperosmolarität, AICAR und Metformin**

H4IIE-Zellen wurden für 2,5 h mit hyperosmotischem Medium, 2 mM AICAR, 2 mM Metformin bzw. 60  $\mu$ M Compound C inkubiert. Die Proben wurden dann für den radioaktiven AMPK-Aktivitäts Assay (siehe Methodenteil) aufgereinigt und eingesetzt. Die erhaltenen Werte der *counts per minute* (CPM) wurden zur Auswertung jeweils auf die unter normoosmotischen Bedingungen erhaltenen Werte normiert.

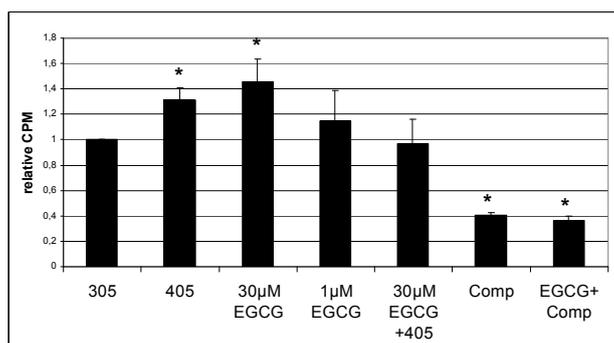
(Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n > 7$ , \*, signifikant verschiedene Aktivierung ( $p \leq 0,05$ ) im Vergleich zu der unter normoosmotischen Bedingungen erhaltenen)

Es zeigte sich, dass Hyperosmolarität eine vergleichbar hohe Aktivierung erzeugte wie die, die durch die prototypischen AMPK-Aktivatoren AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide ribosid; Corton et al., 1995) oder Metformin (Zhou et al., 2001) induziert wurde (Abb. 3.21). Hyperosmolarität, AICAR und Metformin führten zu einer signifikant erhöhten AMPK-Aktivierung im Vergleich zur basalen Aktivität. Mittels eines spezifischen Inhibitors der AMPK, Compound C (Comp; Zhou et al., 2001) konnte diese Aktivierung verhindert werden (Abb. 3.20).

### 3.5.2 Pharmakologische Charakterisierung der AMPK-Aktivierung

Da die hyperosmotisch verminderte 4E-BP1-Phosphorylierung durch EGCG verhindert werden konnte (siehe 3.3) und in 3.5.1 gezeigt werden konnte, dass Hyperosmolarität zu einer AMPK-Aktivierung führt, ist es denkbar, dass EGCG durch Inhibierung der hyperosmotisch induzierten AMPK-Aktivierung wirkt.

Um dies zu untersuchen wurde der Effekt von EGCG auf die AMPK-Aktivität unter normo- und unter hyperosmotischen Bedingungen überprüft. Abb. 3.21 zeigt, dass EGCG (30  $\mu$ M) unter normoosmotischen Bedingungen eine signifikante AMPK-Aktivierung verursacht, während 1  $\mu$ M EGCG keinen signifikanten Effekt auf die AMPK-Aktivität ausübt. Interessanterweise kam es bei Einstellung der Hyperosmolarität und gleichzeitiger EGCG Zugabe zu einer Verminderung der AMPK-Aktivität auf Basalniveau. Der AMPK-Inhibitor, Compound C (Comp) konnte die Aktivierung der AMPK durch EGCG (30  $\mu$ M) verhindern (Abb. 3.21).



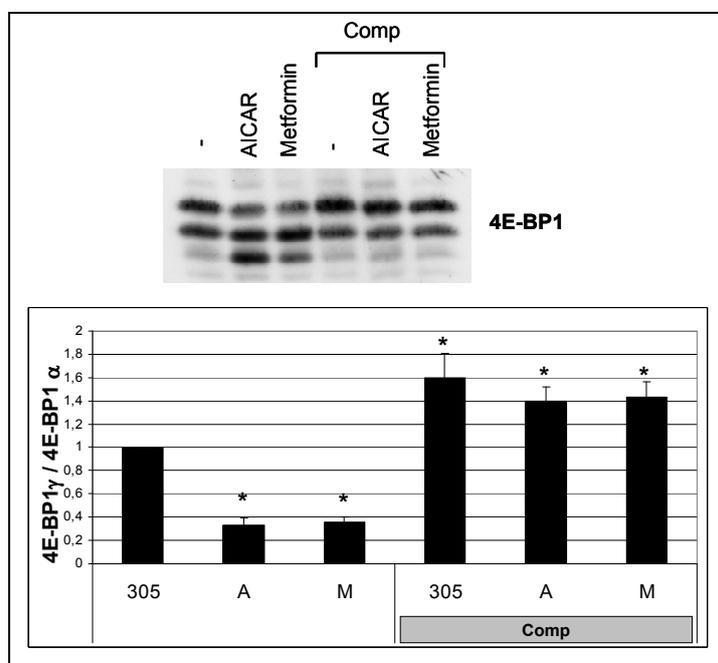
**Abb. 3.21: Hyperosmotische AMPK-Aktivierung wird durch EGCG verhindert**

H4IIE-Zellen wurden für 2,5 h mit 30 µM und 1 µM EGCG, hyperosmotischem Medium bzw. 60 µM Compound C (Comp) inkubiert. Die Proben wurden nach Protokoll (siehe Methodenteil) aufgereinigt und eingesetzt. Die erhaltenen Werte der *counts per minute* (CPM) wurden zur Auswertung jeweils auf die unter der normoosmotischen Kontrollbedingung erhaltenen Werte normiert.

(Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n > 4$ , \*, AMPK-Aktivität signifikant verschieden ( $p \leq 0,05$ ) von der unter normoosmotischen Kontrollbedingung erhaltenen).

### 3.5.3 Rolle der AMPK bei der hyperosmotischen Unterdrückung der 4E-BP1-Phosphorylierung

In weiteren Experimenten wurde der Effekt verschiedener AMPK-Aktivatoren (AICAR (5-Aminoimidazol-4-carboxamid-1- $\beta$ -D-ribofurosemid) und Metformin) sowie der Hemmung der AMPK durch Compound C auf die 4E-BP1-Phosphorylierung untersucht.



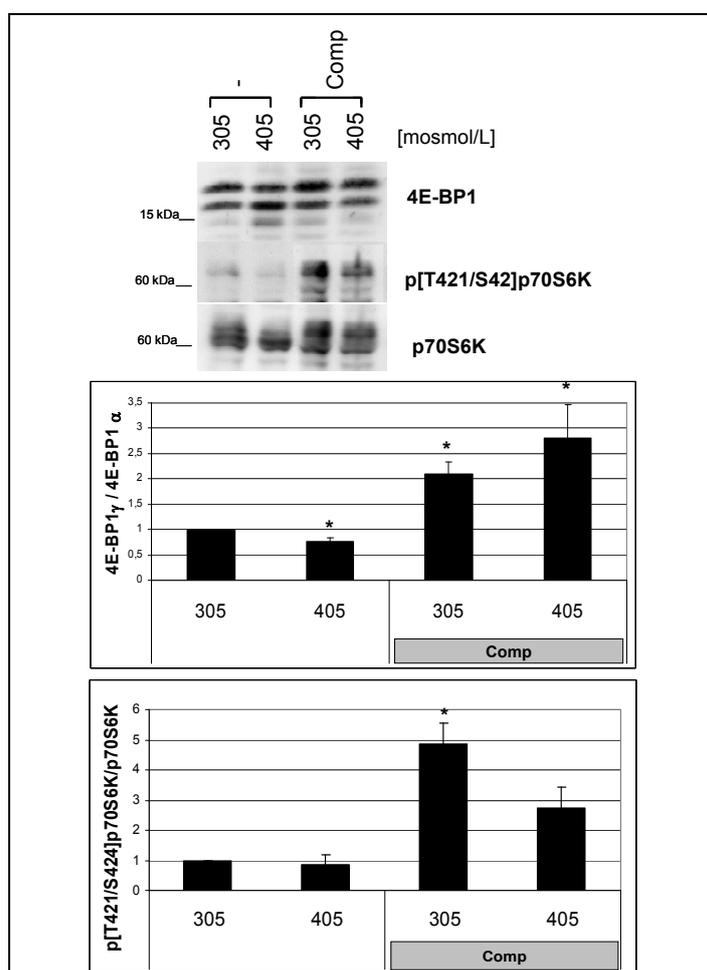
**Abb. 3.22: Zusammenhang der AMPK und 4E-BP1-Phosphorylierung**

H4IIE Rattenhepatomzellen wurden mit 2 mM AICAR oder 2 mM Metformin für 2,5 h inkubiert. Wo angezeigt wurden 60 µM Compound C (Comp) zugegeben, wobei der Inhibitor bereits 30 Minuten vor Gabe von AICAR bzw. Metformin zugesetzt wurde. Die Phosphorylierungsänderungen des 4E-BP1 wurden im Western Blot analysiert und wie im Methodenteil beschrieben densitrometriert.

(Mittelwerte  $\pm$  SEM;  $n = 7$ ; \*, 4E-BP1-Phosphorylierung signifikant verschieden ( $p \leq 0,05$ ) von der unter normoosmotischen Kontrollbedingung erhaltenen).

Die Aktivierung der AMPK durch AICAR oder Metformin war mit einer signifikanten Abnahme der Phosphorylierung des 4E-BP1 assoziiert. Durch Compound C (Comp) konnte die AICAR- bzw. Metformin-induzierte Abnahme der 4E-BP1-Phosphorylierung vollständig verhindert werden (Abb. 3.22). Die Compound C führte *per se* zu einer signifikanten Steigerung der 4E-BP1-Phosphorylierung.

Die Daten sprechen dafür, dass eine Aktivierung der AMPK die hyperosmotische Abnahme der 4E-BP1-Phosphorylierung vermittelt und dass eine basale Aktivität der AMPK in H4IIE-Zellen an der Repression der 4E-BP1-Phosphorylierung unter der Kontrollbedingung beteiligt ist.



**Abb. 3.23: Inhibierung der AMPK verhindert die hyperosmotisch induzierte Verminderung der 4E-BP1-Phosphorylierung**

H4IIE Rattenhepatomzellen wurden mit normoosmotischem (305 mosmol/L) bzw. hyperosmotischem (405 mosmol/L) Medium für 2,5 h inkubiert. Zusätzlich wurden 60  $\mu$ M Compound C (Comp) zugegeben, wobei der Inhibitor bereits 30 Minuten zuvor zugegeben wurde. Änderungen der 4E-BP1-Phosphorylierung wurden im Western Blot analysiert und wie im Methodenteil beschrieben densitometriert.

(Mittelwerte  $\pm$  SEM;  $n \geq 4$ ; \*, 4E-BP1-Phosphorylierung signifikant verschieden ( $p \leq 0,05$ ) von der unter normoosmotischen Kontrollbedingung gefundenen).

Um nun den Zusammenhang zwischen der hyperosmotisch induzierten AMPK-Aktivierung und hyperosmotisch verminderten Phosphorylierung des 4E-BP1 und der

p70 S6-Kinase aufzuklären, wurde der AMPK-Inhibitor Compound C (Comp) während einer normo- und hyperosmotischen Exposition zugefügt und Änderungen der 4E-BP1- und p70 S6-Kinase-Phosphorylierung im Western Blot visualisiert.

Es konnte gezeigt werden, dass die hyperosmotisch induzierte Verminderung der 4E-BP1-Phosphorylierung durch Compound C inhibiert wurde (Abb. 3.23). Die P70 S6-Kinasen-Phosphorylierung wurde an der Position Thr<sup>421</sup>/Ser<sup>424</sup> unter normoosmotischen Bedingungen durch die Compound C signifikant erhöht, was unter hyperosmotischen Bedingungen nicht der Fall war (Abb. 3.23).

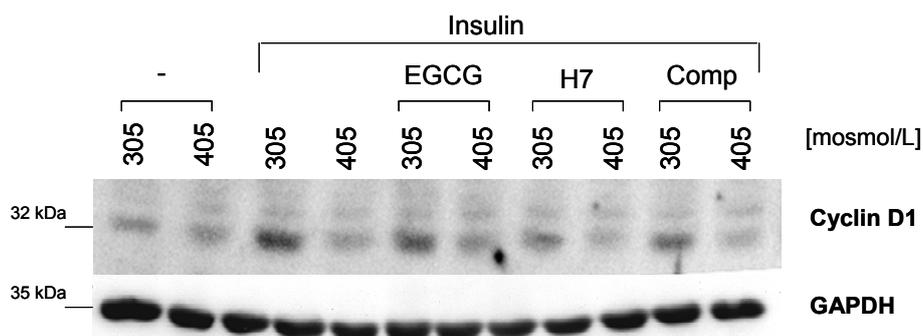
### **3.6 Osmosensitivität der Expression mTOR-abhängig regulierter Gene**

Im Folgenden sollen die Auswirkungen einer hyperosmotisch herbeigeführten Dehydratation auf die Expression von Genen untersucht werden, von denen bekannt ist, dass sie mTOR-abhängig reguliert werden. Als Beispiele wurden das Cyclin D1 (Thomas et al., 2006) und das *Insulin-like growth factor binding protein*, IGFBP 1 (Patel et al., 2002a,b) gewählt.

#### **3.6.1 Hyperosmotische Suppression der Cyclin D1-Expression**

Cyclin D1 ist ein mTOR-abhängig translatiertes Protein bzw. unterliegt der 4E-BP1-regulierten Translation (Thomas et al., 2006). Daher wurde die Sensitivität der Cyclin D1-Expression gegen Hyperosmolarität untersucht. Um das Expressionsniveau des Cyclin D1 zu erhöhen wurden in einigen Experimenten die H4IIE-Zellen mit Insulin stimuliert. Wie die in Abschnitt 3.3, 3.2.2 und 3.5.3 beschriebenen Experimente zeigen, wurden die hyperosmotische Suppression der 4E-BP1-Phosphorylierung durch EGCG, H7 und Compound C verhindert. Diese Verbindungen wurden daher in die Experimente zur Cyclin D1-Expression ebenfalls einbezogen.

Abb. 3.24 zeigt, dass es zu einer stärkeren Expression des Cyclin D1 Proteins unter dem Einfluss von Insulin kommt. Sowohl die basale als auch die durch Insulin-stimulierte Cyclin D1-Expression war unter hyperosmotischen Bedingungen reprimiert. Jedoch vermochten EGCG, H7 und die Compound C (Comp) die hyperosmotisch induzierte Repression der Cyclin D1-Expression nicht aufzuheben (Abb. 3.24).



**Abb. 3.24: Hyperosmotische Unterdrückung der Cyclin D1 Protein-Expression**

H4IIE Rattenhepatomzellen wurden für 2,5 h mit normosmotischem (305 mosmol/L) bzw. hyperosmotischem (405 mosmol/L) Medium inkubiert. Zusätzlich wurde in den gekennzeichneten Proben 100 nM Insulin zugefügt. Die Inhibitoren EGCG (30  $\mu$ M), H7 (20  $\mu$ M) und Compound C (Comp, 60  $\mu$ M) wurden bereits 30 Minuten vor Einstellung der Osmolarität zugegeben.

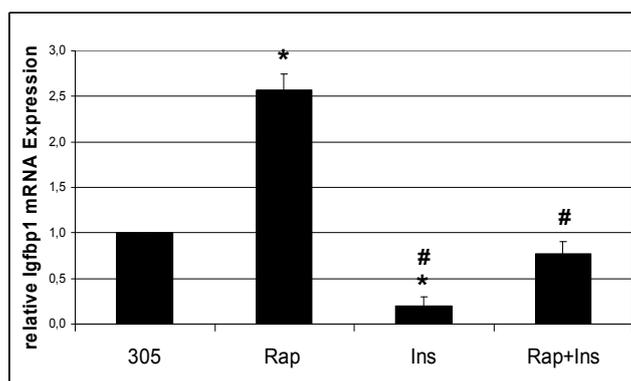
Gezeigt ist eine repräsentative Western Blot Analyse (n=6-8).

### 3.6.2 Osmosensitivität der Igfbp 1 mRNA-Expression

Auch die Igfbp 1 mRNA-Expression ist mTOR-reguliert (Patel et al., 2002a,b). Es ist bekannt, dass es bei Inhibition des mTOR durch Rapamycin zu einer Steigerung der Igfbp 1 mRNA-Expression kommt, während eine Aktivierung des mTOR-Signalweges durch Insulin zu einer Herabregulation der Igfbp 1 mRNA-Expression führt (Patel et al., 2002a,b). Kürzlich wurde im Rahmen einer Array-basierten Aufnahme von Genexpressionsprofilen in H4IIE-Zellen gefunden, dass Hyperosmolarität die Expression von Igfbp 1 mRNA und Protein steigert, während Hypoosmolarität die Expression der Igfbp 1 mRNA und Protein absenkt (Schäfer et al., 2007).

Zunächst wurde die Rolle von mTOR für die Igfbp 1 mRNA-Expression in H4IIE-Zellen mittels *Real Time*-PCR (RT-PCR) Analyse untersucht. Wie Abb. 3.25 zeigt, führte eine Hemmung des mTOR durch Rapamycin (Rap) zu einem Anstieg der Igfbp 1 mRNA-Expression. Insulin-supprimierte die Igfbp 1 mRNA-Expression, was durch Rapamycin verhindert wird.

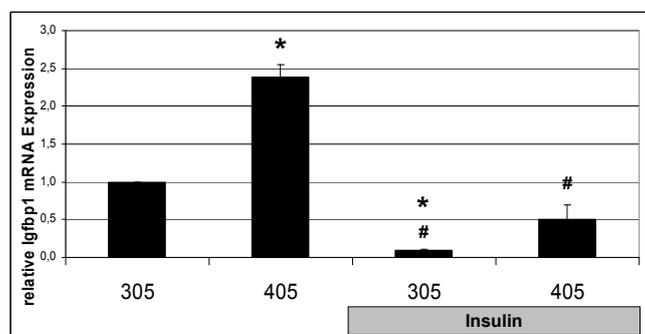
Im Einklang mit bereits früher mittels DNA-Array- und Northern Blot-Analyse erhobenen Daten (Schäfer et al., 2007) führte Hyperosmolarität, ähnlich wie Rapamycin (Abb. 3.25) zu einem signifikanten Anstieg der Igfbp 1 mRNA-Expression (Abb. 3.26). Abb. 3.26 zeigt auch, dass die durch Insulin-induzierte Repression der Igfbp 1 mRNA-Expression durch Hyperosmolarität aufgehoben wurde.



**Abb. 3.25: Die Igfbp 1 mRNA-Expression in H4IIE-Zellen wird über mTOR reguliert**

H4IIE Rattenhepatomzellen wurden mit 500 nM Rapamycin 30 min vor Insulinzugabe (10nM) vorinkubiert und dann für weitere 3 h weiter inkubiert. Die mRNA wurde wie Methodenteil beschrieben aufgereinigt und über RT-PCR analysiert. Die erhaltenen Expressionsniveaus wurden nachfolgend auf das Expressionsniveau der hprt mRNA normiert. Aufgetragen sind hier die auf das Expressionsniveau bei 305 mosmol/l bezogenen relativen Igfbp 1 mRNA Spiegel.

