

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik
und Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin IV
Schwerpunkt Endokrinologie und Diabetologie,
Angiologie, Nephrologie und Klinische Chemie
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H.-U. Häring**

**Effekte von Endothelin-1
auf die Phosphorylierung
des Insulin-Rezeptor-Substrates-1 an
Serin 307 und Serin 318**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Sylvia Carina Barth

**aus
Schwäbisch Gmünd**

2011

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichtstatter: Professor Dr. Dr. H.-U. Häring

2. Berichtstatter: Professor Dr. F. Lang

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1 Bedeutung des Diabetes mellitus	6
1.2 Insulinresistenz und Arteriosklerose	9
1.3 Endothelin-1	10
1.4 Signaltransduktion und Phosphorylierung	13
1.5 Die Insulinsignalkaskade	14
1.6 Insulin-Rezeptor-Substrate (IRS)	17
1.7 Molekulare Mechanismen der Insulinresistenz	19
1.8 Serin-Phosphorylierung an IRS-1	20
1.9 Serin-307- und Serin-318-Phosphorylierung von IRS-1	23
1.10 Ziele	25
2. Material und Methoden	27
2.1 Material	27
2.1.1 Chemikalien	27
2.1.2 Antikörper	30
2.1.3 Verbrauchsmaterialien	31
2.1.4 Geräte	32
2.1.5 Verwendete Puffer und Lösungen	33
2.2 Methoden	34
2.2.1 Zellkultur	34
2.2.2 Gewinnung von Zelllysaten	35
2.2.3 Proteinbestimmung	35
2.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	36
2.2.5 Western-Blotting	37
2.2.6 Densitometrie und statistische Analysen	38
3. Ergebnisse	39
3.1 Die Endothelin-1-abhängige Phosphorylierung von IRS-1 an Serin 318 und Serin 307 in C2C12-Myotuben	39

3.2 Kinasen der Endothelin-1-induzierten Serin-318-Phosphorylierung an IRS-1	43
3.3 IRS-1-Phosphorylierung an Serin 318 infolge der Aktivierung des PI3-Kinase/mTOR-Signalweges	46
3.4 Hemmung (Inhibierung) der Insulin-induzierten Glukoseaufnahme durch Endothelin-1	47
3.5 Endothelin-1-abhängige Phosphorylierung von IRS-1 an Serin 318 in Adipozyten	48
4. Diskussion	51
5. Zusammenfassung	56
6. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	58
7. Abbildungen und Tabellen	61
7.1 Abbildungen	61
7.2 Tabellen	62
8. Literaturverzeichnis	63
9. Danksagung	76
10. Lebenslauf	78

1. Einleitung

1.1 Bedeutung des Diabetes mellitus

Diabetes mellitus ist als eine der häufigsten chronischen Erkrankungen zu einer Epidemie unserer Zeit geworden. Schätzungen zur Folge werden im Jahr 2010 246 Millionen und im Jahr 2025 380 Millionen Erkrankte weltweit gezählt. In Deutschland sind etwa 7 bis 8 % der Gesamtbevölkerung betroffen. Die Tendenz ist auch hier weiter steigend. Außerdem nicht zu vergessen ist der Anteil jener Personen mit Diabetes mellitus, bei denen die Erkrankung bislang noch nicht diagnostiziert wurde. Insgesamt muss unter Berücksichtigung dieses Aspekts davon ausgegangen werden, dass sogar etwa jeder Zehnte von dieser Erkrankung betroffen ist [Stefan, N. et al., 2009].

Der Begriff Diabetes mellitus umfasst verschiedene Formen chronischer Stoffwechselerkrankungen, die mit einer verminderten Insulinbildung oder Insulinwirkung einhergehen. Gemeinsames Leitsymptom bei unbehandelten Patienten ist die Hyperglykämie. Diabetes mellitus Typ 1 und 2 sind die beiden Hauptformen dieser Erkrankung.

Der Diabetes mellitus Typ 1 geht mit einer Zerstörung der Insulinproduzierenden Betazellen des Pankreas im Rahmen einer Autoimmuninsulinitis einher. Der fortschreitende Untergang der Betazellen führt zu einem zunehmenden, absoluten Insulinmangel. Sind 80 bis 90 % der Betazellen zerstört, manifestiert sich der Diabetes mellitus Typ 1 klinisch mit den Leitsymptomen Polyurie, Polydipsie, Gewichtsverlust und Leistungsschwäche. Meist erfolgt diese Manifestation bereits in den ersten beiden Lebensdekaden.

Bei 95 % aller Diabeteserkrankungen handelt es sich jedoch um den Diabetes mellitus Typ 2, welcher sowohl mit makrovaskulären Komplikationen, wie Herzinfarkt und Schlaganfall, als auch mit mikrovaskulären Problemen, wie der diabetischen Nephropathie oder Retinopathie, einhergeht. Personen mit Diabetes mellitus Typ 2 haben ein ebenso hohes Risiko für einen Herzinfarkt wie Nichtdiabetiker, die bereits einen Herzinfarkt erlitten haben [Haffner, S. M.,

1999]. Diese Form des Diabetes mellitus verläuft initial meist schleichend, da die klassische Symptomatik des Insulinmangels nur selten besteht. Daher wird die Diagnose des Diabetes mellitus Typ 2 oft zufällig im Rahmen einer Routineuntersuchung des Blutzuckers gestellt, oder aber erst dann, wenn bereits eine der oben genannten Komplikationen aufgetreten ist.

In der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2 spielen die periphere Insulinresistenz und die Dysfunktion der Insulin-produzierenden Betazellen des Pankreas eine entscheidende Rolle [Reaven, G. M. et al., 1984]. Es handelt sich dabei zunächst um einen relativen Insulinmangel durch die periphere Insulinresistenz, welcher zu Beginn mit einer gesteigerten körpereigenen Insulinproduktion ausgeglichen werden kann. Ist dieser Kompensationsmechanismus erschöpft, wird die Erkrankung im Rahmen einer chronischen Hyperglykämie manifest.

Risikofaktoren für eine zunehmende Insulinresistenz sind Übergewicht, Fehlernährung in Form von ballaststoffarmer, fett- und kalorienreicher Kost, Bewegungsmangel und eine genetische Prädisposition [Bazzano, L. A. et al., 2005]. Allein in der Bundesrepublik Deutschland sind nach Angaben des Bundesforschungsinstituts für Ernährung und Lebensmittel zwei von drei Männern und jede zweite Frau übergewichtig. Die Kosten im Gesundheitswesen, die in Deutschland aufgrund ernährungsbedingter Krankheiten entstehen, schätzt der Bund auf 70 Milliarden Euro pro Jahr [Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 2010]. Dabei könnten Erkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 2 durch geeignete Präventionsmaßnahmen und Reduktion der Hauptrisikofaktoren durchaus vermieden bzw. hinausgezögert werden [Bazzano, L. A. et al., 2005].