(Mittelwerte  $\pm$  SEM; n = 5; \*, signifikant verschiedene Expression ( $p \leq 0,05$ ) im Vergleich zur der unter normoosmotischen Bedingung erhaltenen, #, signifikant verschieden ( $p \leq 0,05$ ) gegenüber der unter Rapamycin erhaltenen).



**Abb. 3.26: RT-PCR-Analyse der Osmosensitivität der Igfbp 1-Expression**

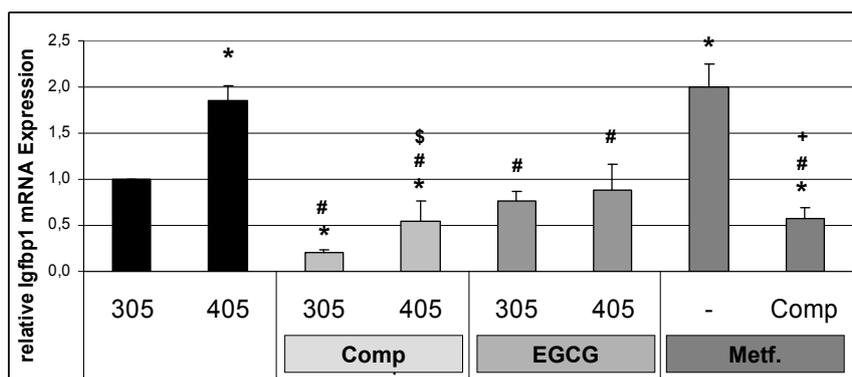
H4IIE Rattenhepatomzellen wurden für 5 h mit normoosmotischem (305 mosmol/L) bzw. hyperosmotischem (405 mosmol/L) Medium vorinkubiert. Nachfolgend wurden 10 nM Insulin zugegeben und die Inkubation über weitere 3 h fortgesetzt.

Die Igfbp 1 mRNA-Expression wurde wie im Methodenteil beschrieben mittels RT-PCR analysiert. Die erhaltenen Expressionsspiegel wurden auf die hprt mRNA-Expressionsspiegel normiert. Aufgetragen sind hier die relativen Igfbp 1 mRNA Spiegel, bezogen auf die Expression bei 305 mosmol/L.

(Mittelwerte  $\pm$  SEM; n = 5; \*, signifikant verschieden ( $p \leq 0,05$ ) im Vergleich zur der unter normoosmotischen Bedingung erhaltenen, #, signifikant verschieden ( $p \leq 0,05$ ) gegenüber der unter Hyperosmolarität erhaltenen)

Unter 3.3 und 3.5.3 wurde gezeigt, dass EGCG und der AMPK-Inhibitor Compound C (Comp) die hyperosmotische Unterdrückung der 4E-BP1-Phosphorylierung verhindern. Daher wurde untersucht, ob diese Substanzen auch einen inhibitorischen Effekt auf die hyperosmotische Induktion der Igfbp 1 mRNA-Expression ausüben.

Die über *RT-PCR* gewonnenen Daten zeigen, dass Compound C und EGCG nicht nur die basale Igfbp 1 mRNA-Expression herabsetzten, sondern auch, dass die hyperosmotische Induktion der Igfbp 1 mRNA-Expression blockiert war (Abb. 3.27). In Kontrollexperimenten wurde der AMPK-Aktivator Metformin eingesetzt. Metformin führte zu einer signifikanten Induktion der Igfbp 1 mRNA, was durch den AMPK-Hemmstoff Compound C verhindert werden konnte (Abb. 3.27).



**Abb. 3.27: Einfluss von Compound C und EGCG auf die Osmosensitivität der Igfbp 1 mRNA-Expression**

H4IIE Rattenhepatomzellen wurden über 8 h mit normoosmotischem (305 mosmol/L) bzw. hyperosmotischem (405 mosmol/L) Medium inkubiert. Wo angegeben wurde zusätzlich 30  $\mu$ M Compound C (Comp) oder 30  $\mu$ M EGCG zugegeben. In Kontrollexperimenten wurden die Zellen mit 2 mM Metformin in An- oder Abwesenheit von 30  $\mu$ M Compound C für 3 h inkubiert.

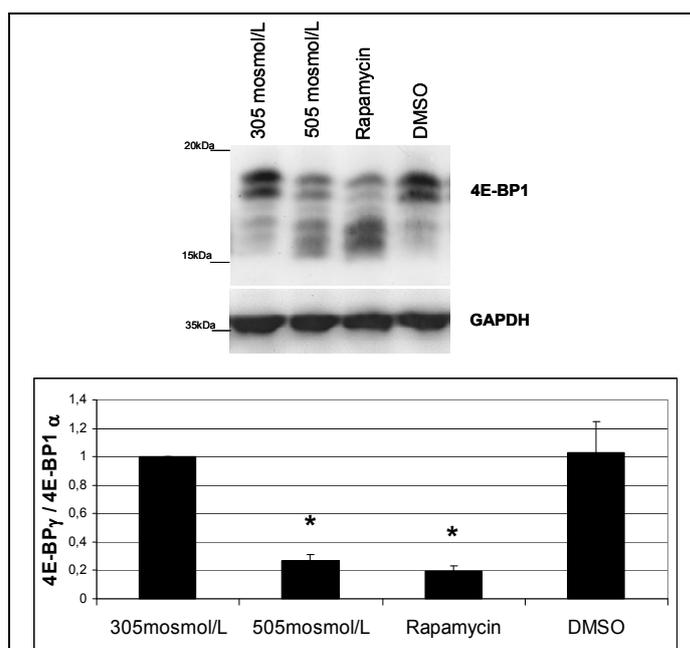
Die mRNA wurde mittels RT-PCR analysiert. Die erhaltenen Expressionsspiegel wurden auf die hprt mRNA-Expression normiert. Aufgetragen sind hier die relativen Igfbp 1 mRNA Spiegel bezogen auf die bei 305 mosmol/L gefundene Expression.

(Mittelwerte  $\pm$  SEM;  $n \geq 3$ ; \*, Igfbp 1 mRNA-Expression signifikant verschieden ( $p \leq 0,05$ ) von der unter normoosmotischen Bedingungen erhaltenen, #, signifikant verschieden ( $p \leq 0,05$ ) gegenüber der unter Hyperosmolarität erhaltenen und +, signifikant verschieden zu dem mit Metformin erhaltenen Wert)

### 3.7 Einfluss von Hyperosmolarität und Rapamycin auf das Genexpressionsprofil der humanen Huh7 Hepatom-Zelllinie

Um Unterschiede in Genexpressionsprofilen zu analysieren, wurde ein im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 575 „Experimentelle Hepatologie“ selbst hergestellter Oligonukleotid Array eingesetzt.

Es wurden Genexpressionsprofile von hyperosmotisch inkubierten Huh7-Zellen mit dem von mit Rapamycin inkubierten Zellen verglichen. Ziel war es zu ermitteln, in welchem Ausmaß Rapamycin und Hyperosmolarität ähnliche Effekte auf das Genexpressionsprofil in Huh7-Zellen ausüben. Dies soll eine Aussage darüber zulassen, ob eine Unterdrückung des mTOR-Signalweges zu dem durch hyperosmotische Dehydratation erzeugten Genexpressionsprofil beiträgt. Huh7-Zellen zeigen bei 505 mosmol/L eine signifikante Unterdrückung der 4E-BP1-Phosphorylierung. In den Kontrollexperimenten wurde auch gezeigt, dass Rapamycin das Phosphorylierungsniveau des mTOR-Effektors 4E-BP1 auf ein ähnliches Niveau herabsetzt (Abb. 3.28). Durch DMSO (Solvens für Rapamycin) wurde die 4E-BP1-Phosphorylierung nicht beeinflusst (Abb. 3.28).



**Abb. 3.28 Hyperosmolarität und Rapamycin vermindern die 4E-BP1-Phosphorylierung in Huh7-Zellen**

Humane Huh7-Hepatoma-Zellen wurden über 4 h mit normoosmotischem (305 mosmol/L) bzw. hyperosmotischem (505 mosmol/L) Medium oder mit 500 nM Rapamycin inkubiert. In Kontrolleexperimenten wurde 2,5 µl DMSO eingesetzt. Änderungen der 4E-BP1-Phosphorylierung wurden im Western Blot visualisiert und wie im Methodenteil beschrieben densitometriert.

(Mittelwerte ± SEM; n = 4; \*, 4E-BP1-Phosphorylierung signifikant verschieden ( $p \leq 0,05$ ) im Vergleich zu der unter normoosmotischen Kontrollbedingung erhaltenen).

Eine Übersicht der Anzahl der durch Rapamycin und Hyperosmolarität regulierten Gene ist in Tabelle 3.2 gegeben. Eine vollständige Liste der regulierten Gene befindet sich im Anhang (Tab I/II).

**Tab. 3.2: Übersicht der Genexpressionsänderungen durch Hyperosmolarität und Rapamycin**

Oligonukleotid-Arrays wurden mit markierter cDNA, die aus mit normoosmotischem (305 mosmol/L,  $N_{305}$ ) bzw. hyperosmotischem (405 mosmol/L,  $N_{405}$ ) Medium oder mit 500nM Rapamycin ( $N_{Rap}$ ) bzw. mit DMSO (Solvens für Rapamycin,  $N_{305+DMSO}$ ) inkubierten Huh7 Zellen gewonnenen wurde, hybridisiert (N ist dabei die normalisierte Intensität der Fluoreszenz (siehe 2.2.7)). Genexpressionsänderungen wurden als logarithmisierte Quotienten  $\log_{10}(N_{405} / N_{305})$  bzw.  $\log_{10}(N_{Rap} / N_{305+DMSO})$  gezeigt. Ein Verhältnis von  $\pm 0,18$  gilt als nicht regulierte, von  $\pm 0,18$  bis  $\pm 0,30$  als schwach regulierte und  $> 0,3$  bzw.  $< -0,3$  als stark regulierte Genexpression.

Log <sub>10</sub> x/y	reprimiert		nicht reguliert	induziert	
	< -0.3	-0.3 to -0.18	± 0.18	+0.18 to +0.3	> +0.3
$N_{405}$ vs. $N_{305}$	75	79	603	47	25
$N_{Rap}$ vs. $N_{305+DMSO}$	3	23	712	32	19

Die Ergebnisse des Arrays zeigten, dass Hyperosmolarität insgesamt 226 und Rapamycin 77 der 1500 auf dem Array repräsentierten Gentranskripte in Huh 7 Zellen reguliert (Tab. 3.2). Im Gesamtbild des Arrays zeigte sich, dass 45 Gentranskripte sowohl durch Hyperosmolarität als auch durch Rapamycin reguliert wurden. Davon wurden 36 Gentranskripte (Tab. 3.4) durch Hyperosmolarität und Rapamycin entgegengesetzt und 9 Gentranskripte gleichsinnig reguliert (Tab. 3.3).

**Tab. 3.3. Durch Hyperosmolarität und Rapamycin gleichsinnig regulierte Gentranskripte**

Oligonukleotid-Arrays wurden mit markierter cDNA (siehe 2.2.7) hybridisiert, die aus Huh 7 Zellen gewonnen wurde, die mit normoosmotischem (305 mosmol/L), hyperosmotischem (405 mosmol/L) Medium oder mit 500 nM Rapamycin (Rap) bzw. DMSO (Solvens für Rapamycin) inkubiert wurden. Genexpressionsänderungen wurden als logarithmisches Verhältnis gezeigt. Dabei zeigt das Verhältnis  $\log_{10}(N_{405}/N_{305})$  die hyperosmotisch induzierte Regulation im Vergleich zu der unter normoosmotischen Bedingung erhaltenen an, während das Verhältnis  $\log_{10}(N_{Rap}/N_{305+DMSO})$  eine durch Rapamycin induzierte Regulation im Vergleich zu der unter normoosmotischen Kontrollbedingung mit DMSO zeigt. Dabei gilt ein Verhältnis von  $\pm 0,18$  als nicht regulierte, von  $\pm 0,18$  bis  $\pm 0,30$  als schwache regulierte und  $> 0,3$  bzw. kleiner  $< -0,3$  als stark (fett gekennzeichnet) regulierte Genexpression.

Index	Name	NCBI Gene Symbol	NCBI Accession	305 ↓ 405	305(DMSO) ↓ Rap
1	Centromere protein F	CENPF	NM_016343	-0,25	-0,26
2	DEAD box polypeptide 24	DDX24	NM_020414	-0,24	-0,18
3	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 41	DDX41	NM_016222	<b>-0,32</b>	-0,18
4	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like 1	HNRPUL1	NM_007040, NM_144732, NM_144734	<b>-0,34</b>	-0,24
5	Methionine Adenosyltransferase 2, alpha	MAT2A	NM_005911	-0,28	-0,26
6	2',5'-oligoadenylate synthetase 1	OAS1	NM_016816	-0,26	<b>-0,34</b>
7	Phosphoribosylglycinamide formyltransferase	GART	NM_000819	-0,24	-0,21
8	serine (or cysteine) proteinase inhibitor	SERPINE2	NM_006216	-0,18	-0,26
9	DnaJ (Hsp40)	DNAJB9	NM_012328	0,22	0,24

**Tab. 3.4. Durch Hyperosmolarität und Rapamycin entgegengesetzt regulierte Gentranskripte**

Oligonukleotid-Arrays wurden mit markierter cDNA (siehe 2.2.7) hybridisiert, die aus Huh 7 Zellen gewonnen wurde, die mit normoosmotischem (305 mosmol/L), hyperosmotischem (405 mosmol/L) Medium oder mit 500 nM Rapamycin (Rap) bzw. DMSO (Solvens für Rapamycin) inkubiert wurden. Genexpressionsänderungen wurden als logarithmisches Verhältnis gezeigt. Dabei zeigt das Verhältnis  $\log_{10}(N_{405}/N_{305})$  die hyperosmotisch induzierte Regulation im Vergleich zu der durch normoosmotischen Bedingung an, während das Verhältnis  $\log_{10}(N_{Rap}/N_{305+DMSO})$  eine durch Rapamycin induzierte Regulation im Vergleich zu der unter normoosmotischen Kontrollbedingung mit DMSO anzeigt. Dabei gilt ein Verhältnis von  $\pm 0,18$  als nicht regulierte, von  $\pm 0,18$  bis  $\pm 0,30$  als schwache regulierte und  $> 0,3$  bzw. kleiner  $< -0,3$  als stark (fett gekennzeichnet) regulierte Genexpression.

Index	Name	NCBI Gene Symbol	NCBI Accession	305 ↓ 405	305(DMSO) ↓ Rap
1	S-adenosylhomocysteine hydrolase-like 1	AHCYL1	NM_006621	<b>-0,50</b>	<b>0,44</b>
2	alpha-2-HS-glycoprotein	AHSG	NM_001622	<b>-0,39</b>	<b>0,31</b>
3	aldo-keto reductase family 1	AKR1C2	NM_001354, NM_205845, NM_001353	<b>-0,32</b>	<b>0,34</b>
4	N-acylaminoacyl-peptide hydrolase	Apeh	NM_001640	-0,29	<b>0,34</b>
5	apolipoprotein A-I	APOA1	NM_000039	-0,27	<b>0,38</b>
6	Ras homolog gene family	ARHE	NM_005168	<b>0,33</b>	-0,18
7	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha	ARHGDI	NM_004309	-0,20	0,18
8	Calpain, small subunit 1	CAPNS1	NM_001749	<b>-0,45</b>	0,26
9	chaperonin containing TCP1	CCT7	NM_006429	<b>-0,31</b>	0,28
10	CD81 antigen	CD81	NM_004356	<b>-0,52</b>	0,20
11	carboxylesterase 1	CES1	NM_001266	-0,23	0,24
12	Coenzyme A synthase	COASY	NM_001266	-0,24	0,19
13	cytochrome b-245	CYBA	NM_000101	<b>-0,35</b>	0,25
14	GADD153	Ddit3	NM_004083	0,18	-0,26
15	DEAD box polypeptide 18	DDX18	NM_006773	<b>-0,54</b>	<b>0,70</b>
16	DEAD box polypeptide 21	DDX21	NM_004728	<b>-0,55</b>	<b>0,35</b>
17	DEAD/Hbox polypeptide 26	DDX26	NM_012141	0,29	-0,23

<b>Index</b>	<b>Name</b>	<b>NCBI Gene Symbol</b>	<b>NCBI Accession</b>	<b>305 ↓ 405</b>	<b>305(DMSO) ↓ Rap</b>
<b>18</b>	DEAH box polypeptide 9	DHX9	NM_001357	<b>-0,39</b>	<b>0,38</b>
<b>19</b>	emopamil binding protein	EBP	NM_006579	<b>-0,61</b>	<b>0,38</b>
<b>20</b>	Enoyl Coenzyme A hydratase 1	ECH1	NM_001398	-0,22	<b>0,40</b>
<b>21</b>	Epoxide hydrolase 2, zytoplasmatisch	EPHX2	NM_001979	-0,26	0,21
<b>22</b>	isocitrate dehydrogenase 1	IDH1	NM_005896	-0,25	<b>0,38</b>
<b>23</b>	interleukin enhancer binding factor 3	ILF3	NM_004516, NM_012218, NM_153464	<b>-0,35</b>	<b>0,33</b>
<b>24</b>	keratin 8	KRT8	NM_002273	<b>-0,46</b>	<b>0,28</b>
<b>25</b>	procollagen-proline	P4HB	NM_000918	-0,18	0,18
<b>26</b>	Peptidylprolyl isomerase B	PPIB	NM_000942	<b>-0,41</b>	<b>0,22</b>
<b>27</b>	peroxiredoxin 2	PRDX2	NM_005809, NM_181738	<b>-0,32</b>	<b>0,26</b>
<b>28</b>	Protein tyrosine phosphatase A	PTPRA	NM_002836, NM_080840, NM_080841	-0,27	<b>0,18</b>
<b>29</b>	RAB34	RAB34	NM_031934	<b>-0,37</b>	<b>0,29</b>
<b>30</b>	stearoyl-CoA desaturase	SCD	NM_005063	<b>-0,23</b>	<b>0,22</b>
<b>31</b>	solute carrier family 30 (zinc transporter)	Slc30a1	NM_021194	<b>0,19</b>	<b>-0,25</b>
<b>32</b>	Small nuclear ribonucleoprotein polypeptides B and B1	SNRPB	NM_003091, NM_198216	<b>-0,53</b>	<b>0,35</b>
<b>33</b>	tripartite motif-containing 28	TRIM28	NM_005762	<b>-0,56</b>	<b>0,21</b>
<b>34</b>	ubiquitin B	UBB	NM_018955	<b>-0,42</b>	<b>0,34</b>
<b>35</b>	Ubiquitin protein ligase E3A	UBE3A	NM_000462, NM_130838, NM_130839	<b>-0,75</b>	<b>0,24</b>
<b>36</b>	Exportin 1	XPO1	NM_003400	<b>-0,20</b>	<b>0,20</b>

## 4 Diskussion

Anfang der 1990er Jahre wurde von Häussinger und Lang erstmals erkannt, dass durch unterschiedliche Stimuli ausgelöste Änderungen der zellulären Hydratation einen eigenständigen Beitrag zur Kontrolle des zellulären Metabolismus und der Genexpression leisten (Häussinger & Lang, 1991; Häussinger & Lang, 1992; Häussinger, 1996). Am Modell hypo- oder hyperosmotisch exponierter Zellen und Gewebe wurden osmosensorische Mechanismen und durch diese aktivierte Signaltransduktionsprozesse identifiziert, die eine Verbindung zwischen Zellvolumenänderungen und Effekten auf Protein und Kohlenhydratmetabolismus, die kanalikuläre Exkretion von Gallensäuren und die Suszeptibilität gegen unterschiedliche Stressoren herstellen (Häussinger, 1996; Häussinger & Schliess, 1999; Weiergräber & Häussinger 2000; Schliess & Häussinger, 2002; Schliess & Häussinger, 2003; Häussinger et al., 2006; Häussinger & Schliess, 2007; Schliess & Häussinger, 2007; Schliess & Häussinger, 2007; Reinehr & Häussinger, 2007). Etwas verallgemeinernd lässt sich festhalten, dass eine Hydratationszunahme (Zellschwellung) anabole Stoffwechselprozesse und die Zellproliferation begünstigt, während eine Hydratationsabnahme (Dehydratation, Zellschrumpfung) katabole Stoffwechselprozesse und die Suszeptibilität der Zelle gegen die Wirkung unterschiedlicher Stressoren begünstigt.