Wie auch in der Prävention sollte für die Therapie der Insulinresistenz und des Diabetes mellitus Typ 2 die Modifikation des Lebensstils in Form einer Steigerung der körperlichen Aktivität und einer Reduktion der Kalorienaufnahme und damit des Körpergewichts zunächst im Vordergrund stehen [Steyn, N. P. et al., 2004]. Bereits eine moderate Erhöhung der körperlichen Bewegung verbessert die Glukosetoleranz und die Insulinsensitivität sowohl bei

normalgewichtigen, also auch bei übergewichtigen Personen, auch wenn eine signifikante Reduktion des Körpergewichts ausbleibt [Kelley, D. E. et al., 1999]. Direkt nach körperlicher Aktivität kommt es zu einem Anstieg der endogenen Insulinausschüttung. Das Resultat ist eine gesteigerte Glukoseaufnahme in die Zellen. Dieser Effekt wird insbesondere in Leberzellen deutlich, zeigt sich aber auch in weiteren für die Insulinsensitivität wichtigen Geweben wie dem Skelettmuskel [Hoene, M. et al., 2009]. Zudem wurde in unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass eine Abnahme des viszeralen Fettgewebes und der Leberverfettung zu einer verbesserten Glukosetoleranz führen [Schafer, S. et al., 2007].

Oftmals gestaltet sich jedoch eine dauerhafte Veränderung der Lebensgewohnheiten schwierig und nicht selten findet ein Rückfall in alte Verhaltensmuster statt. Daher kommt der Erforschung neuer Therapieansätze zur Bekämpfung dieser epidemiologisch so bedeutsamen Erkrankung Diabetes Mellitus Typ 2 auch in Zukunft eine immense Bedeutung zu. Ein neuerer Ansatz, mit dem sich unsere Arbeitsgruppe ebenfalls beschäftigt, ist die Identifizierung genetischer und phänotypischer Prädiktoren, die mit einem erhöhten Risiko eine Insulinresistenz zu entwickeln einhergehen. Auf diesem Weg könnten in Zukunft basierend auf dem individuellen Risiko geeignete Präventionsstrategien etabliert werden [Stefan, N. et al., 2009].

Sollten die Maßnahmen zur Modifikation des Lebensstils nicht zu einer ausreichenden Stoffwechselkontrolle führen, ist die Einleitung einer medikamentösen Therapie mit oralen Antidiabetika und gegebenenfalls auch mit Insulin indiziert.

Die Aufklärung der molekularen Mechanismen, die zur Entstehung von Insulinresistenz und Diabetes mellitus Typ 2 beitragen, insbesondere die Aufdeckung der pathologischen Veränderungen in der Insulinsignalkaskade, ist für eine gezielte Pharmakotherapie von großer Bedeutung. Nur mit Hilfe eines genaueren Verständnisses der Insulinsignaltransduktion können neue, wirksame Medikamente, die sich günstig auf die Insulinresistenz auswirken, etabliert werden.

Zudem ist es wichtig, die genauen Verknüpfungen aufzuklären, über die der Diabetes mellitus Typ 2 und das erhöhte kardiovaskuläre Risiko eng verbunden sind, nicht zuletzt weil arteriosklerotische Erkrankungen zur führenden Todesursache weltweit geworden sind und Menschen mit Diabetes mellitus Typ 2 ein stark erhöhtes Risiko haben Erkrankungen des Herzkreislaufsystems zu entwickeln [Vinereanu, D., 2006].

1.2 Insulinresistenz und Arteriosklerose

Personen mit gestörter Glukosetoleranz und vor allem solche mit manifestem Diabetes mellitus Typ 2 weisen ein zwei- bis vierfach erhöhtes kardiovaskuläres Risiko auf [Haffner, S. M. et al., 1992].

In der Framingham-Offspring-Studie wurde eine starke positive Assoziation zwischen erhöhten Nüchterninsulinwerten und erhöhten Konzentrationen an thrombogenen Faktoren festgestellt [Meigs, J. B. et al., 2000]. Zu den thrombogenen Faktoren zählen das Antigen des gewebespezifischen Plasminogenaktivators (tPA), Faktor-VII-Antigen, Von-Willebrand-Faktor-Antigen und Fibrinogen. Der gewebespezifische Plasminogenaktivator, der aus den Endothelzellen der Gefäßwand freigesetzt wird, wirkt als körpereigener Aktivator der Fibrinolyse [Juhan-Vague, I. et al., 1992]. Faktor-VII-Antigen und Von-Willebrand-Faktor-Antigen (vWF-Antigen) hemmen beide die Blutgerinnung und stellen Risikofaktoren für die Entstehung von Arteriosklerose dar [Hernandez, L. R. et al., 2000]. Fibrinogen, welches die Häufigkeit für das Auftreten von Arteriosklerose aufgrund seiner Rolle bei der Thrombozytenaggregation, der Plasmaviskosität und der Fibrinbildung direkt erhöhen soll, ist ein weiterer bedeutender Faktor der oben genannten Assoziation [Kannel, W. B., 2005].

Folgende Faktoren sind überdies für die Verknüpfung zwischen Glukoseintoleranz und kardiovaskulärem Risiko wichtig: Eine verminderte Adiponektinkonzentration, sowie erhöhte Konzentrationen an vascular cell adhesion molecule-1 mit der daraus resultierenden verstärkten Adhäsion von T-

Lymphozyten am Endothel der Koronararterien, Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI)-1, ein Hauptinhibitor der Fibrinolyse, sowie die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) [Boyle, P. J., 2007]. Auch über den durch die Proteinkinase C (PKC) vermittelten Signalweg der Insulinsignalkaskade sind Insulinresistenz und Arteriosklerose miteinander verknüpft, da die PKC einerseits wichtig ist für die intrazelluläre Weiterleitung des Insulinsignals (im Kapitel „Die Insulinsignalkaskade“ näher beschrieben) und andererseits bei der Apoptose von Endothelzellen und damit der Progression arteriosklerotischer Läsionen eine Rolle spielt [Staiger, K. et al., 2009].

Ein weiterer möglicher Faktor, der ein Bindeglied zwischen Insulinresistenz und kardiovaskulärem Risiko sein könnte, ist Endothelin-1 (ET-1). So konnten bei Personen mit Diabetes mellitus Typ 2 ca. 3,4-fach [Takahashi, H. et al., 1990], mit Diabetes mellitus Typ 2 und Retinopathie ca. 2,4-fach [Kawamura, K. et al., 1992], mit Übergewicht [Ferri, C. et al., 1995] oder Hypertonie ca. 1,4-fach [Kohno, M. et al., 1990] erhöhte Endothelin-1-Plasmaspiegel - verglichen mit gesunden Personen - beobachtet werden.

1.3 Endothelin-1

Endothelin ist ein aus 21 Aminosäuren aufgebautes Peptid, welches in mindestens 3 Isoformen im Körper vorliegt. Es entfaltet seine Wirkung unter anderem an den glatten Muskelzellen der Gefäße und des Gastrointestinaltraktes.

Endothelin-1 zeichnet sich durch seine potente Wirkung im Herzkreislaufsystem aus [Masaki, T., 1989]. Es wird von Endothelzellen ausgeschüttet und spielt bei der Regulation des Gefäßtonus durch glatte Muskelzellen, bei Gewebe-Remodelling, Chemotaxis von Makrophagen, Differenzierung von Fibroblasten und bei der Zellproliferation eine wichtige Rolle [Remuzzi, G. et al., 2002; Watanabe, T. et al., 1989].

Über die Bedeutung des bevorzugt in der Niere produzierten Endothelin-2 ist bislang wenig bekannt. Für Endothelin-3 hingegen konnte ein zusätzlicher

Einfluss auf das zentrale Nervensystem nachgewiesen werden [Matsumoto, H. et al., 1989]. Es wird vermutet, dass es dort an der Steuerung wichtiger Funktionen wie der Entwicklung und Proliferation von Astrozyten und Neuronen beteiligt ist [Shinmi, O. et al., 1989].

Endothelin vermittelt seine Effekte über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit 7 Transmembrandomänen [Lyn, H. Y. et al., 1991]. Derzeit sind 2 Rezeptorsubtypen des Endothelinrezeptors bekannt, Endothelin-A-Rezeptoren (ET_A) und Endothelin-B-Rezeptoren (ET_B), die jeweils aus den drei Untereinheiten α , β und γ aufgebaut sind und je nach Aktivierung der jeweiligen Untereinheit für unterschiedliche Effekte verantwortlich sind [Panek, R. L. et al., 1992]. ET_A -Rezeptoren liegen unter anderem in den glatten Muskelzellen der Blutgefäße vor, wo sie die durch Endothelin-1 verursachte Vasokonstriktion durch Aktivierung der β -Untereinheit des ET_A -Rezeptors vermitteln [Cyr, C. et al., 1993]. ET_B -Rezeptoren hingegen sind auf dem Endothel, den Epithelzellen und auf glatten Muskelzellen nachweisbar. Während ET_B -Rezeptoren an den glatten Muskelzellen der Blutgefäße ebenfalls eine Vasokonstriktion über die Aktivierung der α -Untereinheit des ET_B -Rezeptors vermitteln, führt die Stimulation der β -Untereinheit des ET_B -Rezeptors an Endothelzellen über die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) zu einer Vasodilatation [Mc Culloch, K. M. et al., 1995].

Zur Veranschaulichung der Wirkung von Endothelin-1 und seiner Interaktion mit anderen gefäßwirksamen Substanzen dient **Abb. 1**.

Abb. 1

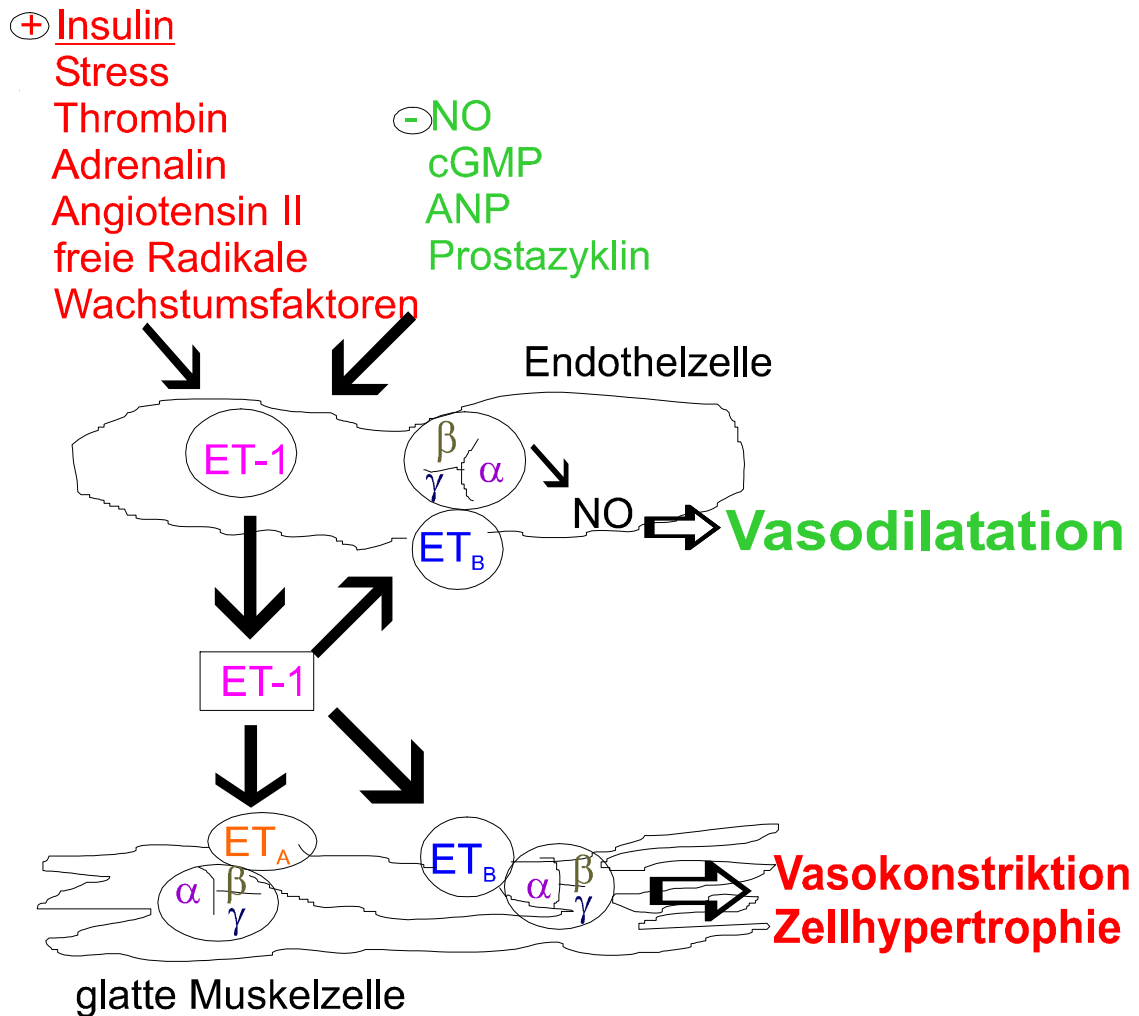


Abb. 1 : Regulation des Endothelin-1-Systems (modifiziert nach Marasciulo, L. et al., 2006).

ET-1, Endothelin-1; NO, Stickstoffmonoxid; cGMP, zyklisches Guanosinmonophosphat; ANP, antinatriuretisches Peptid; ET_A, Endothelin-A-Rezeptor; ET_B, Endothelin-B-Rezeptor.

Scherstress, Thrombin, Adrenalin, Angiotensin II (AT II), Wachstumsfaktoren, Zytokine, freie Radikale und Insulin führen zu einer gesteigerten Freisetzung von Endothelin-1, während Stickstoffmonoxid (NO), zyklisches

Guanosinmonophosphat (cGMP), antinatriuretisches Peptid (ANP) und Prostazykline hemmend auf die Freisetzung wirken.