Eine Zellvolumenzunahme ist beispielsweise integraler Bestandteil der hepatischen Signaltransduktion des Insulins. Sie kommt über den osmotischen Effekt einer von der Aktivierung der PI 3-Kinase abhängigen Netto-K<sup>+</sup>-Aufnahme zustande, wird über das Integrinsystem registriert und vermittelt über eine Integrin- und Src-abhängige Aktivierung der p38<sup>MAPK</sup> den antiproteolytischen Effekt des Hormons (vom Dahl et al., 1991; Häussinger & Lang 1992; Schliess et al., 2001; vom Dahl et al., 2003; Schliess et al., 2004). Auf der anderen Seite ist eine zelluläre Dehydratation der Zelle, wie sie durch Hyperosmolarität herbeigeführt werden kann, mit der Entwicklung von Insulinresistenz assoziiert (vom Dahl et al., 1991, Schliess et al., 2001; Schliess & Häussinger, 2003; Barutsch-Marrain & deFronzo, 1983). So inhibiert eine hyperosmotische Perfusion der Leber die durch Insulin PI 3-Kinase-abhängig induzierte K<sup>+</sup>-Aufnahme und Zellvolumenzunahme, wodurch es zu einer Blockade des antiproteolytischen Insulineffekts kommt. (vom Dahl et al., 1991; Schliess et al., 2001; Schliess et al., 2004). Zu Beginn der vorliegenden Arbeit lagen Hinweise darauf vor, dass Hyperosmolarität mit der Aktivierung des PI 3-Kinase/PKB/mTOR-Signalweges interferiert, dessen Effek-

toren unter anderem das 4E-BP1 und die p70 S6-Kinase sind (Lornejad-Schäfer et al., 2003). Eine Charakterisierung des zugrunde liegenden *crossstalks* und der Konsequenzen einer Beeinflussung der mTOR-abhängigen Signaltransduktion für das Genexpressionsprofil unter hyperosmotischen Bedingungen stand allerdings aus und wurde in der vorliegenden Arbeit vorgenommen.

#### **4.1 Pharmakologische Charakterisierung des hyperosmotischen Effekts auf die 4E-BP1-Phosphorylierung**

In der vorgelegten Arbeit konnte eine Sensitivität der Phosphorylierung des 4E-BP1-Proteins gegen Hyperosmolarität (405 mosmol/L) bereits nach 30 Minuten gezeigt werden, wobei die hyperosmotisch reduzierte 4E-BP1-Phosphorylierung mindestens 2,5 Stunden signifikant erhalten blieb (Abb. 3.1). Bereits eine milde Hyperosmolarität von 355 mosmol/L löste dabei eine signifikant reduzierte 4E-BP1-Phosphorylierung aus (Abb. 3.2). Da eine Phosphorylierung des 4E-BP1 mit einer Steigerung der Proteinsynthese einhergeht (Proud et al., 2004, Mamane et al., 2006) stehen diese Befunde im Einklang mit Angaben aus der Literatur, denen zufolge Hyperosmolarität die Proteinsynthese der Leberzelle abschwächt (Stoll et al., 1992; Lornejad-Schäfer et al., 2003).

Hypoosmolarität (205 mosmol/L) zeigte hingegen eine signifikant gesteigerte Phosphorylierung des 4E-BP1 (Abb. 3.2). Auch dies steht im Einklang mit bereits publizierten Ergebnissen, da Hypoosmolarität durch die verursachte Zellschwellung metabolische Insulineffekte nachahmt, was u.a. auch die Hochregulation der Proteinbiosynthese betrifft (Stoll et al., 1992; Meijer et al., 1992; Häussinger, 2001, 2004).

Infolge einer hyperosmotisch erzeugten Dehydratation können unterschiedliche Auslöser die Verminderung der 4E-BP1-Phosphorylierung verursachen. Zum einen kann sie durch Erhöhung der Ionenstärke (ausgelöst durch Erhöhung der Natriumchlorid-Konzentration), durch eine Erhöhung der Osmolarität *per se* oder durch die Volumenabnahme hervorgerufen werden. Die Einstellung von Hyperosmolarität durch drei alternative Osmolyte sollte diese Frage klären. Dabei zeigte sich, dass nur Raffinose, ein zell-impermeabler Osmolyt, ähnlich wie NaCl eine verminderte 4E-BP1-Phosphorylierung auslösen konnte (Abb. 3.3). Die anderen eingesetzten Osmolyte Harnstoff (permeabler Osmolyt) und Mannitol (semi-permeabler Osmolyt) vermochten diesen Effekt nicht zu erzeugen. Dies zeigt, dass die hyperosmotische

Verminderung der 4E-BP1-Phosphorylierung nicht primär durch eine Erhöhung der Ionenstärke erzielt wird. Es ist daher davon auszugehen, dass die Zellvolumenabnahme der *Trigger* für die hyperosmotisch reduzierte 4E-BP1-Phosphorylierung ist.

Interessanterweise beeinflussen Hypo- und Hyperosmolarität die 4E-BP1-Phosphorylierung gegenläufig (Abb. 3.2). Ähnlich findet man auch eine gegenläufige Regulation „später“ Gene, die z.B. für die Phosphoenolpyruvatcarboxykinase, die Tyrosin-Aminotransferase, den Taurintransporter oder die Betain-Homocystein-Methyltransferase kodieren (Newsome et al., 1994; Warskulat et al., 1996; Warskulat et al., 1997; Lornejad-Schäfer, et al., 2005; Schäfer et al., 2007; Schäfer et al., 2007). Andererseits aktivieren sowohl Hypo- als auch Hyperosmolarität, wenn auch mit unterschiedlichen Kinetiken, MAP-Kinasen und die Expression von *immediate early genes* (Finkenzeller et al., 1994; Schliess et al., 1998; Wiese et al., 1998; Lornejad-Schäfer et al., 2003; Lornejad-Schäfer et al., 2005). Der hier am 4E-BP1 erstmals erhobene Befund einer gegenläufig ausgeprägten Beeinflussung der Phosphorylierung/Aktivität eines Signalproteins könnte auf einen „Osmosensor“ hinweisen, der ein Spektrum von Zellvolumenänderungen (sowohl Zellschwellung als auch Zellschrumpfung) registriert und entweder mit dem mTOR identisch oder an den mTOR-Signalweg gekoppelt ist. Dies zu klären ist weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Da Zellvolumenänderungen die Umstrukturierung der Mikrofilamente und Mikrotubuli verursachen (Theodoropoulos et al., 1992; Häussinger et al., 1994 b), kann das Zytoskelett eine Rolle beim *Osmosignaling* spielen (vom Dahl et al., 2001; Papakonstanti, 2000, 2007). So konnte in HepG2-Zellen gezeigt werden, dass die Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts eine hypoosmotisch induzierte Phosphorylierung der PKB, eine dem mTOR übergeordnete Kinase (Abb. 1.2), verhindert (Kim et al., 2001). Es ist denkbar, dass die H4IIE-Zellen hyperosmotisch induzierte Zellschrumpfung über das Zytoskelett wahrgenommen wird und dieses den Effekt auf die 4E-BP1-Phosphorylierung vermittelt. Jedoch konnte die hyperosmotische Verminderung der 4E-BP1-Phosphorylierung durch verschiedene Modulatoren des Zytoskeletts nicht beeinflusst werden. Weder der Einsatz von Phalloidin (stabilisiert Aktin-Zytoskelett) noch Latrunkulin B (Depolymerisation des Aktin-Zytoskeletts) oder Colchicin (Depolymerisation der Mikrotubuli) vermochten den Effekt zu inhibieren (Abb. 3.5), was eine Rolle des Zytoskeletts bei der hyperosmotischen Regulation der 4E-BP1-Phosphorylierung unwahrscheinlich macht.

Es ist bereits gezeigt worden, dass kompatible organische Osmolyte in der Leber eine schützende Wirkung gegenüber verschiedenen Stressfaktoren ausüben und zu einer Adaptation der Zelle an hyperosmotische Bedingungen beitragen (Wettstein & Häussinger, 1997; Warskulat et al., 1997; Schliess et al., 2002; Schliess & Häussinger, 2002b). Der Einfluss von Betain, myo-Inositol und Taurin auf den hyperosmotischen Effekt der reduzierten 4E-BP1-Phosphorylierung wurde daher untersucht (Abb. 3.4). Allerdings vermochte keiner dieser Osmolyte den Effekt zu unterdrücken. Auch eine zentrale Beteiligung von Serin/Threonin- oder Tyrosin-Phosphatasen konnte an dem hier beschriebenen Effekt ausgeschlossen werden, da die spezifischen Phosphatase-Inhibitoren Vanadat (Tyrosin-Phosphataseinhibitor), Calyculin A (Serin/Threonin-Phosphataseinhibitoren) und Okadainsäure (Serin/Threonin-Phosphataseinhibitoren) ohne Einfluss auf die hyperosmotisch verminderte 4E-BP1-Phosphorylierung waren (Abb. 3.6). Das gleiche Resultat ergab sich bei der Untersuchung der Beteiligung von Tyrosin-Kinasen. Die Inhibitoren Genistein, ein Tyrosinkinase-Inhibitor wie auch das inaktive Analogon Daidzein blieben ohne Effekt auf die hyperosmotisch reduzierte 4E-BP1-Phosphorylierung (Abb. 3.6). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass gegen diese Inhibitoren insensitive Phosphatasen und Tyrosinkinasen involviert sind.

Es zeigte sich eine Sensitivität der hyperosmotischen Unterdrückung der 4E-BP1-Phosphorylierung gegenüber dem breit wirkenden Proteinkinase-Inhibitor H7 (Abb. 3.6). H7 ist nicht nur als allgemeiner Proteinkinase-Inhibitor bekannt, sondern wird auch als Proteinkinase C (PKC)-Inhibitor beschrieben (Kawamoto & Hidaka, 1984; Quick et al., 1992). Aus diesem Grund wurde die Rolle der PKCs an dem hier untersuchten Effekt genauer beleuchtet. Dazu wurden die PKC Inhibitoren Rottlerin, PKC $\zeta$ -inhibitorischen Peptid sowie Gö 6850 eingesetzt, jedoch konnte der Effekt des H7 nicht imitiert werden (Abb. 3.7). Dies lässt darauf schließen, dass die Wirkung des Proteinkinase-Inhibitors H7 auf die hyperosmotisch verminderte 4E-BP1-Phosphorylierung nicht durch eine Inhibierung der PKC beruht, sondern auf die Inhibition einer anderen Kinase zurückzuführen ist. Tatsächlich zeigt H7 ein breites Wirkungsspektrum (Galdiero et al., 2006; Aihara et al., 200).

Hyperosmolarität führt in der Leber zu einer Steigerung des allgemeinen Proteinabbaus (Häussinger, 1996). Eine im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Hypothese zum Mechanismus der hyperosmotisch induzierten Verminderung der 4E-BP1-Phos-

phorylierung war daher, dass es unter hyperosmotischen Bedingungen zu einem beschleunigten Abbau des 4E-BP1 kommt und dass dabei phosphoryliertes 4E-BP1 durch *de novo* synthetisiertes unphosphoryliertes 4E-BP1 ersetzt wird. Dies könnte sich in der Western Blot-Analyse als „Dephosphorylierung“ des 4E-BP1 unter hyperosmotischen Bedingungen darstellen. Diese Hypothese musste jedoch verworfen werden. Weder lies sich die Osmosensitivität durch die Inhibierung des proteasomalen oder autophagischen 4E-BP1-Abbaus beeinträchtigen (Abb. 3.9), noch beeinflusste eine Inhibition der *de novo* Proteinsynthese (Abb. 3.8) die Osmosensitivität der 4E-BP1-Phosphorylierung.

Bekannt ist allerdings, dass in apoptotischen Maus- und Rattenfibroblasten Caspasen zu einer 4E-BP1-Spaltung führen (Tee & Proud, 2000) und dass die Caspase-Aktivität in Hepatozyten (Reinehr et al., 2002) und H4IIE-Zellen (Lornejad-Schäfer et al., 2005) durch Hyperosmolarität erhöht wird. Trotzdem konnte mit Hilfe des Pan-Caspase Inhibitors Z-VAD-FMK als auch des Caspase 3-spezifischen Inhibitors Z-DEVD-FMK die hyperosmotische Unterdrückung der 4E-BP1-Phosphorylierung nicht gehemmt werden (Abb. 3.6). Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass es unter hyperosmotischen Bedingungen weder zu einem beschleunigten proteasomalen, noch zu einem autophagischen oder durch Caspase-induzierten Abbau des phosphorylierten 4E-BP1 kommt.

In Rattenhepatozyten sind oxidativer und osmotischer Stress eng miteinander assoziiert, da auf der einen Seite hyperosmotische Zellschrumpfung zu einer ROS (*reactiv oxygen species*)-Produktion führt (Reinehr et al., 2003) und auf der anderen Seite ROS eine Zellschrumpfung induzieren (Hallbrucker et al., 1993; Saha et al., 1993). Man kann sich daher vorstellen, dass osmotischer und oxidativer Stress im Rahmen sich gegenseitig verstärken und einen autoamplifikatorischen *Loop* bilden, der durch das antioxidative und das volumenregulatorische Potenzial der Zellen limitiert wird. Es ist bereits bekannt, dass die hyperosmotische Induktion der MKP-1 mRNA-Expression in H4IIE-Zellen sensitiv gegenüber Antioxidantien ist (Schliess et al., 1998), was darauf hindeutet, dass Hyperosmolarität eine ROS-Produktion auch in diesen Zellen induziert. Eine Beteiligung des oxidativen Stresses an der hyperosmotisch reduzierten 4E-BP1-Phosphorylierung in H4IIE Rattenhepatomzellen ist daher denkbar. Mittels eines spezifischen ROS-Fluoreszenz-Farbstoffes, DCF-DA (Sanchez et al., 1999) konnte in der hier vorgelegten Arbeit eine durch Hyperosmolarität induzierte ROS-Produktion nachgewiesen werden (Abb. 3.10). Diese zeigte eine

Sensitivität gegenüber den Antioxidantien Epigallocatechin Gallat (EGCG) und Selenoprotein P (SeP) sowie dem Superoxid-Dismutase-Mimetikum MnTBAP (Abb. 3.11). Hyperosmolarität induzierte aber nicht nur die Bildung von ROS, sondern auch die von Stickstoffmonoxid (NO). Mittels eines zweiten Fluoreszenz-Farbstoffs der spezifisch die NO Produktion nachweisen kann, DAF-FM (Kojima et al., 1999) konnte eine signifikante Inuktion der NO-Produktion, ausgelöst durch Hyperosmolarität, gemessen werden (Abb. 3.12). Diese lies sich durch den NO-Synthase (NOS)-Hemmstof, L-NMMA blockieren, was auf eine NOS-katalysierte NO-Produktion unter hyperosmotischen Bedingungen hinweist, während eine nicht-enzymatische NO-Freisetzung aus nitrosylierten Proteinen offenbar keine Rolle spielt (Abb. 3.12).

Die Beteiligung der hyperosmotisch verursachten ROS- oder NO-Produktion an der Unterdrückung der 4E-BP1-Phosphorylierung wurde anhand von weiteren Experimenten näher beleuchtet. Es stellte sich heraus, dass nur die Antioxidans EGCG auch auf Ebene der 4E-BP1-Phosphorylierung einen Effekt ausübte (Abb. 3.13; 3.14). Die anderen verwendeten Verbindungen L-NMMA, Katalase, Harnsäure, Trolox, Desferoxamin, MnTBAP sowie das SeP waren ohne Effekt auf die hyperosmotisch verminderte 4E-BP1-Phosphorylierung. Daher ist anzunehmen, dass der Effekt des EGCG auf die 4E-BP1-Phosphorylierung nicht auf seine antioxidativen Eigenschaften zurück zu führen ist.

EGCG ist ein Lebensmittelbestandteil in z.B. grünem Tee, schwarzer Schokolade, Rotwein oder Granatäpfeln und aktiviert eine Fülle möglicher Wirkungsmechanismen (Waltner-Law et al., 2002). Es weißt neben der antioxidativen u.a. auch eine Wirkung als  $p38^{MAPK}$  Inhibitor auf (Bain et al., 2003). In Anbetracht der Tatsache, dass Hyperosmolarität in H4IIE-Zellen MAP-Kinasen aktiviert (Schliess et al., 1998), konnte eine Beteiligung der MAPK an dem *Osmosignaling* zu 4E-BP1 angenommen werden. Daher wurde mittels spezifisch wirkender MAPK-Inhibitoren die Beteiligung der  $p38^{MAPK}$  (durch SB 203580), der  $Erk-1/2^{MAPK}$  (durch MEK Inhibitor PD 98059) sowie der  $JNKs^{MAPK}$  (durch SP 60125) ausgeschlossen (Abb. 3.15), da keiner der Inhibitoren die hyperosmotisch verminderte 4E-BP1-Phosphorylierung zu verhindern vermochte. Die EGCG-vermittelte Inhibierung der hyperosmotisch induzierten Abnahme der 4E-BP1-Phosphorylierung muss daher auf eine andere Eigenschaft des EGCG zurück zu führen sein.