Eine chronische Aktivierung des Endothelin-1-Systems kann zu einer gestörten Glukosetoleranz und zu Insulinresistenz führen [Marasciulo, F. L. et al., 2006]. Endothelin-1 nimmt Einfluss auf die Insulinsignalkaskade über eine Reduktion der Tyrosinphosphorylierungen und der Expression von IRS-1 in Adipozyten [Wilkes, J. J. et al., 2003]. Es ist demnach möglich, dass eine direkte Interaktion zwischen den Endothelzellen und den Adipozyten Endothelin-1-vermittelt stattfindet [Gogg, S. et al., 2009]. In vorherigen Arbeiten wurde dargelegt, dass eine chronische Behandlung von 3T3L1-Adipozyten mit Endothelin-1 zu einer verminderten Insulin-induzierten Glukoseaufnahme in die Zellen führt [Ishibashi, K. I. et al., 2001]. Im Tiermodell mit WKY-Ratten (Wistar Kyoto Ratten) konnte gezeigt werden, dass Endothelin-1 die Insulin-induzierte Glukoseaufnahme um ca. 23 % verringert [Wilkes, J. J. et al., 2003].

Auch beim Menschen führte eine exogene Endothelin-1-Zufuhr ($4 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) zu einer peripheren Insulinresistenz bei gesunden Personen. Dies äußerte sich in einer ca. 31%-igen Reduktion der gesamten Glukoseaufnahme und einer ca. 26% niedrigeren Glukoseaufnahme in der Beinmuskulatur. Dabei kam es zusätzlich zu einer Erhöhung des mittleren arteriellen Blutdrucks aufgrund der vasomotorischen Wirkung von Endothelin-1 [Ottosson-Seeberger, A. et al., 1997].

1.4 Signaltransduktion und Phosphorylierung

Als Signaltransduktion wird die Weiterleitung und Regulierung der Signale von außerhalb der Zelle über Rezeptoren ins Zellinnere bezeichnet. Solche Rezeptoren sind Proteine, die als integrale Membranproteine, als zytoplasmatische Proteine oder als Kernproteine vorliegen können. Erfolgt die Signaltransduktion in einem mehrstufigen Prozess, wird dieser als Signalkaskade bezeichnet.

Die Aktivierung der einzelnen Proteine ist häufig mit Phosphorylierungen verbunden. Dies bedeutet die Bindung eines Phosphatrestes an die Seitenketten von Aminosäuren wie Serin, Threonin oder Tyrosin.

Resultate der Signaltransduktion sind eine gesteigerte oder verminderte Transkription von Zielgenen und der entsprechenden Proteinexpression, Stoffwechseländerungen sowie Differenzierung, Proliferation, Apoptose oder Migration von Zellen [Löffler, G. et al., 2003].

1.5 Die Insulinsignalkaskade

Das Peptidhormon Insulin wird von den Betazellen des Pankreas als Antwort auf einen erhöhten Blutzuckerspiegel sezerniert. Seine metabolischen und mitogenen Effekte vermittelt Insulin über die Bindung an dessen Rezeptoren auf der Zelloberfläche der Zielgewebe Leber-, Muskel- und Fettgewebe und im zentralen Nervensystem.

Abb. 2 zeigt eine schematische Übersicht wichtiger Schritte der Insulinsignalkaskade.

Abb. 2

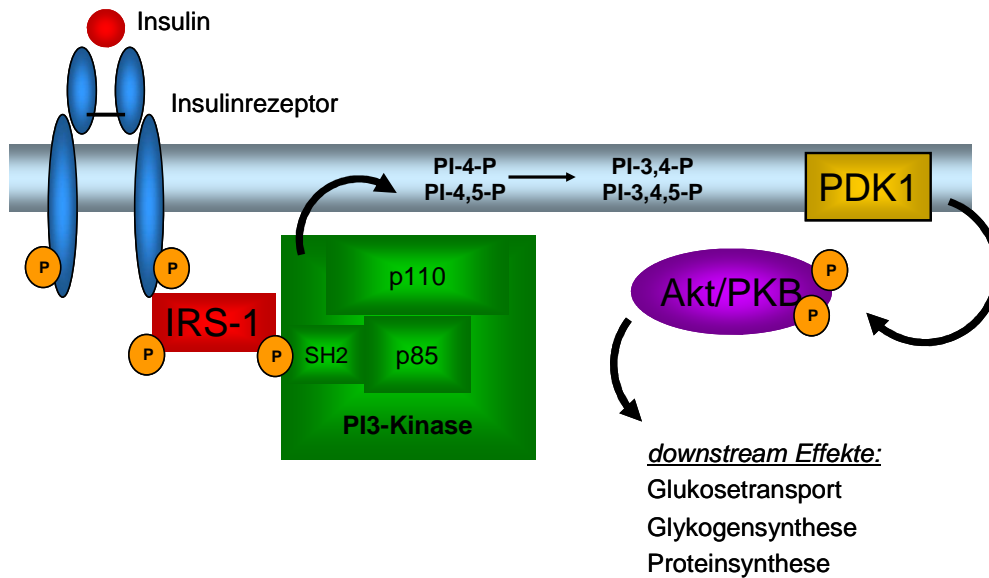


Abb. 2: Ausschnitt aus der Insulinsignalkaskade (entnommen aus Fiedler, H., 2007)

Der Insulinrezeptor besteht aus 2 extrazellulären α - und 2 transmembranären β -Untereinheiten. Wenn Insulin an die extrazelluläre α -Untereinheit des Insulinrezeptors (IR) bindet, kommt es zunächst zur Autophosphorylierung des Rezeptors über eine rezeptoreigene Tyrosinkinase an der transmembranären β -Untereinheit [Kasuga, M. et al., 1982]. Daraufhin interagiert der Insulinrezeptor durch phosphorylierte Tyrosinreste mit verschiedenen weiteren Proteinen [White, M. F. et al., 1989; White, M. F. et al., 1994] wie den Insulin-Rezeptor-Substraten (IRS) 1-6 [Kellerer, M. et al., 1998; White, M. F., 1998] und phosphoryliert diese wiederum an Tyrosinresten [Häring, H.-U. et al., 1985]. In den vergangenen Jahren konnte die Rolle von IRS-1 und IRS-2 in der Insulinsignalkaskade genauer beleuchtet werden, während die Funktion der anderen IRS-Proteine noch unzureichend bekannt ist. Über diese phosphorylierten Tyrosinreste kann IRS-1 mit Proteinen, wie der

Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-K), durch deren SH2-Domänen interagieren. Die PI3-Kinase besteht aus einer katalytischen (p110) und einer regulatorischen Untereinheit (p85) mit den SH2-Domänen und stellt die Schnittstelle zwischen Tyrosin- und Serinphosphorylierungen innerhalb der Insulinsignalkaskade dar [Myers, M. G. et al., 1992; Shepherd, P. R. et al., 1998]. Nach ihrer Aktivierung phosphoryliert die PI3-Kinase verschiedene Phosphatidylinositole an Position 3 des Inositolrings (Phosphatidyl-Inositol-4-Phosphat (PI-4-P) wird phosphoryliert zu Phosphatidyl-Inositol-3,4-diphosphat (PI-3,4-P) und Phosphatidyl-Inositol-4,5-diphosphat (PI-4,5-P) zu Phosphatidyl-Inositol-3,4,5-triphosphat (PI-3,4,5-P)). Daraufhin wird die phospholipidabhängige Kinase 1 (engl.: phospholipid-dependent-kinase 1; PDK 1) aktiviert [Cohen, P. et al., 1997; Alessi, D. R. et al., 1997], welche ihrerseits wiederum zur Aktivierung der Protein-Kinase B (PKB)/Akt führt. Unter Einbeziehung weiterer Moleküle werden letztlich wichtige Stoffwechselmechanismen, wie Glukoseaufnahme in Muskel- und Fettzellen, Glykogensynthese und -speicherung in Leber- und Muskelgewebe, Triglyzeridsynthese in Leber- und Fettgewebe, sowie die Speicherung von Aminosäuren im Muskelgewebe und die Proteinsynthese reguliert [Ueki, K. et al., 1998; De Fronzo, R. A. et al., 2001].

Weitere Funktionen von Insulin sind die Hemmung der hepatischen Glukoneogenese sowie der Einfluss auf die Regulation von Zellwachstum und Proliferation durch Aktivierung der Transkription von Genen, die von entscheidender Bedeutung für den Ablauf des Zellzyklus sind [Klarlund, J. K. et al., 1997; Straus, D. S., 1989].

Neben der Phosphorylierung von Tyrosinresten an IRS-1 ist ebenfalls eine Phosphorylierung an Serin- und Threoninstellen möglich [Kasuga, M. et al., 1982]. Gerade die letztgenannten Phosphorylierungen ermöglichen eine Feinabstimmung und unter anderem auch eine Negativregulation der Insulinsignalkaskade [Li, J. et al., 1999]. Eine Negativregulation an IRS-1 über Serin- oder Threoninkinasen kann zum Beispiel durch die jun-Kinase (JNK), mammalian Target of Rapamycin (mTOR) oder die p70S6-Kinase stattfinden [De Fea, K. et al., 1997]. Hierbei wird infolge der Serinphosphorylierung die Weiterleitung des intrazellulären Insulinsignals zum einen durch Hemmung der

Tyrosinphosphorylierung von IRS-1 [Hotamisligil, G. S. et al., 1996] und zum anderen durch eine IRS-1-Degradation durch Proteasomen beeinträchtigt [Egawa, K. et al., 2000].

1.6 Insulin-Rezeptor-Substrate (IRS)

Die IRS-Proteine spielen eine zentrale Rolle in der Insulinsignalkaskade und somit auch bei der Entwicklung der Insulinresistenz [Kellerer, M. et al., 1998]. Aus diesem Grund lässt sich postulieren, dass man über eine Verbesserung der Funktion der IRS, eine Verlängerung ihrer Wirksamkeit und Regulation einer adäquaten Phosphorylierung positiv auf die Insulinsensitivität Einfluss nehmen könnte. In den letzten Jahren wurden verschiedene Moleküle aus der Insulinsignalkaskade als mögliche pharmakologische Angriffspunkte diskutiert, darunter Phosphatasen [Müssig, K. et al., 2005], SOCS-Proteine (suppressor of cytokine signalling), Kinasen, Ubiquitin-abhängige Proteasomen und die IRS-Proteine selbst [Gual, P. et al., 2005]. IRS-Proteine haben in der Insulinsignalkaskade eine Schlüsselposition in der Übermittlung des extrazellulären Insulinsignals in verschiedene metabolische, mitogene und antiapoptotische intrazelluläre Signalwege. Glukose- und Fettstoffwechsel werden hierbei vor allem über den PI3-Kinase/Akt-Signalweg und über die Aktivierung der mitogen-activated-protein (MAP)-Kinase, welche Einfluss hat auf Genexpression, Zellwachstum und -differenzierung, reguliert. Neuesten Publikationen unserer Arbeitsgruppe zur Folge führen eine erhöhte Muskelaktivität und eine erniedrigte Plasmaglukosekonzentration zu einer Aktivierung des MAP-Kinase Signalweges [Hoene, M. et al., 2010].

Überdies sind die IRS-Proteine von Bedeutung bei der Übermittlung des Insulin-like-growth-factor-1 (IGF-1) Signals. Insulin bleibt aber der physiologische Hauptregulator der IRS-vermittelten Signalkaskaden [Fritsche, L. et al., 2008].

Eine verminderte Anzahl an IRS in der Leber, sowie eine verstärkte Serin- oder Threoninphosphorylierung der IRS-Proteine, spielen neben anderen

Veränderungen in der Entwicklung der Insulinresistenz und des Diabetes mellitus Typ 2 eine wichtige Rolle [Gual, P. et al., 2005; Zick, Y., 2004].

Bekannt sind bislang 6 verschiedene IRS-Proteine (IRS 1-6). IRS-1, -2, -4, -5 und -6 werden in menschlichen Geweben exprimiert, während IRS-3 nur in Fettgewebe und Gehirn von Nagetieren nachgewiesen werden konnte. Der Fokus unserer Arbeitsgruppe liegt auf der Untersuchung der Isoformen IRS-1 und -2, deren Grundarchitektur sehr ähnlich ist. N-terminal findet sich eine pleckstrin-homology (PH)-Domäne, über welche eine Interaktion des Proteins mit Phosphatidylinositolen der Zellmembran erfolgt. In unmittelbarer Nähe findet sich eine phosphotyrosin-bindende (PTB)-Domäne, welche für die Interaktion mit dem Tyrosin-phosphorylierten Insulinrezeptor verantwortlich ist. Das c-terminale Ende enthält eine Vielzahl an Tyrosinphosphorylierungsstellen, die im phosphorylierten Zustand wiederum mit verschiedenen Proteinen interagieren, wie beispielsweise der SH2-Domäne der Protein-Tyrosin-Phosphatase und der p85-Regulationseinheit der PI3-Kinase (siehe hierzu auch Abb. 2) [Fritsche, L. et al., 2008]. Die IRS-Proteine werden demnach nicht nur über die Aktivierung von Kinasen, sondern auch mittels Phosphatasen reguliert, deren Mechanismus jedoch bislang weniger gut untersucht ist. Die Phosphatasen sind somit an der Modulation des Insulinsignals und auch an der Entstehung der Insulinresistenz beteiligt [Egawa, K. et al., 2001]. IRS-1 enthält 34 Tyrosin- und 244 Serin-/Threoninphosphorylierungsstellen, welche auf die Weiterleitung des Insulinsignals unterschiedlich Einfluss nehmen [Weigert, C. et al., 2008].

Eine Verknüpfung zwischen einer gestörten Insulinsignalkaskade und einem erhöhten kardiovaskulären Risiko konnte bereits auch auf IRS-1-Ebene gezeigt werden. So wurden bei Individuen mit einer erniedrigten Expression von IRS-1 in Adipozyten Frühzeichen der Arteriosklerose wie eine verdickte Intima und Media und eine verminderte Elastizität der Gefäßwand festgestellt [Sandquist, M. et al., 2005].