Zur genaueren Charakterisierung wurde daher der Effekt des EGCGs unter normo- und hyperosmotischen Bedingungen auf weitere Komponenten des mTOR-Signalweges untersucht. Es ist zum einen bekannt, dass EGCG eine antidiabetische Wirkung in Ratten aufweist, indem es eine Insulin-ähnliche Wirkung bezüglich der Hemmung der hepatischen Glukoneogenese und der Reduktion des Blutzuckerspiegels verursacht (Waltner-Law et al., 2002; Collins et al., 2007) und zum anderen, daß EGCG zu einer erhöhten Insulinsensitivität führt (Potenza et al., 2007; Collins et al., 2007). Daher wurde der Effekt des EGCG auf die Komponenten des mTOR-Signalweges auch in Gegenwart von Insulin untersucht (Abb. 3.16). Es konnte in der vorgelegten Arbeit zum einen gezeigt werden, dass die hyperosmotisch induzierte Verminderung der Phosphorylierung der für die mTOR-Aktivierung relevanten Positionen Ser<sup>2448</sup> und Ser<sup>2481</sup> (Reynolds et al., 2002; Navé et al., 1999; Peterson et al., 2000), als auch die hyperosmotische Verminderung der mTOR-Effektoren 4E-BP1 und p70 S6-Kinase, in Ab- und Anwesenheit von Insulin durch EGCG antagonisiert wurden. Zum anderen konnte eine mTOR-Phosphorylierung an beiden Positionen durch EGCG stark gesteigert werden und zwar in Abwesenheit oder Gegenwart von Insulin (Abb. 3.16).

Insgesamt passen diese Ergebnisse zu einem in der Literatur beschriebenen Bild des EGCGs als gegen Insulin-sensibilisierende und antidiabetisch wirkende Substanz. Auch konnte hier zum ersten mal eine EGCG vermittelte mTOR-Aktivierung in H4IIE-Zellen festgestellt werden.

#### **4.2 Rolle von Aminosäuren für die Sensitivität des mTOR-Signalweges gegen Hyperosmolarität**

Für eine vollständige mTOR-Aktivierung ist das Vorhandensein von intrazellulären Aminosäuren, insbesondere Leucin (Shigemitsu et al., 1999; Lynch et al., 2000) erforderlich, welche ein von PI 3 Kinase und PKB unabhängiges *Signaling* zu mTOR aktivieren (van Sluijters et al., 2000). Prinzipiell sind zwei Möglichkeiten der Beteiligung von Aminosäuren an der der hyperosmotischen Unterdrückung des mTOR-Signalweges denkbar. Zum einen könnten hyperosmotisch bedingte Veränderungen des intrazellulären Aminosäureprofils eine verminderte Aktivität des mTOR-Signalweges verursachen. Zum anderen könnte Hyperosmolarität die Effizienz von Aminosäuren herabsetzen hinsichtlich der Aktivierung mTOR-abhängiger Signale.

Ein im Rahmen dieser Arbeit erstelltes Aminosäureprofil von H4IIE-Zellen unter normo-, hypo- und hyperosmotischen Bedingungen zeigte, dass die Leucinkonzentration durch die Osmolaritätsveränderungen nicht signifikant beeinflusst wurde (Tab. 3.1/Abb. 3.17) und daher eine hyperosmotisch vermittelte Leucin-Ausschüttung oder Akkumulation nicht an der Vermittlung der Osmosensitivität der 4E-BP1-Phosphorylierung beiträgt. Bei der Betrachtung der sich insgesamt veränderten Aminosäurekonzentrationen ließ sich feststellen, dass Hypoosmolarität zu einer signifikant reduzierten Gesamt-Aminosäurekonzentration führte (Tab. 3.1). Keine Veränderung der Gesamtkonzentration der gemessenen Aminosäuren ließ sich jedoch unter hyperosmotischen Bedingungen zeigen. Bis auf Glycin und Arginin wurden alle restlichen gemessenen Aminosäuren in ihrer Konzentration durch hyperosmotische Exposition nicht signifikant verändert. Es kam insgesamt somit zu keiner Ausschüttung von intrazellulären Aminosäuren, auf die eine Herabregulation der mTOR-Aktivität durch Hyperosmolarität zurückgeführt werden könnte.

Leucin ist ein wichtiger mTOR-Aktivator (Shigemitsu et al., 1999; Lynch et al., 2000). Eine Annahme war daher, dass eine durch Hyperosmolarität verursachte Leucin-Resistenz ein Mechanismus bei der hyperosmotischen Herabregulation der Aktivität von mTOR und dessen Effektoren sein könnte. In einem weiteren Experiment wurden daher die H4IIE-Zellen in Medium ohne Aminosäurezusatz gehalten und mit Leucin stimuliert. Es zeigte sich, dass die Sensitivität der 4E-BP1- und p70 S6-Kinasen-Phosphorylierung durch Leucin unter normo- und hyperosmotischen Bedingungen nicht unterschiedlich war (Abb. 3.19). Da H4IIE-Zellen durch autophagische Proteolyse zelleigene Proteine abbauen und so intrazelluläre Aminosäuren selbst generieren können (Blommaart et al., 1997; Shigemitsu et al., 1999), wurde das Experiment auch in Gegenwart von Wortmannin, welches die autophagische Proteolyse inhibiert (Shigemitsu et al., 1999; Häussinger et al., 1999) durchgeführt. Dadurch änderte sich jedoch das beschriebene Bild der 4E-BP1- und 70S6-Kinasen-Phosphorylierung durch Leucin nicht.

Insulin-induzierte eine signifikante Phosphorylierung des 4E-BP1 und der p70 S6-Kinase auch in Abwesenheit von den im Medium zugesetzten Aminosäuren (Abb. 3.19). Hyperosmolarität führte auch unter dieser Bedingung zu einer Abnahme der Phosphorylierung beider Effektoren durch Insulin. In Gegenwart von Wortmannin wird das Insulinsignal zu 4E-BP1 und p70 S6-Kinase durch die Inhibierung der PI 3 Kinase und möglicherweise auch durch die dadurch unterbundene intrazelluläre

Bereitstellung von Aminosäuren unterbrochen (Häussinger & Schliess, 1999; Cross et al., 1995) (Abb. 3.19). Insgesamt zeigen die hier diskutierten Daten, dass Hyperosmolarität nicht über die Entwicklung einer Leucin-Resistenz und zu einer Unterdrückung der 4E-BP1- und p70 S6-Kinasen-Phosphorylierung führt.

### **4.3 Osmosensitivität der Phosphorylierung von Signalproteinen des mTOR-Weges**

In einem weiteren Experiment wurde in Aminosäure-haltigem Medium neben der Phosphorylierung des 4E-BP1 und der p70 S6-Kinase auch die Osmosensitivität der Ser<sup>473</sup>-Phosphorylierung der PKB und der für die mTOR-Aktivierung relevanten Phosphorylierungen der Positionen Ser<sup>2448</sup> und Ser<sup>2481</sup> (Reynolds et al., 2002; Navé et al., 1999; Peterson et al., 2000) untersucht. Dabei wurden sowohl Insulin-stimulierte als auch nicht Insulin-stimulierte H4IIE-Zellen einbezogen. Interessanterweise zeigte sich in den H4IIE-Zellen in Abwesenheit von Insulin eine beachtliche basale und gegen Hyperosmolarität sensitive Phosphorylierung des 4E-BP1, während die PKB und die p70 S6-Kinase unter dieser Bedingung nur schwach phosphoryliert vorlagen (Abb. 3.18). Auch mTOR zeigte in Abwesenheit von Insulin lediglich eine schwache Ser<sup>2448</sup>- und Ser<sup>2481</sup> Phosphorylierung, die jedoch durch Hyperosmolarität weiter vermindert war. Denkbar ist daher, dass die hyperosmotische Unterdrückung der 4E-BP1-Phosphorylierung auf einen Effekt auf der Ebene des mTOR zurückgeführt werden kann.

Im Einklang mit früheren Befunden (Lornejad-Schäfer et al., 2003) verursachte Insulin in den H4IIE-Zellen eine markante PKB Ser<sup>473</sup>-Phosphorylierung, die nicht osmosensitiv war und erwartungsgemäß durch Wortmannin (Hemmung der PI 3-Kinase) vollständig verhindert wurde, während die 4E-BP1-Phosphorylierung nur schwach herabgesetzt war und deren Osmosensitivität erhalten blieb. Dagegen fiel die Phosphorylierung der p70 S6-Kinase in Gegenwart von Wortmannin auf Basalniveau ab (Abb. 3.18). Ein vergleichbares Ergebnis wurde auch in den mit Rapamycin behandelten H4IIE-Zellen erhalten. Zusammenfassend kann aus diesen Ergebnissen gefolgert werden, dass die recht hohe basale Phosphorylierung des 4E-BP1 in H4IIE-Zellen nicht über den PI 3-Kinase/ PKB-Weg und auch nicht über Rapamycin-sensitive mTOR-Signale zustande kommt. Weiterhin wird die Osmosensitivität der 4E-BP1- und der p70 S6-Kinase-Phosphorylierung nicht über den PI 3-Kinase/PKB-

Signalweg vermittelt und auch gegen Rapamycin sensitive mTOR-Signale spielen zumindest bei der Beeinflussung der 4E-BP1-Phosphorylierung durch Hyperosmolarität keine Rolle. Da die mTOR-regulierte 4E-BP1-Phosphorylierung der Literatur nach zu folgen Rapamycin sensitiv ist (Harris & Lawrence, 2003; Proud, 2005), liegt es nun Nahe, dass die Regulation der 4E-BP1-Phosphorylierung partiell auch über eine andere Instanz kontrolliert wird. Grundsätzlich kann 4E-BP1 auch durch Proteinkinase C (PKC), MAPK oder Casein Kinase II phosphoryliert werden (Haystead et al., 1994, Gingras et al., 1999; Kimball & Horetsky, 2001; Takata et al., 1999). Da in dieser Arbeit bereits eine Beteiligung der MAPK und der PKC ausgeschlossen werden konnte, wäre es denkbar, dass Casein Kinase II, zumindest partiell an der hyperosmotischen Regulation der 4E-BP1-Phosphorylierung beteiligt ist. Die Casein Kinase II ist bislang jedoch nicht mit osmosensitiver Signaltransduktion in Verbindung gebracht worden.

#### **4.4 Rolle der AMP-aktivierten Proteinkinase bei der hyperosmotischen Regulation des mTOR-Signalweges**

In verschiedenen Zelllinien, wie CHO oder *Clone 9* Zellen, konnte bereits eine hyperosmotische Aktivierung der *AMP-activated-Proteinkinase* (AMPK) gezeigt werden (Mao et al., 2004, Smith et al., 2005; Xi et al., 2001). Da die AMPK als inhibierender Regulator des mTOR-Signalings beschrieben wurde (Violett et al., 2006; Bae et al., 2007; Towler & Hardie, 2007), könnte eine hyperosmotische AMPK-Aktivierung zu einer verminderten Phosphorylierung von mTOR-Effektoren in den H4IIE-Zellen führen. Mittels eines Aktivitäts-Assays konnte in der vorliegenden Arbeit in H4IIE-Zellen eine signifikante AMPK-Aktivierung durch Hyperosmolarität nachgewiesen werden (Abb. 3.20). Die Aktivierungsstärke entsprach der, die durch die AMPK-Aktivatoren AICAR (Corton et al., 1995) und Metformin (Zhou et al., 2001) in den H4IIE-Zellen erreicht wurden. Mittels des AMPK-Inhibitors, *Compound C* (Zhou et al., 2001) konnte die Aktivierung durch Hyperosmolarität, AICAR oder Metformin verhindert und die AMPK-Aktivität sogar unter den basalen Wert reprimiert werden (Abb. 3.20). Ein Zusammenhang der AMPK-Aktivität und dem Phosphorylierungszustand des 4E-BP1 konnte gezeigt werden, indem die Wirkung der AMPK-Aktivatoren und der *Compound C* auf die 4E-BP1-Phosphorylierung betrachtet wurde (Abb. 3.22). Die Aktivierung der AMPK durch AICAR oder Metformin war dabei mit

einer signifikanten Verminderung der 4E-BP1-Phosphorylierung assoziiert. Durch Inhibierung der AMPK mittels Compound C konnte diese vollständig verhindert werden. Die AMPK ist daher grundsätzlich zur Regulation der 4E-BP1-Phosphorylierung fähig. Es war nun nahe liegend, dass eine AMPK-Aktivierung (Abb. 3.20) auch an der hyperosmotisch verminderten 4E-BP1- und p70 S6-Kinase-Phosphorylierung beteiligt ist. Die hyperosmotische Verminderung der 4E-BP1-Phosphorylierung konnte in der Tat durch Compound C vollständig aufgehoben werden (Abb. 3.23). Auffällig war, dass die basale 4E-BP1-Phosphorylierung in Gegenwart von Compound C in einem Maße erhöht wurde, wie es sonst nur durch Insulin zu sehen war. Das gleiche Bild zeigte sich auch bei dem zweiten mTOR-Effektor, p70 S6-Kinase. Bislang war die Phosphorylierung der p70 S6-Kinase erst durch eine starke Induktion wie z.B. durch Insulin sichtbar (Abb. 3.18), wobei hier eine vergleichbare Induktion durch Compound C erzielt wurde (Abb. 3.23). Unter zusätzlicher Hyperosmolarität blieb eine signifikante p70 S6-Kinase Phosphorylierung jedoch aus, was darauf hindeutet, dass die Inhibierung der AMPK zwar die Phosphorylierung der p70 S6-Kinase *per se* erhöht, allerdings nicht mit der Osmosenstivität der p70 S6-Kinasen-Phosphorylierung assoziiert ist.

Insgesamt zeigen diese Daten, dass die Inhibierung der AMPK zu einer Zunahme der Phosphorylierung der mTOR-Effektoren 4E-BP1 und p70 S6-Kinase führte, was für eine erhöhte mTOR-Aktivität spricht. In der Literatur ist bereits beschrieben, dass die AMPK direkten Einfluss auf die mTOR-Aktivität nehmen kann. Der genaue Mechanismus ist zwar noch weitgehend unbekannt, jedoch ist eine direkte Inhibierung durch Phosphorylierung des mTOR an Position Ser<sup>2446</sup> (Violet et al., 2006) als auch eine indirekte Inhibierung durch Inaktivierung des Tuberins (TSC2) (Towler & Hardie, 2007) bekannt. Durch Inhibierung der AMPK-Aktivität bleibt folglich die mTOR-Repression aus und es kommt zu einer erhöhten basalen mTOR-Aktivität, welche sich in einer erhöhten Effektor-Phosphorylierung (Abb. 3.23) zeigt.

Ferner ist die durch Hyperosmolarität induzierte AMPK-Aktivierung an der hyperosmotisch verminderten 4E-BP1-Phosphorylierung maßgeblich beteiligt, während die Osmosenstivität der p70 S6-Kinasen-Phosphorylierung scheinbar davon unabhängig verläuft. D.h. die Osmosenstivität der 4E-BP1-Phosphorylierung ist AMPK vermittelt und verläuft nicht über mTOR.

Wie In Abschnitt 3.3.2 (Abb. 3.16) gezeigt ist, konnte die hyperosmotisch verminderte 4E-BP1-Phosphorylierung durch EGCG antagonisiert werden. Es wäre denkbar,

dass EGCG über eine Inhibition der AMPK die hyperosmotische Verminderung der 4E-BP1-Phosphorylierung antagonisiert. Der AMPK-Aktivitäts Assay zeigte jedoch (Abb. 3.21), dass EGCG unter der normoosmotischen Kontrollbedingung konzentrationsabhängig zu einer AMPK-Aktivierung führte, welche die hyperosmotisch induzierte Aktivierung sogar noch übertraf und durch die Compound C verhindert werden konnte. Die hier in H4IIE-Zellen gefundene AMPK-Aktivierung durch EGCG konnte in anderen Zelltypen auch von anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden. So konnte bereits in humanen Hepatomzellen, HepG2 eine EGCG vermittelte AMPK-Aktivierung nachgewiesen werden (Collins et al., 2007). Interessanterweise bestätigte sich dennoch die in der vorliegenden Arbeit verfolgte Annahme, da EGCG die AMPK-Aktivität unter hyperosmotischen Bedingungen blockierte (Abb. 3.22). Das bedeutet, dass EGCG zwar einen aktivierenden Eigeneffekt auf die AMPK hat, trotzdem aber die hyperosmotische AMPK-Aktivierung unterdrückt, was die Verhinderung der hyperosmotisch verminderten 4E-BP1-Phosphorylierung durch EGCG erklären kann.

Interessanterweise ist die unter normoosmotischen Bedingungen durch EGCG verursachte AMPK-Aktivierung nicht mit einer Unterdrückung der 4E-BP1-Phosphorylierung assoziiert, so dass anzunehmen ist, dass die AMPK hier in ihrer Wirkung auf 4E-BP1 durch andere EGCG-aktivierte Mechanismen dominiert wird.

#### **4.5 *Hyperosmotische Regulation der Cyclin D1- und IGFBP 1-Expression***

Die Folgen einer hyperosmotisch bedingten Dehydratation und der damit assoziierten Repression von Komponenten des mTOR-Signalweges wurden am Beispiel des Cyclin D1, eines bekanntermaßen mTOR- und 4E-BP1-abhängig translatierten Proteins (Thomas et al., 2006) untersucht. Die Expression des Cyclin D1 Proteins zeigte eine hyperosmotisch induzierte Unterdrückung (Abb. 3.24) und auch die Insulin-induzierte Cyclin D1-Protein-Expression war durch Hyperosmolarität reprimiert. Allerdings blieb der hyperosmotische Effekt auf die Cyclin D1-Expression unbeeinflusst von Substanzen, welche die hyperosmotische Verminderung der 4E-BP1-Phosphorylierung verhinderten (EGCG, H7, Compound C). Dies lässt vermuten, dass die Osmosensitivität der Cyclin D1-Protein-Expression von anderen Mechanismen als die Suppression der 4E-BP1-Phosphorylierung bestimmt wird. Dass die

Osmosensitivität der Cyclin D1-Expression sich auf dem Translationsniveau manifestiert ist wahrscheinlich, da bereits eine hyperosmotisch induzierte Erhöhung des Cyclin D1 mRNA-Expressionsniveaus gezeigt wurde (Schäfer et al., 2007).

Das *Insulin-like-growth-factor-binding-Protein 1* (IGFBP 1) ist ein weiteres Protein, dessen Expression mTOR-abhängig reguliert ist. IGFBP 1 wird von der Leberzelle synthetisiert und in den Extrazellularraum sezerniert. Dort bindet es den *Insulin-like growth factor* (IGF1), verhindert so die Bindung von IGF1 an seinen Rezeptor und die darauf folgende anabol und proliferativ wirkende Signaltransduktion, wie sie durch IGF1 beispielsweise im Rahmen der Leberregeneration aktiviert wird (Baxter, 2000). Es ist bekannt, dass die Inhibition der mTOR-Aktivität eine gesteigerte Igfbp 1 mRNA-Expression mit sich bringt, und umgekehrt eine Aktivierung des mTORs durch Insulin zu einer starken Herunterregulation der Igfbp 1 mRNA-Expression führt, wobei diese Herabregulation mTOR-vermittelt ist, da sie durch Rapamycin fast vollständig aufgehoben werden kann (Patel et al., 2002). Dieses mTOR-abhängige Verhalten der Igfbp 1 mRNA-Expression konnte in dieser Arbeit anhand von RT-PCR-Daten bestätigt werden (Abb. 3.25). Ferner führte Hyperosmolarität, ähnlich wie die mTOR-Inhibition und im Einklang mit früher mittels DNA-Array- und Northern-Blot-Analyse erhobenen Befunden (Schäfer et al., 2007), zu einem signifikanten Igfbp 1 mRNA-Expressionsanstieg (Abb. 3.26). In diesen Zusammenhang konnte in der hier vorliegenden Arbeit auch gezeigt werden, dass die Insulin-induzierte Igfbp 1-Repression durch Hyperosmolarität signifikant antagonisiert wurde (Abb. 3.26).