1.7 Molekulare Mechanismen der Insulinresistenz

Bei der Entwicklung der Insulinresistenz spielen sowohl Rezeptor- als auch Postrezeptordefekte eine wichtige Rolle [Kellerer, M. et al., 1995]. In Adipozyten, bzw. Monozyten von adipösen Menschen wurden eine Reduktion der in der Zellwand gelegenen Insulinrezeptoren [Molina, J. M. et al., 1989] sowie Fehler bei der Internalisierung und bei der Wiederfreisetzung der internalisierten Rezeptoren beobachtet [Trichitta, V. et al., 1989]. In insulinempfindlichen Geweben, wie dem Skelettmuskel, wurde überdies bei Typ-2-Diabetikern eine reduzierte Tyrosinkinaseaktivität des Insulinrezeptors ohne eine Veränderung der Anzahl an Rezeptoren oder der Rezeptorbindung gezeigt [Cusi, K. et al., 2000; Wilden, P. A. et al., 1994].

Physiologisch führt ein Anstieg von Insulin im Plasma bei nicht übergewichtigen Personen zu einer Steigerung der Tyrosinphosphorylierung des Insulinrezeptors und von IRS-1 um 150-200 %. Bei übergewichtigen Nichtdiabetikern ist dieser Anstieg eingeschränkt und bei Personen mit Diabetes mellitus Typ 2 bewirkt Insulin keine signifikante Steigerung der oben genannten Tyrosinphosphorylierungen mehr [Hotamisligli, G. S. et al., 1996]. Infolge der reduzierten Tyrosinkinaseaktivität des Insulinrezeptors [Häring, H. U., 1991] besteht bei übergewichtigen Nichtdiabetikern und Personen mit Typ-2-Diabetes mellitus eine stark beeinträchtigte Insulinsignalkaskade, die in einer Verminderung der Insulin-abhängigen Glukoseaufnahme zum Ausdruck kommt [Björnholm, M. et al., 1997].

In vorausgehenden Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass in Abhängigkeit der verschiedenen Stimuli unterschiedliche Signalwege aktiviert werden. Beispielsweise führt eine reine Erhöhung des Blutglukosespiegels zu einer Hemmung von Tyrosinphosphorylierung und -dephosphorylierung an IRS-1, während sich TNF- α nur auf die Tyrosinphosphorylierung, nicht jedoch auf die Dephosphorylierung, hemmend auswirkt [Kroder, G. et al., 1996]. Eine kurzfristige Insulinstimulation führt zu einer Aktivierung der IRS-1-Proteine, eine chronische Insulinstimulation bewirkt jedoch, wie auch eine Behandlung mit anderen Faktoren wie TNF- α , Interferon- γ , Platelet-derived-growth-factor

(PDGF) oder Phorbolestern eine Degradation von IRS-1 durch Proteasomen. Diese Degradation wird vermutlich vor allem über die mTOR-Kinase vermittelt, welche über die PI3-Kinase/Akt/PKB-Signalkaskade aktiviert wird [White, M. F., 2006]. Die über den mTOR/S6-Kinase Signalweg vermittelte Serinphosphorylierung von IRS-1 führt zu einer Freisetzung von IRS-1 aus intrazellulären Komplexen, wodurch wiederum eine Proteindegradation möglich wird.

1.8 Serin-Phosphorylierung an IRS-1

Heute ist bekannt, dass die Tyrosinphosphorylierung an IRS-1 und die anschließende Bindung von IRS-1 an die PI3-Kinase von entscheidender Bedeutung für den Insulin-abhängigen Glukosetransport sind [Häring, H.-U. et al., 1994]. Serin-/Threoninphosphorylierungen an IRS-1 sind wichtige regulatorische Mechanismen, welche zu einer Reduktion der Tyrosinphosphorylierung an IRS-1, der PI3-Kinaseaktivität und letztlich der Glukoseaufnahme in die Zelle führen können [Tanti, J. F. et al., 2004]. Obwohl die Insulin-induzierten Serin-/Threoninphosphorylierungen an IRS-1 schon 1982 beschrieben wurden [Kasuga, M. et al., 1982], sind die Mechanismen der Insulinsignalkaskade im Detail bis heute nicht vollständig aufgedeckt.

Die Regulation der Proteine IRS-1 und -2 erfolgt wie bereits im vorherigen Kapitel beschrieben auf Ebene der Expression, der Degradation, der Änderung der subzellulären Lokalisation, sowie über die posttranslationale Modifikation in Form von Tyrosin- und Serin-/ Threoninphosphorylierungen, [Weigert, C. et al., 2008]. Darüber hinaus findet eine Beeinflussung über Nitrosilierung, Acetylierung und Acetylglukosaminomodifikation statt.

Abb. 3 zeigt eine schematische Übersicht über die posttranslationale Modifikation der IRS-Proteine sowie der Interaktion der verschiedenen Signalwege.

Abb. 3

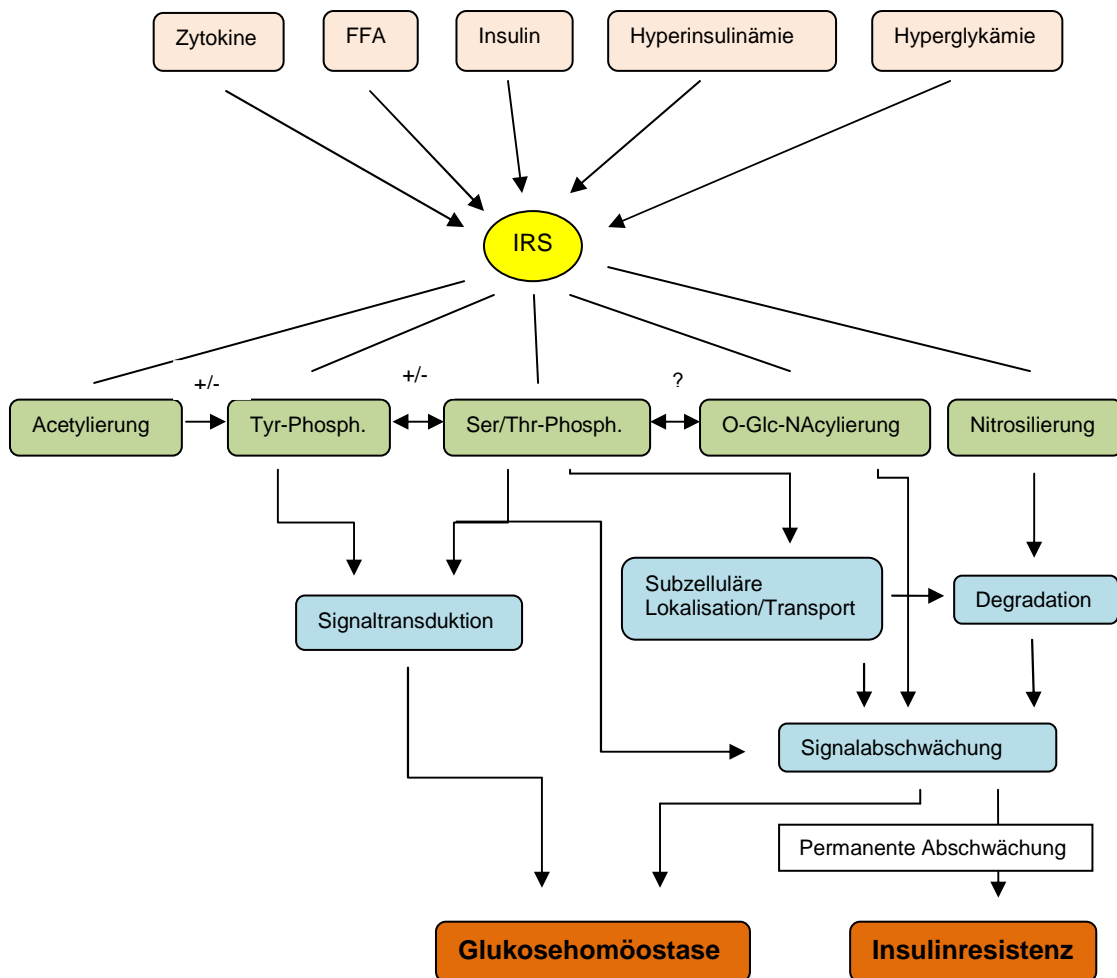


Abb. 3: Posttranslationale Modifikation der IRS-Proteine und Interaktion der einzelnen Signalwege (*modifiziert nach Fritsche, L. et al., 2008*)

FFA, Free Fatty Acids; Tyr-Phosph., Tyrosin-Phosphorylierung; Ser/ Thr-Phosph., Serin-/ Threonin-Phosphorylierung; O-Glc-NAcylierung, Acetylglukosaminomodifikation.

In diesem Schaubild wird die Vielschichtigkeit der posttranslationalen Modifikation der IRS-Proteine deutlich. Insulin führt zunächst wie zu Beginn dieses Kapitels beschrieben zu einer Tyrosinphosphorylierung, über die weitere

Schritte der Insulinsignalkaskade eingeleitet werden. Serin-/Threoninphosphorylierungen können sowohl in Form einer positiven, als auch negativen Regulation auf die Weiterleitung des Insulinsignals Einfluss nehmen [Le Marchand-Brustel, Y. et al., 2003]. Andere Stimuli neben Insulin wie Zytokine, freie Fettsäuren (free fatty acids, FFA) oder ein erhöhter Blutglukosespiegel führen neben Serin-/ Threoninphosphorylierungen auch zu einer Aktivierung weiterer Signalschritte wie Acetylierung, Nitrosylierung und Acetylglukosaminomodifikation (O-Glc-N-Acylierung). Die Bedeutung dieser Modifikationsschritte ist bislang allerdings weniger gut untersucht wie die der Phosphorylierungen. Sie scheinen sich aber ebenfalls sowohl aktivierend, als auch hemmend auf die Signalkaskade auswirken zu können.

Es konnten bereits über 70 der 244 Serin-/Threonin-Phosphorylierungsstellen im IRS-1-Protein mithilfe der Massenspektroskopie [Beck, A. et al., 2003] und der Immunodetektion identifiziert werden [Sun, X. J. et al., 1991; White, M. F., 2006]. Die Nummerierung dieser Phosphorylierungsstellen erfolgte auf der Grundlage der Sequenzierung des IRS-1-Proteins in Ratten. Wie bereits erwähnt dienen diese Serin-/Threonin-Phosphorylierungen der Feinabstimmung und können die Insulinwirkung verstärken oder abmildern [Gual, P. et al., 2005]. Eine chronische Überstimulation der Serinkinasen führt zu einer Hyperphosphorylierung an IRS-1 und ist ein wichtiger pathophysiologischer Mechanismus für die Entstehung von Insulinresistenz und Diabetes mellitus Typ 2 [Fritsche, L. et al., 2008; Waraich, R. et al., 2008]. Daher ist auch die Vermeidung dieser Hyperphosphorylierung ein möglicher pharmakologischer Therapieansatz [Sykiotis, G. P. et al., 2001].

Bislang konnte für die meisten Serinphosphorylierungen eine Negativregulierung der Insulinsignalkaskade aufgedeckt werden. Dazu gehören Serin 24 [Kim, J. K. et al., 2001], Serin 267 [Gao, Z. et al., 2003], Serin 302 [Werner, E. D. et al., 2004], Serin 307 [Aguirre, V. et al., 2000; Rui, L. et al., 2001], Serin 318 [Moeschel, K. et al., 2004], Serin 332 [Lieberman, Z. et al., 2005], Serin 357 [Waraich, R. S. et al., 2008], Serin 408 [Liu, Y. F. et al., 2004], Serin 522 [Giraud, J. et al., 2007], Serin 612 [De Fea, K. et al., 1997], Serin 632 [Um, S. H. et al., 2004], Serin 662 [Li, J. et al., 1999], Serin 731 [Mothe, I. et al.,

1996], Serin 789 [Horike, N. et al., 2003], Serin 994 [Strack, V. et al., 2000], Serin 1023/25 [Strack, V. et al., 2000], Serin 1099/1100 [Li, Y. et al., 2004], Serin 1101 [Li, Y. et al., 2004] und Serin 1177/78/82 [Bossenmaier, B. et al., 2000]. Es kommt dabei infolge der Serinphosphorylierung zu einer Dissoziation des IRS vom Insulinrezeptor oder von intrazellulären Verbindungen, zu einer verminderten Tyrosinphosphorylierung und zur Degradation von Proteinen [Waraich, R. S. et al., 2008]. Umgekehrt reduzieren beispielsweise hochdosierte Salizylatgaben, deren Blutzucker-senkende Wirkung seit längerem bekannt ist, die Serin-307-Phosphorylierung an IRS-1 und wirken somit der Entstehung der Insulinresistenz entgegen [Gao, Z. et al., 2003].

Eine Positivregulierung des Insulinsignals ist bekannt für folgende Serinstellen: Serin 302 [Giraud, J. et al., 2004], Serin 318 [Weigert, C. et al., 2006], Serin 325 [Paz, K. et al., 1999], Serin 629 [Luo, M. et al., 2007], Serin 789 [Jakobsen, S. N. et al., 2001] und Serin 1216 [Luo, M. et al., 2005]. Eine solche Positivregulierung des Insulinsignals infolge Serinphosphorylierungen wird durch die Kinasen mTOR [Müssig, K. et al., 2005], p70S6-Kinase [Um, S. H. et al., 2004], JNK [Aguirre, V. et al., 2000], PKC- α [Nawaratne, R. et al., 2006], PKC- θ [Liu, Y. F. et al., 2004], PKC- δ [Waraich, R. S. et al., 2008], Inhibitor-of- κ B (I κ B) [Kim, J. K. et al., 2001], Glykogen-Synthase-Kinase (GSK)-3 [Liberman, Z. et al., 2005], salt-inducible-Kinase-2 [Horike, N. et al., 2003] und die MAP-Kinase [Gual, P. et al., 2003] vermittelt. Diese Kinasen sind unter physiologischen Bedingungen an der Beendigung der Wirkung des Insulinsignals beteiligt. Wenn es jedoch zu einer dauerhaften Stimulation mit Insulin, freien Fettsäuren oder TNF- α kommt, tragen sie mit zur Entwicklung der Insulinresistenz bei.