EGCG sowie der AMPK-Inhibitor Compound C zeigten nicht nur eine mTOR-Aktivierung anhand der gesteigerten basalen Phosphorylierung der Effektoren, sondern konnten die hyperosmotische Verminderung der 4E-BP1-Phosphorylierung unterdrücken (Abb. 3.16/3.23). Es ist daher denkbar, dass diese Substanzen auch die hyperosmotische Heraufregulation der Igfbp 1 mRNA-Expression antagonisieren. In der Literatur ist bereits ein Zusammenhang zwischen der AMPK und der IGFBP 1-Protein-Expression gezeigt (Lewitt et al., 2001a,b). In dieser Arbeit wurde beschrieben, dass die IGFBP 1-Protein-Expression durch den AMPK-Aktivator AICAR signifikant gesteigert wurde. Die hier vorgelegten Daten zeigen, dass der AMPK-Aktivator Metformin zu einem signifikanten Anstieg der Igfbp1 mRNA-Expression führte, welcher durch den AMPK-Inhibitor Compound C vollständig antagonisiert wurde (Abb. 3.27). Dies zeigt eine direkte Beteiligung der AMPK an der Igfbp 1 mRNA-

Expression in den H4IIE-Zellen. Compound C verursachte außerdem eine Herabsetzung der basalen Igfbp1-Expression. Auch die hyperosmotische Stimulation der Igfbp 1 mRNA-Expression wurde durch die Compound C antagonisiert. Insgesamt belegen die Daten, dass die Sensitivität der Igfbp 1 mRNA-Expression gegen Hyperosmolarität über eine Aktivierung der AMPK vermittelt ist (Abb. 3.27). Auch EGCG, welches die AMPK-Aktivität unter hyperosmotischen Bedingungen hemmt (Abb. 3.21) verhinderte ebenfalls die hyperosmotische Induktion der Igfbp 1 mRNA-Expression (Abb. 3.27).

Insgesamt kann man sagen, dass die durch Compound C und EGCG erzielten Repressionen der Igfbp 1 mRNA-Expression (Abb. 3.27) mit den bereits gewonnenen Daten bezüglich der mTOR-Aktivierung im Einklang stehen (Abb. 3.16/3.23). So liegt nun nahe, dass auch hier über eine EGCG bzw. Compound C induzierte mTOR-Aktivitäts-Steigerung die gemessene Igfbp 1-Repression eingeleitet wurde. Eine Induktion der IGF1-Expression durch Hyperosmolarität könnte die Signaltransduktion des IGF1 inhibieren und so die mitogenen, antiapoptotischen und metabolischen Effekte des IGF1 inhibieren (Schäfer et al., 2007).

#### **4.6 Einfluss von Hyperosmolarität und Rapamycin auf das Genexpressionsprofil in humanen Hepatomzellen**

Um global hyperosmotisch veränderte Genexpressionen mit der durch mTOR-Inhibierung veränderten Genexpression vergleichen zu können und so eine Aussage darüber treffen zu können, in welchem Ausmaß eine Suppression Rapamycin-sensitiver mTOR-Signale an einem hyperosmotisch erzeugten Genexpressionsprofil beteiligt ist, wurde ein im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 575 „Experimentelle Hepatologie“ selbst hergestellter Oligonukleotid Array eingesetzt, mit dem gleichzeitig über 1500 Gentranskripte der Leber betrachtet werden können. Da die hier verwendeten Huh7-Zellen eine hyperosmotisch verminderte 4E-BP1-Phosphorylierung erst oberhalb von 505 mosmol/L zeigten (Abb. 3.28), wurde die Osmolarität für die Array-Experimente auf diesen Wert erhöht. Unter dieser Bedingung entsprach das Ausmaß der 4E-BP1-Dephosphorylierung dem durch Rapamycin erzeugten (Abb. 3.28). Das Ziel war es eine Schnittmenge durch Hyperosmolarität und Rapamycin gleichsinnig regulierter Gene zu identifizieren.

Überraschenderweise stellte sich heraus, dass lediglich 45 gemeinsame Transkripte sowohl durch Hyperosmolarität als auch durch Rapamycin reguliert wurden. Davon waren nur 9 durch Hyperosmolarität und Rapamycin gleichsinnig, während verbleibende 36 Transkripte durch Hyperosmolarität und Rapamycin gegenläufig reguliert wurden (Tab. 3.3/3.4).

Auffällig war, dass von den 9 gleichsinnig regulierten Transkripten 8 herunterreguliert wurden (Tab. 3.4). Auch auffallend war, dass sich die meisten, nämlich CENPF (Cetromer Protein F), DDX24 (*Deadbox* Polypeptid 24), DDX42 (*Deadbox* Polypeptid 41), HNRPUL1 (*Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like 1*) sowie OAS1 (2',5'-oligoadenylate synthetase 1) auf den Nukleinsäure-Metabolismus eingrenzen ließen. Drei von den 9 Transkripten kodieren außerdem für Transferasen, wie z.B. MAT2A (Methionine Adenosyltransferase 2 $\alpha$ ), das für eine Methionin-Transferase kodiert und die Synthese von S-Adenosylmethionin (SAM) aus Methionin und ATP katalysiert. SAM ist ein Coenzym das am Transfer von Methylgruppen beteiligt ist. Die metabolischen Signalwege in denen SAM involviert ist, sind die Transmethylierung, Transsulfurierung und Aminopropylierung (Cantoni et al., 1957; Giulidori et al., 1984), die in anabolen Signalwegen eine Rolle spielen.

Die anderen beiden Transferasen nehmen ebenfalls eine Rolle im Nukleinsäure-Metabolismus ein. Dabei ist die OAS1 (2',5'-oligoadenylate synthetase 1) eine Nukleotidyl-Transferase, die im Allgemeinen als Phospho-Transferase an Nukleotiden agiert (Ferbus et al., 1982), während GART (Phosphoribosylglycinamide formyltransferase) in der *de novo* Purinsynthese involviert (Wöhlke et al., 2005) ist.

Diese Daten zeigen, dass die durch Hyperosmolarität und Rapamycin gleichsinnig regulierten Transkripte zum einen hauptsächlich herunterreguliert wurden und zum anderen hauptsächlich den Nukleinsäure-Metabolismus betreffen und dass dieser daher durch Hyperosmolarität und Rapamycin herunterreguliert vorliegt. Insgesamt präsentieren die Daten ein Bild, bei dem Rapamycin-sensitive mTOR-Signale keine globale Rolle bei der Vermittlung dehydratationsbedingter Genexpressionsveränderungen haben.

## 5 Zusammenfassung

Eine Dehydratation der Leberzelle fördert katabole Stoffwechselwege und Insulinresistenz. Zielsetzung dieser Arbeit war es, den Einfluss einer Dehydratation auf die Signaltransduktion via *mammalian target of rapamycin* (mTOR) und mögliche Konsequenzen für die mTOR-abhängig regulierte Genexpression zu untersuchen.

In H4IIE-Rattenhepatomzellen konnte gezeigt werden, dass eine hyperosmotisch herbeigeführte Dehydratation die Phosphorylierung des mTOR-Effektors *eukaryotic initiation factor 4E-binding protein* (4E-BP) 1 unterdrückt, während Hypoosmolarität eine Zunahme induziert. Der hyperosmotische Effekt wird dabei über eine Abnahme des Zellvolumens ausgelöst. Hyperosmolarität unterdrückt auch die Insulin-induzierte Phosphorylierung des 4E-BP1 und der p70 S6-Kinase, während die Phosphorylierung der von mTOR oberhalb lokalisierten PKB unbeeinflusst blieb. Hyperosmolarität aktiviert die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK), wobei die hyperosmotische Unterdrückung der 4E-BP1-Phosphorylierung durch die AMPK-Aktivatoren 5-Aminoimidazol-4-carboxamid-1- $\beta$ -D-ribofurosemid und Metformin imitiert werden kann. Ein Inhibitor der AMPK, Compound C kann dabei die Effekte von Hyperosmolarität und AMPK-Aktivatoren auf die 4E-BP1-Phosphorylierung aufheben. Auch das Flavonoid Epigallocatechin Gallat (EGCG) verhindert den hyperosmotischen Effekt auf 4E-BP1, was auf eine Inhibition der AMPK zurückgeführt werden konnte, wobei die antioxidative Wirkung von EGCG hierfür nicht bedeutend ist.

Hyperosmolarität steigert in H4IIE-Zellen die Expression der mTOR-abhängig transkribierten *insulin-like growth factor binding protein* (Igfbp) 1 mRNA und unterdrückt die Expression des mTOR-abhängig translatierten Cyclin D1. Während Compound C und EGCG die hyperosmotische Igfbp1 mRNA-Induktion aufheben, waren sie ohne Effekt auf die Repression der Cyclin D1-Expression. Dies spricht dafür, dass neben einer Unterdrückung von mTOR-Signalen weitere Mechanismen an der Modulation mTOR-abhängig exprimierter Gene durch Hyperosmolarität beteiligt sein können. Im Einklang damit zeigt die DNA-Array-basierte Analyse der Genexpressionsprofile hyperosmotisch und mit Rapamycin behandelte humaner Huh7-Hepatomzellen, dass der Unterdrückung von mTOR-Signalen keine globale Bedeutung für die Ausprägung eines dehydratationsbedingten Genexpressionsmusters zukommt.

## 6 Summary

Dehydration of the liver cell encourages catabolic metabolic pathways and insulin resistance. The aim of this study was to investigate the influence of dehydration on the signal transduction via *mammalian target of rapamycin* (mTOR) and possible consequences for mTOR-dependent regulated gene expression.

It could be shown in H4IIE rat hepatom cells that a hyperosmolarity induced dehydration suppresses the phosphorylation of the mTOR effector *eukaryotic initiation factor 4E-binding protein* (4E-BP) 1 while hypoosmolarity induces an increase. The hyperosmotic effect is triggered by a decrease in cell volume. Hyperosmolarity also suppresses the insulin-induced phosphorylation of the 4E-BP1 and the p70 S6-kinase while phosphorylation of the PKB localized above mTOR remained unaffected. Hyperosmolarity activates the AMP-activated protein kinase (AMPK) whereby the hyperosmotic suppression of the 4E-BP1-phosphorylation can be imitated by the AMPK activators 5-Aminoimidazol-4-carboxamid-1- $\beta$ -D-ribofurosemid and Metformin. An AMPK inhibitor, Compound C can abolish the effects of hyperosmolarity and AMPK activators on the 4E-BP1-phosphorylation. Also the Flavonoid Epigallocatechingallate (EGCG) prevents the hyperosmotic effect on 4E-BP1 which could be attributed to an inhibition of AMPK, whereby the antioxidative effect of EGCG is not significant for this.

Hyperosmolarity increases the expression in H4IIE cells of the mTOR-dependent transcribed *insulin-like growth factor binding protein* (Igfbp) 1 mRNA and suppresses the expression of the mTOR-dependent translated Cyclin D1. While Compound C and EGCG abolish the hyperosmotic Igfbp 1 mRNA induction, they are without an effect on the repression of Cyclin D1 expression. This suggests that, in addition to a suppression of mTOR signals, other mechanisms could be involved in the modulation by hyperosmolarity of mTOR-dependent expressed genes. In alignment with this, the DNA array-based analysis of gene expression profiles compares hyperosmotic-exposed human Huh7 hepatom cells with ones treated with Rapamycin and shows that the suppression of mTOR signals does not have global significance for the specification of a dehydration-caused gene expression pattern.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abler,A., Smith,J.A., Randazzo,P.A., Rothenberg,P.L., and Jarett,L.** (1992). Genistein differentially inhibits postreceptor effects of insulin in rat adipocytes without inhibiting the insulin receptor kinase. *J. Biol. Chem.* 267, 3946-3951.
- Aihara,Y., Kurabayashi,M., Tanaka,T., Takeda,S.I., Tomaru,K., Sekiguchi,K.I., Ohyama,Y., and Nagai,R.** (2000). Doxorubicin represses CARP gene transcription through the generation of oxidative stress in neonatal rat cardiac myocytes: possible role of serine/threonine kinase-dependent pathways. *J. Mol. Cell Cardiol.* 32, 1401-1414.
- Aplin,A.E., Howe,A., Alahari,S.K., and Juliano,R.L.** (1998). Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol. Rev.* 50, 197-263.
- Avruch,J., Lin,Y., Long,X., Murthy,S., and Ortiz-Vega,S.** (2005). Recent advances in the regulation of the TOR pathway by insulin and nutrients. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab Care* 8, 67-72.
- Bae,E.J., Yang,Y.M., Kim,J.W., and Kim,S.G.** (2007). Identification of a novel class of dithiolethiones that prevent hepatic insulin resistance via the adenosine monophosphate-activated protein kinase-p70 ribosomal S6 kinase-1 pathway. *Hepatology* 46, 730-739.
- Bain,J., McLauchlan,H., Elliott,M., and Cohen,P.** (2003). The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *Biochem. J.* 371, 199-204.
- Baxter,R.C.** (2000). Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: interactions with IGFs and intrinsic bioactivities. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab* 278, E967-E976.
- Blommaert,E.F., Krause,U., Schellens,J.P., Vreeling-Sindelarova,H., and Meijer,A.J.** (1997). The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* 243, 240-246.
- Bonfoco,E., Ceccatelli,S., Manzo,L., and Nicotera,P.** (1995). Colchicine induces apoptosis in cerebellar granule cells. *Exp. Cell Res.* 218, 189-200.
- Bradford,M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Bratusch-Marrain,P.R. and DeFronzo,R.A.** (1983). Impairment of insulin-mediated glucose metabolism by hyperosmolality in man. *Diabetes* 32, 1028-1034.
- Brunn,G.J., Williams,J., Sabers,C., Wiederrecht,G., Lawrence,J.C., Jr., and Abraham,R.T.** (1996). Direct inhibition of the signaling functions of the mammalian target of rapamycin by the phosphoinositide 3-kinase inhibitors, wortmannin and LY294002. *EMBO J.* 15, 5256-5267.
- Cantoni,G.L. and Durell,J.** (1957). Activation of methionine for transmethylation. II. The methionine-activating enzyme; studies on the mechanism of the reaction. *J. Biol. Chem.* 225, 1033-1048.
- Chen,D., Elmendorf,J.S., Olson,A.L., Li,X., Earp,H.S., and Pessin,J.E.** (1997). Osmotic shock stimulates GLUT4 translocation in 3T3L1 adipocytes by a novel tyrosine kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 272, 27401-27410.
- Clemens,M.J.** (2004). Targets and mechanisms for the regulation of translation in malignant transformation. *Oncogene* 23, 3180-3188.
- Collins,Q.F., Liu,H.Y., Pi,J., Liu,Z., Quon,M.J., and Cao,W.** (2007). Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a green tea polyphenol, suppresses hepatic gluconeogenesis through 5'-AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 282, 30143-30149.

- Corton,J.M., Gillespie,J.G., Hawley,S.A., and Hardie,D.G.** (1995). 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? *Eur. J. Biochem.* *229*, 558-565.
- Cross,M.J., Stewart,A., Hodgkin,M.N., Kerr,D.J., and Wakelam,M.J.** (1995). Wortmannin and its structural analogue demethoxyviridin inhibit stimulated phospholipase A2 activity in Swiss 3T3 cells. Wortmannin is not a specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.* *270*, 25352-25355.
- Dennis,P.B., Jaeschke,A., Saitoh,M., Fowler,B., Kozma,S.C., and Thomas,G.** (2001). Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor. *Science* *294*, 1102-1105.
- Duan,C., Liimatta,M.B., and Bottum,O.L.** (1999). Insulin-like growth factor (IGF)-I regulates IGF-binding protein-5 gene expression through the phosphatidylinositol 3-kinase, protein kinase B/Akt, and p70 S6 kinase signaling pathway. *J. Biol. Chem.* *274*, 37147-37153.
- Dubbelhuis,P.F. and Meijer,A.J.** (2002). Hepatic amino acid-dependent signaling is under the control of AMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett.* *521*, 39-42.
- Eddinger,A.L. and Thompson,C.B.** (2004). An activated mTOR mutant supports growth factor-independent, nutrient-dependent cell survival. *Oncogene* *23*, 5654-5663.
- Ferbus,D., Justesen,J., Besancon,F., and Thang,M.N.** (1981). The 2'5' oligoadenylate synthetase has a multifunctional 2'5' nucleotidyl-transferase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *100*, 847-856.
- Galdiero,M., Vitiello,M., D'Isanto,M., Raieta,K., and Galdiero,E.** (2006). STAT1 and STAT3 phosphorylation by porins are independent of JAKs but are dependent on MAPK pathway and plays a role in U937 cells production of interleukin-6. *Cytokine* *36*, 218-228.
- Ghafourifar,P., Bringold,U., Klein,S.D., and Richter,C.** (2001). Mitochondrial nitric oxide synthase, oxidative stress and apoptosis. *Biol. Signals Recept.* *10*, 57-65.
- Gingras,A.C., Gygi,S.P., Raught,B., Polakiewicz,R.D., Abraham,R.T., Hoekstra,M.F., Aebersold,R., and Sonenberg,N.** (1999). Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Genes Dev.* *13*, 1422-1437.
- Gingras,A.C., Kennedy,S.G., O'Leary,M.A., Sonenberg,N., and Hay,N.** (1998). 4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway. *Genes Dev.* *12*, 502-513.
- Gingras,A.C., Raught,B., Gygi,S.P., Niedzwiecka,A., Miron,M., Burley,S.K., Polakiewicz,R.D., Wyslouch-Cieszynska,A., Aebersold,R., and Sonenberg,N.** (2001). Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1. *Genes Dev.* *15*, 2852-2864.
- Gingras,A.C., Raught,B., and Sonenberg,N.** (2004). mTOR signaling to translation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *279*, 169-197.
- Giuliodori,P., Galli-Kienle,M., Catto,E., and Stramentinoli,G.** (1984). Transmethylation, transsulfuration, and aminopropylation reactions of S-adenosyl-L-methionine in vivo. *J. Biol. Chem.* *259*, 4205-4211.
- Gordon,J.A.** (1991). Use of vanadate as protein-phosphotyrosine phosphatase inhibitor. *Methods Enzymol.* *201*, 477-482.
- Graf,D., Kohlmann,C., Haselow,K., Gehrman,T., Bode,J.G., and Häussinger,D.** (2006). Bile acids inhibit interleukin-6 signaling via gp130 receptor-dependent and -independent pathways in rat liver. *Hepatology* *44*, 1206-1217.

- Hallbrucker,C., Ritter,M., Lang,F., Gerok,W., and Häussinger,D.** (1993). Hydroperoxide metabolism in rat liver.  $K^+$  channel activation, cell volume changes and eicosanoid formation. *Eur. J. Biochem.* *211*, 449-458.
- Hannan,K.M., Brandenburger,Y., Jenkins,A., Sharkey,K., Cavanaugh,A., Rothblum,L., Moss,T., Poortinga,G., McArthur,G.A., Pearson,R.B., and Hannan,R.D.** (2003). mTOR-dependent regulation of ribosomal gene transcription requires S6K1 and is mediated by phosphorylation of the carboxy-terminal activation domain of the nucleolar transcription factor UBF. *Mol. Cell Biol.* *23*, 8862-8877.
- Hardie,D.G., Haystead,T.A., and Sim,A.T.** (1991). Use of okadaic acid to inhibit protein phosphatases in intact cells. *Methods Enzymol.* *201*, 469-476.
- Harris,T.E. and Lawrence,J.C., Jr.** (2003). TOR signaling. *Sci. STKE.* *2003*, 15.
- Häussinger,D.** (1996). The role of cellular hydration in the regulation of cell function. *Biochem. J.* *313*, 697-710.
- Häussinger,D., Kubitz,R., Reinehr,R., Bode,J.G., and Schliess,F.** (2004). Molecular aspects of medicine: from experimental to clinical hepatology. *Mol. Aspects Med.* *25*, 221-360.
- Häussinger,D., Kurz,A.K., Wettstein,M., Graf,D., vom Dahl,S., and Schliess,F.** (2003). Involvement of integrins and Src in tauroursodeoxycholate-induced and swelling-induced choleresis. *Gastroenterology* *124*, 1476-1487.
- Häussinger,D. and Lang,F.** (1991). Cell volume in the regulation of hepatic function: a mechanism for metabolic control. *Biochim. Biophys. Acta* *1071*, 331-350.
- Häussinger,D. and Lang,F.** (1992). Cell volume and hormone action. *Trends Pharmacol. Sci.* *13*, 371-373.
- Häussinger,D., Lang,F., and Gerok,W.** (1994a). Regulation of cell function by the cellular hydration state. *Am. J. Physiol* *267*, E343-E355.
- Häussinger,D. and Schliess,F.** (1999). Osmotic induction of signaling cascades: role in regulation of cell function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *255*, 551-555.
- Häussinger,D. and Schliess,F.** (2007). Glutamine metabolism and signaling in the liver. *Front Biosci.* *12*, 371-391.
- Häussinger,D., Schliess,F., Warskulat,U., and vom Dahl,S.** (1997). Liver cell hydration. *Cell Biol. Toxicol.* *13*, 275-287.
- Häussinger,D., Stehle,T., and Lang,F.** (1990). Volume regulation in liver: further characterization by inhibitors and ionic substitutions. *Hepatology* *11*, 243-254.
- Häussinger,D., Stoll,B., vom Dahl,S., Theodoropoulos,P.A., Markogiannakis,E., Gravanis,A., Lang,F., and Stournaras,C.** (1994b). Effect of hepatocyte swelling on microtubule stability and tubulin mRNA levels. *Biochem. Cell Biol.* *72*, 12-19.
- Hay,N. and Sonenberg,N.** (2004). Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.* *18*, 1926-1945.
- Haystead,T.A., Haystead,C.M., Hu,C., Lin,T.A., and Lawrence,J.C., Jr.** (1994). Phosphorylation of PHAS-I by mitogen-activated protein (MAP) kinase. Identification of a site phosphorylated by MAP kinase in vitro and in response to insulin in rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* *269*, 23185-23191.
- Haystead,T.A., Sim,A.T., Carling,D., Honnor,R.C., Tsukitani,Y., Cohen,P., and Hardie,D.G.** (1989). Effects of the tumour promoter okadaic acid on intracellular protein phosphorylation and metabolism. *Nature* *337*, 78-81.

- Huyer,G., Liu,S., Kelly,J., Moffat,J., Payette,P., Kennedy,B., Tsapralis,G., Gresser,M.J., and Ramachandran,C.** (1997). Mechanism of inhibition of protein-tyrosine phosphatases by vanadate and pervanadate. *J. Biol. Chem.* 272, 843-851.
- Hwang,J.T., Ha,J., Park,I.J., Lee,S.K., Baik,H.W., Kim,Y.M., and Park,O.J.** (2007). Apoptotic effect of EGCG in HT-29 colon cancer cells via AMPK signal pathway. *Cancer Lett.* 247, 115-121.
- Ihle,J.N.** (2001). The Stat family in cytokine signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 211-217.
- Kawamoto,S. and Hidaka,H.** (1984). 1-(5-Isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine (H-7) is a selective inhibitor of protein kinase C in rabbit platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 125, 258-264.
- Kim,R.D., Darling,C.E., Roth,T.P., Ricciardi,R., and Chari,R.S.** (2001). Activator protein 1 activation following hypoosmotic stress in HepG2 cells is actin cytoskeleton dependent. *J. Surg. Res.* 100, 176-182.
- Kimball,S.R. and Horetsky,R.L.** (2001). Alterations in interprotein interactions between translation initiation factors assessed by fluorescence resonance energy transfer. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33, 797-806.
- Knowles,R.G. and Moncada,S.** (1994). Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J.* 298, 249-258.
- Kojima,H., Urano,Y., Kikuchi,K., Higuchi,T., Hirata,Y., and Nagano,T.** (1999). Fluorescent Indicators for Imaging Nitric Oxide Production. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 38, 3209-3212.
- Kominek,L.A.** (1975b). Cycloheximide production by *Streptomyces griseus*: alleviation of end-product inhibition by dialysis-extraction fermentation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 7, 861-863.
- Kominek,L.A.** (1975a). Cycloheximide production by *Streptomyces griseus*: alleviation of end-product inhibition by dialysis-extraction fermentation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 7, 861-863.
- Komjati,M., Kastner,G., Waldhausl,W., and Bratusch-Marrain,P.** (1989). Effect of hyperosmolality on basal and hormone-stimulated hepatic glucose metabolism in vitro. *Eur. J. Clin. Invest* 19, 128-134.
- Kultz,D.** (2001). Cellular osmoregulation: beyond ion transport and cell volume. *Zoology. (Jena)* 104, 198-208.
- Kurz,A.K., Graf,D., Schmitt,M., vom Dahl,S., and Häussinger,D.** (2001). Tauroursodesoxycholate-induced choleresis involves p38 (MAPK) activation and translocation of the bile salt export pump in rats. *Gastroenterology* 121, 407-419.
- Kyhse-Andersen,J.** (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* 10, 203-209.
- Laemmli,U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lee,D.H. and Goldberg,A.L.** (1998). Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol.* 8, 397-403.
- Lewitt,M.S.** (2001). Stimulation of IGF-binding protein-1 secretion by AMP-activated protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282, 1126-1131.
- Lewitt,M.S., Brismar,K., Ohlson,J., and Hartman,J.** (2001). Lithium chloride inhibits the expression and secretion of insulin-like growth factor-binding protein-1. *J. Endocrinol.* 171, R11-R15.
- Long,X., Ortiz-Vega,S., Lin,Y., and Avruch,J.** (2005). Rheb binding to mammalian target of rapamycin (mTOR) is regulated by amino acid sufficiency. *J. Biol. Chem.* 280, 23433-23436.

- Lornejad-Schäfer,M., Schäfer,C., Richter,L., Grune,T., Häussinger,D., and Schliess,F.** (2005). Osmotic regulation of MG-132-induced MAP-kinase phosphatase MKP-1 expression in H4IIE rat hepatoma cells. *Cell Physiol Biochem.* 16, 193-206.
- Lornejad-Schäfer,M.R., Schäfer,C., Graf,D., Häussinger,D., and Schliess,F.** (2003). Osmotic regulation of insulin-induced mitogen-activated protein kinase phosphatase (MKP-1) expression in H4IIE rat hepatoma cells. *Biochem. J.* 371, 609-619.
- Lynch,C.J., Fox,H.L., Vary,T.C., Jefferson,L.S., and Kimball,S.R.** (2000). Regulation of amino acid-sensitive TOR signaling by leucine analogues in adipocytes. *J. Cell Biochem.* 77, 234-251.
- Mamane,Y., Petroulakis,E., LeBacquer,O., and Sonenberg,N.** (2006). mTOR, translation initiation and cancer. *Oncogene* 25, 6416-6422.
- Mao,X., Bravo,I.G., Cheng,H., and Alonso,A.** (2004). Multiple independent kinase cascades are targeted by hyperosmotic stress but only one activates stress kinase p38. *Exp. Cell Res.* 292, 304-311.
- Martiny-Baron,G., Kazanietz,M.G., Mischak,H., Blumberg,P.M., Kochs,G., Hug,H., Marme,D., and Schachtele,C.** (1993). Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Go 6976. *J. Biol. Chem.* 268, 9194-9197.
- McMahon,L.P., Choi,K.M., Lin,T.A., Abraham,R.T., and Lawrence,J.C., Jr.** (2002). The rapamycin-binding domain governs substrate selectivity by the mammalian target of rapamycin. *Mol. Cell Biol.* 22, 7428-7438.
- Meier,R., Thelen,M., and Hemmings,B.A.** (1998). Inactivation and dephosphorylation of protein kinase Balpha (PKBalpha) promoted by hyperosmotic stress. *EMBO J.* 17, 7294-7303.
- Meijer,A.J., Baquet,A., Gustafson,L., Van Woerkom,G.M., and Hue,L.** (1992). Mechanism of activation of liver glycogen synthase by swelling. *J. Biol. Chem.* 267, 5823-5828.
- Misaghi,S., Pacold,M.E., Blom,D., Ploegh,H.L., and Korbil,G.A.** (2004). Using a small molecule inhibitor of peptide: N-glycanase to probe its role in glycoprotein turnover. *Chem. Biol.* 11, 1677-1687.
- Nave,B.T., Ouwens,M., Withers,D.J., Alessi,D.R., and Shepherd,P.R.** (1999). Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. *Biochem. J.* 344, 427-431.
- Newsome,W.P., Warskulat,U., Noe,B., Wettstein,M., Stoll,B., Gerok,W., and Häussinger,D.** (1994). Modulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase mRNA levels by the hepatocellular hydration state. *Biochem. J.* 304, 555-560.
- Nicholson,D.W., Ali,A., Thornberry,N.A., Vaillancourt,J.P., Ding,C.K., Gallant,M., Gareau,Y., Griffin,P.R., Labelle,M., Lazebnik,Y.A.** (1995). Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 376, 37-43.
- Niwa,A., Yamamoto,K., and Yasumura,Y.** (1979). Establishment of a rat hepatoma cell line which has ornithine carbamoyltransferase activity and grows continuously in arginine-deprived medium. *J. Cell Physiol* 98, 177-184.
- Noe,B., Schliess,F., Wettstein,M., Heinrich,S., and Häussinger,D.** (1996). Regulation of taurocholate excretion by a hypo-osmolarity-activated signal transduction pathway in rat liver. *Gastroenterology* 110, 858-865.
- Page,M.M., Alberti,K.G., Greenwood,R., Gumaa,K.A., Hockaday,T.D., Lowy,C., Nabarro,J.D., Pyke,D.A., Sonksen,P.H., Watkins,P.J., and West,T.E.** (1974). Treatment of diabetic coma with continuous low-dose infusion of insulin. *Br. Med. J.* 2, 687-690.
- Papakonstanti,E.A. and Stournaras,C.** (2007). Actin cytoskeleton architecture and signaling in osmosensing. *Methods Enzymol.* 428, 227-240.

- Papakonstanti,E.A., Vardaki,E.A., and Stournaras,C.** (2000). Actin cytoskeleton: a signaling sensor in cell volume regulation. *Cell Physiol Biochem.* 10, 257-264.
- Patel,S., Lochhead,P.A., Rena,G., Fumagalli,S., Pende,M., Kozma,S.C., Thomas,G., and Sutherland,C.** (2002). Insulin regulation of insulin-like growth factor-binding protein-1 gene expression is dependent on the mammalian target of rapamycin, but independent of ribosomal S6 kinase activity. *J. Biol. Chem.* 277, 9889-9895.
- Peterson,R.T., Beal,P.A., Comb,M.J., and Schreiber,S.L.** (2000). FKBP12-rapamycin-associated protein (FRAP) autophosphorylates at serine 2481 under translationally repressive conditions. *J. Biol. Chem.* 275, 7416-7423.
- Phillips,P.G., Lum,H., Malik,A.B., and Tsan,M.F.** (1989). Phalloidin prevents thrombin-induced increases in endothelial permeability to albumin. *Am. J. Physiol* 257, C562-C567.
- Potenza,M.A., Marasciulo,F.L., Tarquinio,M., Tiravanti,E., Colantuono,G., Federici,A., Kim,J.A., Quon,M.J., and Montagnani,M.** (2007). EGCG, a green tea polyphenol, improves endothelial function and insulin sensitivity, reduces blood pressure, and protects against myocardial I/R injury in SHR. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 292, E1378-E1387.
- Proud,C.G.** (2004). mTOR-mediated regulation of translation factors by amino acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313, 429-436.
- Proud,C.G.** (2005). The eukaryotic initiation factor 4E-binding proteins and apoptosis. *Cell Death. Differ.* 12, 541-546.
- Pullen,N. and Thomas,G.** (1997). The modular phosphorylation and activation of p70s6k. *FEBS Lett.* 410, 78-82.
- Quick,J., Ware,J.A., and Driedger,P.E.** (1992). The structure and biological activities of the widely used protein kinase inhibitor, H7, differ depending on the commercial source. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187, 657-663.
- Raught,B., Gingras,A.C., and Sonenberg,N.** (2001). The target of rapamycin (TOR) proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 7037-7044.
- Reinehr,R., Becker,S., Keitel,V., Eberle,A., Grether-Beck,S., and Häussinger,D.** (2005). Bile salt-induced apoptosis involves NADPH oxidase isoform activation. *Gastroenterology* 129, 2009-2031.
- Reinehr,R., Gorg,B., Hongen,A., and Häussinger,D.** (2004). CD95-tyrosine nitration inhibits hyperosmotic and CD95 ligand-induced CD95 activation in rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 279, 10364-10373.
- Reinehr,R., Graf,D., Fischer,R., Schliess,F., and Häussinger,D.** (2002). Hyperosmolarity triggers CD95 membrane trafficking and sensitizes rat hepatocytes toward CD95L-induced apoptosis. *Hepatology* 36, 602-614.
- Reinehr,R., Graf,D., and Häussinger,D.** (2003a). Bile salt-induced hepatocyte apoptosis involves epidermal growth factor receptor-dependent CD95 tyrosine phosphorylation. *Gastroenterology* 125, 839-853.
- Reinehr,R. and Häussinger,D.** (2007). Hyperosmotic activation of the CD95 system. *Methods Enzymol.* 428, 145-160.
- Reinehr,R., Schliess,F., and Häussinger,D.** (2003b). Hyperosmolarity and CD95L trigger CD95/EGF receptor association and tyrosine phosphorylation of CD95 as prerequisites for CD95 membrane trafficking and DISC formation. *FASEB J.* 17, 731-733.
- Reynolds,T.H., Bodine,S.C., and Lawrence,J.C., Jr.** (2002). Control of Ser2448 phosphorylation in the mammalian target of rapamycin by insulin and skeletal muscle load. *J. Biol. Chem.* 277, 17657-17662.

- Rohde,J., Heitman,J., and Cardenas,M.E.** (2001). The TOR kinases link nutrient sensing to cell growth. *J. Biol. Chem.* 276, 9583-9586.
- Rosette,C. and Karin,M.** (1996). Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors. *Science* 274, 1194-1197.
- Ruoslahti,E.** (1996). RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12, 697-715.
- Sabers,C.J., Martin,M.M., Brunn,G.J., Williams,J.M., Dumont,F.J., Wiederrecht,G., and Abraham,R.T.** (1995). Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 270, 815-822.
- Saha,N., Schreiber,R., vom Dahl,S., Lang,F., Gerok,W., and Häussinger,D.** (1993). Endogenous hydroperoxide formation, cell volume and cellular K<sup>+</sup> balance in perfused rat liver. *Biochem. J.* 296, 701-707.
- Sanchez,F.A., Santema,J.S., Hilhorst,R., and Visser,A.J.** (1990). Fluorescence detection of enzymatically formed hydrogen peroxide in aqueous solution and in reversed micelles. *Anal. Biochem.* 187, 129-132.
- Sarkadi,B. and Parker,J.C.** (1991). Activation of ion transport pathways by changes in cell volume. *Biochim. Biophys. Acta* 1071, 407-427.
- Schäfer,C., Eckel,R., Ros,R., Mattay,J., and Anselmetti,D.** (2007a). Photochemical single-molecule affinity switch. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 1488-1489.
- Schäfer,C., Gehrman,T., Richter,L., Keitel,V., Kohrer,K., Häussinger,D., and Schliess,F.** (2007b). Modulation of gene expression profiles by hyperosmolarity and insulin. *Cell Physiol Biochem.* 20, 369-386.
- Schliess,F. and Häussinger,D.** (2002). The cellular hydration state: a critical determinant for cell death and survival. *Biol. Chem.* 383, 577-583.
- Schliess,F. and Häussinger,D.** (2003). Cell volume and insulin signaling. *Int. Rev. Cytol.* 225, 187-228.
- Schliess,F. and Häussinger,D.** (2005). The cellular hydration state: role in apoptosis and proliferation. *Signal Transduction* 5, 297-302.
- Schliess,F. and Häussinger,D.** (2007). Osmosensing by integrins in rat liver. *Methods Enzymol.* 428, 129-144.
- Schliess,F., Heinrich,S., and Häussinger,D.** (1998). Hyperosmotic induction of the mitogen-activated protein kinase phosphatase MKP-1 in H4IIE rat hepatoma cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 351, 35-40.
- Schliess,F., Reinehr,R., and Häussinger,D.** (2007). Osmosensing and signaling in the regulation of mammalian cell function. *FEBS J.* 274, 5799-5803.
- Schliess,F., Reissmann,R., Reinehr,R., vom Dahl,S., and Häussinger,D.** (2004). Involvement of integrins and Src in insulin signaling toward autophagic proteolysis in rat liver. *J. Biol. Chem.* 279, 21294-21301.
- Schliess,F., Richter,L., vom Dahl,S., and Häussinger,D.** (2006). Cell hydration and mTOR-dependent signalling. *Acta Physiol (Oxf)* 187, 223-229.
- Schliess,F., Schäfer,C., vom Dahl,S., Fischer,R., Lordnejad,M.R., and Häussinger,D.** (2002). Expression and regulation of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup> cotransporter NKCC1 in rat liver and human HuH-7 hepatoma cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 401, 187-197.

- Schliess,F., vom Dahl,S., and Häussinger,D.** (2001). Insulin resistance induced by loop diuretics and hyperosmolarity in perfused rat liver. *Biol. Chem.* **382**, 1063-1069.
- Shigemitsu,K., Tsujishita,Y., Hara,K., Nanahoshi,M., Avruch,J., and Yonezawa,K.** (1999). Regulation of translational effectors by amino acid and mammalian target of rapamycin signaling pathways. Possible involvement of autophagy in cultured hepatoma cells. *J. Biol. Chem.* **274**, 1058-1065.
- Smith,J.L., Patil,P.B., and Fisher,J.S.** (2005). AICAR and hyperosmotic stress increase insulin-stimulated glucose transport. *J. Appl. Physiol* **99**, 877-883.
- Spector,I., Shochet,N.R., Blasberger,D., and Kashman,Y.** (1989). Latrunculins-novel marine macrolides that disrupt microfilament organization and affect cell growth: I. Comparison with cytochalasin D. *Cell Motil. Cytoskeleton* **13**, 127-144.
- Standaert,M.L., Galloway,L., Karnam,P., Bandyopadhyay,G., Moscat,J., and Farese,R.V.** (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**, 30075-30082.
- Stein,S.C., Woods,A., Jones,N.A., Davison,M.D., and Carling,D.** (2000). The regulation of AMP-activated protein kinase by phosphorylation. *Biochem. J.* **345**, 437-443.
- Steinbrenner,H., Alili,L., Bilgic,E., Sies,H., and Brenneisen,P.** (2006a). Involvement of selenoprotein P in protection of human astrocytes from oxidative damage. *Free Radic. Biol. Med.* **40**, 1513-1523.
- Steinbrenner,H., Bilgic,E., Alili,L., Sies,H., and Brenneisen,P.** (2006b). Selenoprotein P protects endothelial cells from oxidative damage by stimulation of glutathione peroxidase expression and activity. *Free Radic. Res.* **40**, 936-943.
- Stoll,B., Gerok,W., Lang,F., and Häussinger,D.** (1992). Liver cell volume and protein synthesis. *Biochem. J.* **287**, 217-222.
- Suganuma,M., Fujiki,H., Furuya-Suguri,H., Yoshizawa,S., Yasumoto,S., Kato,Y., Fusetani,N., and Sugimura,T.** (1990). Calyculin A, an inhibitor of protein phosphatases, a potent tumor promoter on CD-1 mouse skin. *Cancer Res.* **50**, 3521-3525.
- Szabo,C., Day,B.J., and Salzman,A.L.** (1996). Evaluation of the relative contribution of nitric oxide and peroxynitrite to the suppression of mitochondrial respiration in immunostimulated macrophages using a manganese mesoporphyrin superoxide dismutase mimetic and peroxynitrite scavenger. *FEBS Lett.* **381**, 82-86.
- Takata,M., Ogawa,W., Kitamura,T., Hino,Y., Kuroda,S., Kotani,K., Klip,A., Gingras,A.C., Sonenberg,N., and Kasuga,M.** (1999). Requirement for Akt (protein kinase B) in insulin-induced activation of glycogen synthase and phosphorylation of 4E-BP1 (PHAS-1). *J. Biol. Chem.* **274**, 20611-20618.
- Tee,A.R. and Proud,C.G.** (2000). DNA-damaging agents cause inactivation of translational regulators linked to mTOR signalling. *Oncogene* **19**, 3021-3031.
- Theodoropoulos,P.A., Stournaras,C., Stoll,B., Markogiannakis,E., Lang,F., Gravanis,A., and Häussinger,D.** (1992). Hepatocyte swelling leads to rapid decrease of the G-/total actin ratio and increases actin mRNA levels. *FEBS Lett.* **311**, 241-245.
- Thomas,G.V.** (2006). mTOR and cancer: reason for dancing at the crossroads? *Curr. Opin. Genet. Dev.* **16**, 78-84.
- Towbin,H., Staehelin,T., and Gordon,J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **76**, 4350-4354.

- Towler,M.C. and Hardie,D.G.** (2007). AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circ. Res.* 100, 328-341.
- van Sluijters,D.A., Dubbelhuis,P.F., Blommaart,E.F., and Meijer,A.J.** (2000). Amino-acid-dependent signal transduction. *Biochem. J.* 351, 545-550.
- Viollet,B., Foretz,M., Guigas,B., Horman,S., Dentin,R., Bertrand,L., Hue,L., and Andreelli,F.** (2006). Activation of AMP-activated protein kinase in the liver: a new strategy for the management of metabolic hepatic disorders. *J. Physiol* 574, 41-53.
- vom Dahl,S., Dombrowski,F., Schmitt,M., Schliess,F., Pfeifer,U., and Häussinger,D.** (2001a). Cell hydration controls autophagosome formation in rat liver in a microtubule-dependent way downstream from p38MAPK activation. *Biochem. J.* 354, 31-36.
- vom Dahl,S., Hallbrucker,C., Lang,F., Gerok,W., and Häussinger,D.** (1991). Regulation of liver cell volume and proteolysis by glucagon and insulin. *Biochem. J.* 278,, 771-777.
- vom Dahl,S. and Häussinger,D.** (1996). Nutritional state and the swelling-induced inhibition of proteolysis in perfused rat liver. *J. Nutr.* 126, 395-402.
- vom Dahl,S., Schliess,F., Graf,D., and Häussinger,D.** (2001b). Role of p38(MAPK) in cell volume regulation of perfused rat liver. *Cell Physiol Biochem.* 11, 285-294.
- vom Dahl,S., Schliess,F., Reissmann,R., Gorg,B., Weiergraber,O., Kocalkova,M., Dombrowski,F., and Häussinger,D.** (2003). Involvement of integrins in osmosensing and signaling toward autophagic proteolysis in rat liver. *J. Biol. Chem.* 278, 27088-27095.
- vom Dahl,S., Stoll,B., Gerok,W., and Häussinger,D.** (1995). Inhibition of proteolysis by cell swelling in the liver requires intact microtubular structures. *Biochem. J.* 308, 529-536.
- Waltner-Law,M.E., Wang,X.L., Law,B.K., Hall,R.K., Nawano,M., and Granner,D.K.** (2002). Epigallocatechin gallate, a constituent of green tea, represses hepatic glucose production. *J. Biol. Chem.* 277, 34933-34940.
- Wang,L., Rolfe,M., and Proud,C.G.** (2003).  $Ca^{2+}$ -independent protein kinase C activity is required for alpha1-adrenergic-receptor-mediated regulation of ribosomal protein S6 kinases in adult cardiomyocytes. *Biochem. J.* 373, 603-611.
- Warskulat,U., Newsome,W., Noe,B., Stoll,B., and Häussinger,D.** (1996). Anisoosmotic regulation of hepatic gene expression. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 377, 57-65.
- Warskulat,U., Wettstein,M., and Häussinger,D.** (1997). Osmoregulated taurine transport in H4IIE hepatoma cells and perfused rat liver. *Biochem. J.* 321, 683-690.
- Weiergraber,O. and Häussinger,D.** (2000). Hepatocellular hydration: signal transduction and functional implications. *Cell Physiol Biochem.* 10, 409-416.
- Wettstein,M. and Häussinger,D.** (1997). Cytoprotection by the osmolytes betaine and taurine in ischemia-reoxygenation injury in the perfused rat liver. *Hepatology* 26, 1560-1566.
- Wiese,S., Schliess,F., and Häussinger,D.** (1998). Osmotic regulation of MAP-kinase activities and gene expression in H4IIE rat hepatoma cells. *Biol. Chem.* 379, 667-671.
- Wohlke,A., Drogemuller,C., Kuiper,H., Leeb,T., and Distl,O.** (2005). Molecular characterization and chromosomal assignment of the bovine glycinamide ribonucleotide formyltransferase (GART) gene on cattle chromosome 1q12.1-q12.2. *Gene* 348, 73-81.
- Xi,X., Han,J., and Zhang,J.Z.** (2001). Stimulation of glucose transport by AMP-activated protein kinase via activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 276, 41029-41034.

**Yokogami,K., Wakisaka,S., Avruch,J., and Reeves,S.A.** (2000). Serine phosphorylation and maximal activation of STAT3 during CNTF signaling is mediated by the rapamycin target mTOR. *Curr. Biol.* *10*, 47-50.

**Zhou,G., Myers,R., Li,Y., Chen,Y., Shen,X., Fenyk-Melody,J., Wu,M., Ventre,J., Doebber,T., Fujii,N., Musi,N., Hirshman,M.F., Goodyear,L.J., and Moller,D.E.** (2001). Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J. Clin. Invest* *108*, 1167-1174.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
4E-BP1	eukaryotischer Initiationsfaktor 4E bindendes Protein
Abb.	Abbildung
AICAR	5-aminoimidazole-4-carboxamide ribosid
AMP	Adenosinmonphosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
bzw.	beziehungsweise
cDNA	<i>copy</i> -DNA
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CPM	<i>counts per minute</i>
DAF-FM DA	4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluorofluoreszeindiacetat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGCG	Epigallocatechin Gallat
EGTA	Ethylenglycoldiamintetraacetat
eIF4E	eukaryotischer Initiationsfaktor 4E
FCS	fötales Rinderserum ( <i>fetal bovine serum</i> )
g, kg, mg, µg, ng	Gramm, Kilo-, Milli-, Mikro-, Nanogramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h, min, sek	Stunde, Minute, Sekunde
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
Hprt	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
Igfbp 1	Insulin-like-growth factor Bindeprotein 1 (mRNA)
IGFBP 1	Insulin-like-growth factor Bindeprotein 1 (Protein)
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
l, ml, µl	Liter, Milli-, Mikroliter
L-NMMA	N-Methyl-L-Arginin
M, mM, µM, nM, pM	Molar, Milli-, Mikro-, Nano-, Picomolar
mA	Milliamper
MAPK	Mitogen-activated-Protein-Kinase
MKP	MAPK Phosphatase
MnSOD	Mangan-Superoxiddismutase
mRNA	<i>messenger</i> -Ribonukleinsäure
mTOR	mammalian target of Rapamycin
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NaOH	Natriumhydroxid
NO	Stickstoffmonoxid

---

NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
p70 S6K	p70 ribosomale S6 Kinase
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PBST	PBS mit 0,1% Tween 20
PCR	Polymerasekettenreaktion
PI 3Kinase	Phosphoinositid-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>Real-Time</i> -Polymerase-Kettenreaktion
SAMS Peptid	Substrat für die AMPK (HMRS <u>SAMS</u> GLHLVKRR)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
Tab.	Tabelle
TBST	<i>Tris buffered saline</i> mit Tween
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
U	<i>Unit</i> , Einheit der Enzymaktivität
u.a.	unter anderem
V	Volt
v.a.	vor allem
w/v	<i>weight per volume</i>
z.B.	zum Beispiel

## 9 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Freimut Schliess für die engagierte Betreuung, zahlreichen Diskussionen und hilfreiche Unterstützung während der gesamten Dissertation bedanken.

Herrn Prof. Dr. Dieter Häussinger danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und der Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Bei Herrn Prof. Dr. Frank Wunderlich bedanke ich mich für die Übernahme des Korreferats.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Dr. Boris Görg aus der Experimentellen Hepatologie der mich tatkräftig bei den Fluoreszenzmessungen unterstützte. Auch möchte ich mich bei Dr. Thor Gehrman aus dem Biologisch-Medizinischen Forschungslabor für die Durchführung und Analyse der Chip-Array Untersuchungen bedanken. Frau Schmitz aus der Kinderklinik des Universitätsklinikums Düsseldorf möchte ich für die Aufreinigung und Quantifizierung des Aminosäureprofils danken. Für die freundliche Bereitstellung des Selenoprotein P danke ich Dr. Holger Steinbrenner.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie bedanken, die durch ihre Hilfsbereitschaft und freundliche Atmosphäre für eine schöne Zeit sorgten. Insbesondere gilt mein Dank Holger Fey, ohne den jegliche Computerprobleme ungelöst geblieben wären. Ganz besonders möchte ich mich auch bei meinen Kolleginnen und Freundinnen Dr. „Stuff“ Brookmann und Dr. Jessica Lüserbrink bedanken. Ohne Euch wäre es nicht so schön gewesen!!!

Nicht zuletzt möchte ich mich vom ganzen Herzen bei meinem Freund Pawel Kulczak bedanken, der zum Gelingen der Arbeit durch seine stetige Unterstützung beitrug. Nicht weniger möchte ich meiner Mutter danken, ohne die ich nicht da wäre wo ich heute bin. Auch möchte ich meiner restlichen Familie danken, die während der gesamten Zeit unterstützend hinter mir stand. An dieser Stelle möchte ich mich insbesondere bei meinem Bruder Kai Richter bedanken, der immer hilfsbereit und mit viel Diskussionsbereitschaft an meiner Promotion Anteil nahm. Vielen Dank!!!

## 10 Anhang

**Tab. I. Durch Hyperosmolarität regulierte Gentranskripte**

Oligonukleotid-Arrays wurden mit markierter cDNA (siehe 2.2.7) hybridisiert, die aus Huh7 Zellen gewonnen wurde, die mit normoosmotischem (305 mosmol/L) oder hyperosmotischem (405 mosmol/L) inkubiert wurden. Genexpressionsänderungen wurden als logarithmisches Verhältnis gezeigt. Dabei zeigt das Verhältnis  $\log_{10}(N_{405}/N_{305})$  die hyperosmotisch induzierte Regulation im Vergleich zur der unter normoosmotischen Bedingung an. Dabei gilt ein Verhältnis von  $\pm 0,18$  als nicht regulierte, von  $\pm 0,18$  bis  $\pm 0,30$  als schwache regulierte und  $> 0,3$  bzw. kleiner  $< -0,3$  als stark (fett gekennzeichnet) regulierte Genexpression.

Index	Name	NCBI Gene Symbol	NCBI Accession	305 ↓ 405
1	UDP-glucose dehydrogenase	UGDH	NM_003359	-0,52
2	CD81 antigen	CD81	NM_004356	-0,52
3	Malate dehydrogenase 2	MDH2	NM_005918	-0,51
4	7-dehydrocholesterol reductase	DHCR7	NM_001360	-0,51
5	S-adenosylhomocysteine hydrolase-like 1	AHCYL1	NM_006621	-0,50
6	paternally expressed 10	PEG10	XM_496907	-0,49
7	Tumor protein p53 inducible protein 8	EI24	NM_004879, NM_001007277	-0,49
8	Nucleolin	NCL	NM_005381	-0,49
9	Protein phosphatase 1	PPP1CA	NM_001008709, NM_002708, NM_206873	-0,48
10	guanine nucleotide binding protein (G protein)	GNAI2	NM_002070	-0,47
11	solute carrier family 1	SLC1A5	NM_005628	-0,46
12	protein phosphatase	PPP2R1A	NM_014225	-0,46
13	keratin 8	KRT8	NM_002273	-0,46
14	Histone H1(0)	H1F0	NM_005318	-0,46
15	N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein	Napa	NM_003827	-0,46
16	Calpain, small subunit 1	CAPNS1	NM_001749	-0,45
17	nuclear receptor subfamily 0	Nr0b2	NM_021969	-0,45
18	Minichromosome maintenance deficient (S. cerevisiae) 3	MCM3	NM_002388	-0,45
19	Polymerase	POLE3	NM_017443	-0,44
20	TAF7 RNA polymerase II	TAF7	NM_005642	-0,44
21	heat shock protein 90kDa beta (Grp94)	HSP90B1	NM_003299	-0,44
22	Carnitine palmitoyltransferase II	CPT2	NM_000098	-0,44
23	ubiquitin B	UBB	NM_018955	-0,42
24	Peptidylprolyl isomerase B	PPIB	NM_000942	-0,41
25	asialoglycoprotein receptor	Asgr1	NM_001671	-0,41
26	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 9	DHX9	NM_001357	-0,39
27	Cyclin I	CCNI	NM_006835	-0,39
28	Inosine triphosphatase	ITPA	NM_033453, NM_181493	-0,39
29	alpha-2-HS-glycoprotein	AHSG	NM_001622	-0,39
30	chromosome condensation-related SMC-ass protein 1	CNAP1	NM_014865	-0,38
31	syndecan 1 transcript variant 1	SDC1	NM_001006946, NM_002997	-0,38
32	Prohibitin	PHB	NM_002634	-0,38
33	RAB34	RAB34	NM_031934	-0,37

Index	Name	NCBI Gene Symbol	NCBI Accession	305 ↓ 405
34	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein	YWHAB	NM_003404, NM_139323	-0,37
35	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 56	DDX56	NM_019082	-0,37
36	ATPase	ATP6V0D1	NM_004691	-0,36
37	RAB5B	RAB5B	NM_002868	-0,36
38	interleukin enhancer binding factor 3	ILF3	NM_004516, NM_012218, NM_153464	-0,35
39	cytochrome b-245, alpha polypeptide	CYBA	NM_000101	-0,35
40	Guanidinoacetate N-methyltransferase	GAMT	NM_000156	-0,34
41	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like 1	HNRPUL1	NM_007040, NM_144732, NM_144734	-0,34
42	RAB7	RAB7	NM_004637	-0,33
43	NADH dehydrogenase	NDUFV1	NM_007103	-0,32
44	peroxiredoxin 2 transcript variant 1	PRDX2	NM_005809, NM_181738	-0,32
45	Oxoglutaratedehydrogenase	OGDH	NM_001003941, NM_002541	-0,32
46	aldo-keto reductase family 1	AKR1C2	NM_001354, NM_205845, NM_001353	-0,32
47	cell division cycle 42	CDC42	NM_001791	-0,32
48	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 41	DDX41	NM_016222	-0,32
49	Basigin (OK blood group)	BSG	NM_001728, NM_198589, NM_198590, NM_198591	-0,31
50	chaperonin containing TCP1	CCT7	NM_006429	-0,31
51	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 30	DHX30	NM_014966, NM_138615	-0,30
52	calcium activated nucleotidase 1	CANT1	NM_138793	-0,30
53	Peptidylprolyl isomerase F (cyclophilin F)	PPIF	NM_005729	-0,30
54	solute carrier family 25	Slc25a1	NM_005984	-0,30
55	Cyclin D1	CCND1	NM_053056	-0,29
56	N-acylaminoacyl-peptide hydrolase	Apeh	NM_001640	-0,29
57	Polymerase I and transcript release factor	PTRF	NM_012232	-0,29
58	ADP-ribosylation factor 1	ARF1	NM_001658	-0,28
59	Methionine Adenosyltransferase 2, alpha	MAT2A	NM_005911	-0,28
60	NIMA -related kinase 6	NEK6	NM_014397	-0,28
61	apolipoprotein A-I	APOA1	NM_000039	-0,27
62	aspartyl-tRNA synthetase (Dars)	Dars	NM_001349	-0,27
63	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, A	PTPRA	NM_002836, NM_080840, NM_080841	-0,27
64	TAF11 RNA polymerase II	TAF11	NM_005643	-0,26
65	Sulfotransferase family 1A	SULT1A1	NM_001055, NM_177529, NM_177530, NM_177534, NM_177536	-0,26
66	ubiquitin-conjugating enzyme E2I transcript	UBE2I	NM_003345, NM_194259, NM_194260, NM_194261	-0,26

Index	Name	NCBI Gene Symbol	NCBI Accession	305 ↓ 405
67	FK506 binding protein 4 (59kD)	FKBP4	NM_002014	-0,26
68	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein	YWHAE	NM_006761	-0,26
69	2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa transcript variant E16	OAS1	NM_016816	-0,26
70	Epoxide hydrolase 2, cytoplasmic	EPHX2	NM_001979	-0,26
71	selenoprotein W1	SelW1	NM_003009	-0,25
72	RAB8A	RAB8A	NM_005370	-0,25
73	isocitrate dehydrogenase 1	IDH1	NM_005896	-0,25
74	Transketolase (Wernicke-Korsakoff syndrome)	TKT	NM_001064	-0,25
75	Centromere protein F	CENPF	NM_016343	-0,25
76	heat shock 70kDa protein 8 transcript variant 1	HSPA8	NM_006597, NM_153201	-0,25
77	ADP-ribosylation factor 3	ARF3	NM_001659	-0,25
78	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 24	DDX24	NM_020414	-0,24
79	Phosphoribosylglycinamide formyltransferase	GART	NM_175085	-0,24
80	Coenzyme A synthase	COASY	NM_025233	-0,24
81	organic solute transporter beta	OSTbeta	NM_178859	-0,23
82	cystatin C	CST3	NM_000099	-0,23
83	Oxidase (cytochrome c) assembly 1-like	OXA1L	NM_005015	-0,23
84	stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)	SCD	NM_005063	-0,23
85	Protein phosphatase 4 (formerly X), catalytic subunit	PPP4C	NM_002720	-0,23
86	Pyridoxal (pyridoxine, vitamin B6) kinase	PDXK	NM_003681	-0,23
87	carboxylesterase 1	CES1	NM_001266	-0,23
88	solute carrier family 25	SLC25A10	NM_012140	-0,23
89	aldehyde dehydrogenase 1	ALDH1A1	NM_000689	-0,22
90	SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 3	SUMO3	NM_006936	-0,22
91	solute carrier family 35, member B1	SLC35B1	NM_005827	-0,22
92	v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1	RAF1	NM_002880	-0,22
93	serine/threonine kinase 25	STK25	NM_006374	-0,22
94	Enoyl Coenzyme A hydratase 1	ECH1	NM_001398	-0,22
95	tumor necrosis factor receptor superfamily	TNFRSF1A	NM_001065	-0,22
96	CTP:Phosphocholine Cytidyltransferase	PCYT1A	NM_005017	-0,22
97	MCM5 minichromosome maintenance deficient 5	MCM5	NM_006739	-0,22
98	5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase	ATIC	NM_004044	-0,22
99	Uroporphyrinogen III synthase	UROS	NM_000375	-0,21
100	baculoviral IAP repeat-containing 5	BIRC5	NM_001168	-0,21
101	protein inhibitor of activated STAT, 1	PIAS1	NM_016166	-0,21
102	Protein phosphatase 1	PPP1R11	NM_021959, NM_170781	-0,21
103	complement component 3	C3	NM_000064	-0,21
104	selenium binding protein 1	SELENBP1	NM_003944	-0,21
105	eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 2	EIF4EBP2	NM_004096	-0,20
106	Caspase 6	CASP6	NM_001226, NM_032992	-0,20
107	carbamoyl-phosphate synthetase 1	Cps1	NM_001875	-0,20
108	C-src tyrosine kinase	CSK	NM_004383	-0,20
109	Exportin 1	XPO1	NM_003400	-0,20
110	CAP, adenylate cyclase-associated protein 1	CAP1	NM_006367	-0,20
109	Exportin 1	XPO1	NM_003400	-0,20
110	CAP, adenylate cyclase-associated protein 1	CAP1	NM_006367	-0,20

Index	Name	NCBI Gene Symbol	NCBI Accession	305 ↓ 405
111	solute carrier family 40, member 1	SLC40A1	NM_014585	-0,20
112	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha	ARHGDI1	NM_004309	-0,20
113	Quinolinate phosphoribosyltransferase	QPRT	NM_014298	-0,20
114	Minichromosome maintenance deficient 4	MCM4	NM_005914, NM_182746	-0,20
115	ATPase	ATP2A2	NM_001681, NM_170665	-0,19
116	tubulin, beta polypeptide	TUBB	NM_178014	-0,19
117	Flap structure-specific endonuclease 1	FEN1	NM_004111	-0,19
118	Phosphoglycerate dehydrogenase	PHGDH	NM_006623	-0,19
119	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1	HMGCS1	NM_002130	-0,19
120	Carboxypeptidase M	CPM	NM_001005502, NM_001874, NM_198320	-0,19
121	TAF10 RNA polymerase II	TAF10	NM_006284	-0,19
122	Dual specificity phosphatase 3	DUSP3	NM_004090	-0,19
123	v-myc myelocytomatosis	MYC	NM_002467	-0,19
124	COX11 homolog	COX11	NM_004375	-0,19
125	actin, gamma 1	ACTG1	NM_001614	-0,19
126	DNA fragmentation factor	DFFA	NM_004401, NM_213566	-0,18
127	chaperonin containing TCP1	CCT6A	NM_001762	-0,18
128	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade E, member 2	SERPINE2	NM_006216	-0,18
129	Asparagine synthetase transcript variant 2	ASNS	NM_001673, NM_133436, NM_183356	-0,18
130	Glucose regulated protein	GRP58	NM_005313	-0,18
131	serpin peptidase inhibitor, clade D, member 1	SERPIND1	NM_000185	-0,18
132	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	HNRPA1	NM_002136, NM_031157	-0,18
133	procollagen-proline	P4HB	NM_000918	-0,18
134	IMP (inosine monophosphate) dehydrogenase 2	IMPDH2	NM_000884	0,18
135	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 15	DHX15	NM_001358	0,18
136	Hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15-(NAD)	HPGD	NM_000860	0,18
137	Protein phosphatase 1A alpha isoform	PPM1A	NM_021003, NM_177952	0,18
138	HMG-CoA reductase	Hmgcr	NM_000859	0,18
139	Cryptochrome 1 (photolyase-like)	CRY1	NM_004075	0,18
140	GADD153	Ddit3	NM_004083	0,18
141	Complement factor H	CFH	NM_000186	0,18
142	beta-2-microglobulin	B2M	NM_004048	0,18
143	ribosomal protein S6 kinase	RPS6KB1	NM_003161	0,18
144	Cell division cycle 34	CDC34	NM_004359	0,18
145	Integrin, alpha V	ITGAV	NM_002210	0,18
146	solute carrier family 30, member 1	Slc30a1	NM_021194	0,19
147	Cytochrome P450	CYP51A1	NM_000786	0,19
148	programmed cell death 5	PDCD5	NM_004708	0,19
149	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 39	DDX39	NM_005804, NM_138998	0,20
150	elongation factor, RNA polymerase II, 2	ELL2	NM_012081	0,20
151	Creatine kinase	CKB	NM_001823	0,20
152	cytochrome c oxidase subunit Vib polypeptide 1	COX6B1	NM_001863	0,20
153	arginase, type II	ARG2	NM_001172	0,20

Index	Name	NCBI Gene Symbol	NCBI Accession	305 ↓ 405
154	pre-B-cell colony enhancing factor 1	PBEF	NM_005746, NM_182790	0,21
155	major histocompatibility complex, class I, C	HLA-C	NM_002117	0,21
156	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7 interacting protein 2	MAP3K7IP2	NM_015093	0,21
157	hairy and enhancer of split 1	HES1	NM_005524	0,21
158	ribosomal protein S12	RPS12	NM_001016	0,21
159	DnaJ (Hsp40) homolog, member 1	DNAJB1	NM_006145	0,22
160	Protein phosphatase 1B, beta isoform	PPM1B	NM_002706, NM_177968, NM_177969	0,22
161	peroxiredoxin 1	PRDX1	NM_002574, NM_181696, NM_181697	0,22
162	DnaJ (Hsp40) homolog, member 9	DNAJB9	NM_012328	0,22
163	activating transcription factor 4	ATF4	NM_182810 NM_001675	0,22
164	arginase	Arg1	NM_000045	0,23
165	15kDa selenoprotein	Sel15	NM_203341 NM_004261	0,23
166	insulin receptor substrate 1	Irs1	NM_005544	0,23
167	Dual specificity phosphatase 16	DUSP16	AB051487	0,24
168	non-metastatic cells 2	NME2	NM_002512	0,24
169	H2A histone family, member Z	H2AFZ	NM_002106	0,24
170	Alanyl (membrane) aminopeptidase CD1	ANPEP	NM_001150	0,25
171	Tropomyosin 2 (beta)	TPM2	NM_213674	0,25
172	fatty acid binding protein 1	Fabp1	NM_001443	0,25
173	Aldo keto Reductase member B1(Aldose Reductase)	AKR1B1	NM_001628	0,26
174	SUMO1/sentrin specific protease 6	SENPA6	NM_015571	0,26
175	insulin induced gene 1	INSIG1	NM_198337, NM_198336, NM_005542	0,26
176	growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	GADD45A	NM_001924	0,26
177	interferon, alpha-inducible protein	G1P2	NM_005101	0,27
178	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 48	DDX48	NM_014740	0,27
179	SCY1-like 1; N-terminal kinase-like	SCYL1	NM_020680	0,28
180	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 26	DDX26	NM_012141	0,29
181	Carbonic anhydrase II	CA2	NM_000067	0,31
182	superoxide dismutase 2, mitochondrial; manganese-containing superoxide dismutase	Sod2	NM_000636	0,31
183	ubiquitin-conjugating enzyme E2D 1	UBE2D1	NM_003338	0,32
184	Ras homolog gene family, member E	ARHE	NM_005168	0,33
185	Spermidine/spermine N1-acetyltransferase	SAT	NM_002970	0,34
186	Inhibitor of DNA binding 2	ID2	NM_002166	0,35
187	heat shock 70kDa protein 1B	HSPA1B	NM_005346	0,36
188	glycogen synthase kinase 3 beta	GSK3B	NM_002093	0,37
189	forkhead box A2	FOXA2	NM_021784, NM_153675	0,37
190	interleukin 8	IL8	NM_000584	0,40
191	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 5 (RNA helicase, 68kD)	DDX5	NM_004396	0,41
192	Jun B proto-oncogen	JUNB	NM_002229	0,43
193	Heat shock 70kD protein 1A	HSPA1A	NM_005345	0,44
194	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A	DNAJA1	NM_001539	0,51

Index	Name	NCBI Gene Symbol	NCBI Accession	305 ↓ 405
195	solute carrier family 5 (inositol transporters), member 3; SMIT	Slc5a3	NM_006933	0,58
196	suppressor of cytokine signaling 5	SOCS5	NM_014011, NM_144949	0,60
197	ephrin-A1; immediate early response protein B61	EFNA1	NM_004428, NM_182685	0,65
198	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 4	DNAJB4	NM_007034	0,67
199	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	NFKBIA	NM_020529	0,76
200	solute carrier family 38, member 2; system A (ATA2)	Slc38a2	NM_018976	0,79
201	A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 1	ADAMTS1	NM_006988	0,80
202	growth arrest and DNA-damage-inducible, beta	GADD45B	NM_015675	0,81
203	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	FOS	NM_005252	0,93
204	dual specificity phosphatase 10; MKP-5	DUSP10	NM_007207, NM_144728, NM_144729	1,05
205	dual specificity phosphatase 1; MAP kinase phosphatase 1	DUSP1	NM_004417	1,10

### Tab. II. Durch Rapamycin regulierte Gentranskripte

Oligonukleotid-Arrays wurden mit markierter cDNA (siehe 2.2.7) hybridisiert, die aus Huh7-Zellen gewonnen wurde die mit normoosmotischem (305 mosmol/L) Medium mit DMSO (Solvens für Rapamycin) oder mit normoosmotischem Medium mit 500 nM Rapamycin (Rap) inkubiert wurden. Genexpressionsänderungen wurden als logarithmisches Verhältnis gezeigt. Dabei zeigt das Verhältnis  $\log_{10}(N_{\text{Rap}}/N_{\text{305+DMSO}})$  eine durch Rapamycin induzierte Regulation im Vergleich zu der unter normoosmotischen Bedingung an. Dabei gilt ein Verhältnis von  $\pm 0,18$  als nicht regulierte, von  $\pm 0,18$  bis  $\pm 0,30$  als schwache regulierte und  $> 0,3$  bzw. kleiner  $< -0,3$  als regulierte Genexpression.

Index	Name	NCBI Gene Symbol	NCBI Accession	305(DMSO) ↓ Rap
1	cysteine sulfinic acid decarboxylase	CSAD	NM_015989	-0,49
2	Cytochrome P450 isoform 4F12	CYP4F12	NM_023944	-0,48
3	2',5'-oligoadenylate synthetase 1	OAS1	NM_016816	-0,34
4	GADD153;DNA-damage-inducible transcript 3	Ddit3	NM_004083	-0,26
5	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade E	SERPINE2	NM_006216	-0,26
6	Methionine Adenosyltransferase 2, alpha	MAT2A	NM_005911	-0,26
7	Centromere protein F	CENPF	NM_016343	-0,26
8	solute carrier family 30, member 1	Slc30a1	NM_021194	-0,25
9	ATP-binding cassette, sub-family C	Abcc2	NM_000392	-0,25
10	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like 1	HNRPUL1	NM_007040, NM_144732, NM_144734	-0,24
11	period homolog 1	PER1	NM_002616	-0,23
12	tyrosine kinase 2	TYK2	NM_003331	-0,23
13	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 26	DDX26	NM_012141	-0,23
14	selenoprotein O	SelO	NM_031454	-0,22
15	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4	MAP3K4	NM_005922, NM_006724	-0,22
16	Phosphoribosylglycinamide formyltransferase, phosphoribosylglycinamide synthetase	GART	NM_175085	-0,21
17	deleted in liver cancer 1	DLC1	NM_006094, NM_024767, NM_182643	-0,21

Index	Name	NCBI Gene Symbol	NCBI Accession	305(DMSO) ↓ Rap
18	CTP synthetase	CTPS	NM_001905	-0,20
19	Serum/glucocorticoid regulated kinase-like	SGKL	NM_013257, NM_170709	-0,20
20	Adenosine deaminase, RNA-specific transcript variant ADAR-a	ADAR	NM_001111, NM_015840, NM_015841	-0,19
21	FK506 binding protein 12-rapamycin associated protein 1 (mTOR)	FRAP1	NM_004958.	-0,19
22	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 41	DDX41	NM_016222	-0,18
23	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 24	DDX24	NM_020414	-0,18
24	Ras homolog gene family, member E	ARHE	NM_005168	-0,18
25	Phosphodiesterase 8A	PDE8A	NM_002605, NM_173454, NM_173455, NM_173456, NM_173457	-0,18
26	Splicing factor, arginine/serine-rich 4	SFRS4	NM_005626	-0,18
27	Cyclin G1	CCNG1	NM_004060, NM_199246	0,18
28	haptoglobin	HP	NM_005143	0,18
29	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, A	PTPRA	NM_002836, NM_080840, NM_080841	0,18
30	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha	ARHGDI1	NM_004309	0,18
31	selenoprotein W1	SelW1	NM_003009	0,18
32	solute carrier family 35, member D2	SLC35D2	NM_007001	0,18
33	procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase	P4HB	NM_000918	0,18
34	programmed cell death 4 (neoplastic transformation inhibitor)	PDCD4	NM_014456, NM_145341	0,19
35	Coenzyme A synthase	COASY	NM_025233	0,19
36	CD81 antigen	CD81	NM_004356	0,20
37	Histamine N-methyltransferase	HNMT	NM_006895	0,20
38	Exportin 1	XPO1	NM_003400	0,20
39	Epoxide hydrolase 2, cytoplasmic	EPHX2	NM_001979	0,21
40	tripartite motif-containing 28	TRIM28	NM_005762	0,21
41	Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 7	HSD17B7	NM_016371	0,21
42	aldehyde dehydrogenase 18 family	ALDH18A1	NM_001017423 NM_002860	0,21
43	Peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B)	PPIB	NM_000942	0,22
44	protein S (alpha)	PROS1	NM_000313	0,22
45	stearoyl-CoA desaturase	SCD	NM_005063	0,22
46	eukaryotic translation elongation factor 1 gamma	EEF1G	NM_001404	0,24
47	Myeloid cell leukemia sequence 1	MCL1	NM_021960, NM_182763	0,24
48	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9	DNAJB9	NM_012328	0,24
49	carboxylesterase 1	CES1	NM_001266	0,24
50	Ubiquitin protein ligase E3A	UBE3A	NM_000462, NM_130838, NM_130839	0,24
51	cytochrome b-245, alpha polypeptide	CYBA	NM_000101	0,25
52	haptoglobin-related protein	HPR	NM_020995 (NM_005143)	0,25
53	peroxiredoxin 2 transcript variant 1	PRDX2	NM_005809, NM_181738	0,26
54	Calpain, small subunit 1	CAPNS1	NM_001749	0,26
55	Ubiquitin C	UBC	NM_021009	0,27
56	keratin 8	KRT8	NM_002273	0,28

Index	Name	NCBI Gene Symbol	NCBI Accession	305(DMSO) ↓ Rap
57	chaperonin containing TCP1, subunit 7	CCT7	NM_006429	0,28
58	RAB34, member RAS oncogene family	RAB34	NM_031934	0,29
59	alpha-2-HS-glycoprotein	AHSG	NM_001622	0,31
60	Malate dehydrogenase 2, NAD	MDH2	NM_005918	0,33
61	interleukin enhancer binding factor 3	ILF3	NM_004516, NM_012218, NM_153464	0,33
62	N-acylaminoacyl-peptide hydrolase	Apeh	NM_001640	0,34
63	aldo-keto reductase family 1, member C2	AKR1C2	NM_001354, NM_205845, NM_001353	0,34
64	ubiquitin B	UBB	NM_018955	0,34
65	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 21	DDX21	NM_004728	0,35
66	Small nuclear ribonucleoprotein polypeptides B and B1	SNRPB	NM_003091, NM_198216	0,35
67	Sialyltransferase 1	SIAT1	NM_003032, NM_173216, NM_173217	0,35
68	Etoposide induced 2.4 mRNA; tumor protein p53 inducible protein 8	EI24	NM_004879, NM_001007277	0,37
69	emopamil binding protein	EBP	NM_006579	0,38
70	isocitrate dehydrogenase 1	IDH1	NM_005896	0,38
71	apolipoprotein A-I	APOA1	NM_000039	0,38
72	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 9	DHX9	NM_001357	0,38
73	Enoyl Coenzyme A hydratase 1	ECH1	NM_001398	0,40
74	S-adenosylhomocysteine hydrolase-like 1	AHCYL1	NM_006621	0,44
75	Rhesus blood group, B glycoprotein	RHBG	NM_020407	0,48
76	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	EEF1A1	NM_001402	0,51
77	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 18	DDX18	NM_006773	0,70

## **11 Erklärung**

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbstständig und unter ausschließlicher Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt zu haben. Alle Stellen, die aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, wurden als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den