1.9 Serin-307- und Serin-318-Phosphorylierung von IRS-1

Der hemmende Effekt einer Serinphosphorylierung an IRS-1 auf die Insulinsignalkaskade wurde bereits vor sechzehn Jahren gezeigt [Tanti, J.-F. et al., 1994]. In den vergangenen Jahren wurden verschiedene Serinstellen, dazu

zählen Serin 307, 318, 612 und 632, beschrieben, deren Phosphorylierung eine Behinderung der Interaktion zwischen IRS-1 und dem IR zur Folge hat [Tanti, J. F. et al., 2004; Moeschel, K. et al., 2004].

Für Serin 307 wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung dieser Aminosäurestelle wichtig ist für die JNK-vermittelte Hemmung der Insulin-stimulierten IR/IRS-1-Interaktion und die Aktivierung der PI3-Kinase [Aguirre, V. et al., 2002; Hilder, T. L. et al., 2003] nach Tyrosinphosphorylierung von IRS-1. Inhibitoren der JNK verbesserten die Glukosetoleranz auch im Tiermodell mit übergewichtigen Mäusen [Bennett, B. L. et al., 2003]. Diese Ergebnisse über die Modulation der Aktivität der an der Weiterleitung des Insulinsignals beteiligten Kinasen sind von größter Bedeutung, da sich aus diesen Erkenntnissen möglicherweise neue Behandlungswege des Diabetes mellitus ergeben [Le Marchand-Brustel, Y. et al., 2003]. Zum Beispiel konnte bei der TNF- α -induzierten Phosphorylierung von IRS-1 an Serin 307 neben der Beteiligung der JNK und des PI3K/mTOR-Signalweges auch eine Aktivierung der Kinasen IKK- β und p70S6K-1 gezeigt werden [De Alvaro, C. et al., 2004].

Vor wenigen Jahren wurde von unserer Arbeitsgruppe mit Serin 318 eine neue für die Pathomechanismen der Insulinresistenz wichtige Phosphorylierungsstelle von IRS-1 identifiziert. Diese wird nach Stimulation mit Insulin über die JNK und den PI3K/mTOR-Signalweg oder nach Stimulation mit dem Phorbol-ester 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) unter anderem durch klassische und atypische Kinasen wie der atypischen PKC- ζ phosphoryliert [Weigert, C. et al., 2008; Weigert, C. et al., 2005]. Nach Phosphorylierung von IRS-1 an Serin 318 kommt es zu einer verminderten Bindung von IRS-1 an den IR sowie zu einer verminderten Tyrosinphosphorylierung von IRS-1 [Moeschel, K. et al., 2004]. Im Gegensatz dazu führte eine Behandlung mit hoher Glukosekonzentration, TNF- α oder freien Fettsäuren nicht zu einer Serin 318-Phosphorylierung [Müssig, K. et al., 2005].

Neuere Arbeiten legen nahe, dass die frühe durch Insulin stimulierte Serin 318-Phosphorylierung sich auch positiv auf die Insulinsignalkaskade auswirken kann, indem sie eine erhöhte Glukoseaufnahme in die Zellen bewirkt [Weigert,

C. et al., 2005]. Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass der regulatorische Einfluss der Serinphosphorylierungen auf die Insulinsignalkaskade nicht für einzelne Serinstellen isoliert betrachtet werden kann. Vielmehr scheint es im zeitlichen Verlauf nach Stimulation zu verschiedenen Wechselwirkungen der Phosphorylierungsstellen untereinander zu kommen, an denen unterschiedliche Kinasen beteiligt sind.

Darüber hinaus scheint es gewebespezifische Unterschiede für die jeweiligen Serin-/Threoninphosphorylierungen zu geben. So konnte beispielsweise in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass es nach Interleukin-6 (IL-6)-Behandlung von Mäusen zu einer PKC- δ -vermittelten Serin-318-Phosphorylierung an IRS-1 in Muskelzellen kommt, nicht aber in Leberzellen. Hingegen findet eine Phosphorylierung an Serin 307 nach Stimulation mit IL-6 nur in der Leber und nicht im Muskelgewebe bei den selben Tieren statt [Weigert, C. et al., 2006]. Die Wirkung von IL-6 auf die Insulinsignalkaskade ist nicht nur vom Gewebe, sondern auch von der Konzentration abhängig. Unter normwertiger IL-6-Konzentration wird die Interaktion des IL-6-Rezeptorkomplexes mit IRS-1 in Skelettmuskelzellen und somit die Wirkung des Insulins gefördert. IL-6 fördert dabei die Insulin-stimulierte Glykogensynthese und die Phosphorylierung der Kinasen Akt und GSK-3 [Weigert, C. et al., 2005]. Bei chronisch erhöhtem IL-6-Spiegel hingegen kann dieser zur Entstehung der Insulinresistenz beitragen [Weigert, C. et al., 2006].

1.10 Ziele

Vorherige Arbeiten zeigten, dass es infolge einer Endothelin-1-Behandlung zur Serinphosphorylierung von IRS-1 kommt [Jiang, Z. Y. et al., 1999]. Die beteiligten Serinstellen wurden bislang jedoch nicht genau identifiziert.

Aus diesem Grund galt es in der vorliegenden Arbeit zu untersuchen, ob Endothelin-1 zu einer Phosphorylierung an den Aminosäuren Serin 307 und Serin 318 führt und welche Kinasen an diesen Phosphorylierungen beteiligt

sind. Anschließend wurde der Frage nachgegangen, ob Endothelin-1 auch in dem hier gewählten Zellmodell zu einer signifikanten Reduktion der Insulin-abhängigen Glukoseaufnahme führt.

Da der Skelettmuskel ein wichtiges Gewebe für die Entwicklung der Insulinresistenz ist [Wallberg-Henriksson, H., 1992], wurden C2C12-Myotuben, ein insulinempfindliches, nicht transfiziertes Zellsystem mit ausreichenden Mengen an endogenem IRS-1, gewählt.

Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob sich die in den C2C12-Myotuben erzielten Ergebnisse auch in 3T3L1-Adipozyten zeigen, einem weiteren, äußerst bedeutsamen Gewebe für die Entwicklung der Insulinresistenz [Scarlett, J. A. et al., 1983].

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Agar-Agar	<i>Roth, Karlsruhe</i>
15-Desoxy-Prostaglandin J2 (15dPGJ2)	<i>Calbiochem, San Diego, USA</i>
Ammoniumpersulfat	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>
Anisomycin	<i>Sigma-Aldrich, Taufkirchen</i>
Apotransferrin	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>
Aprotinin	<i>Sigma-Aldrich, Taufkirchen</i>
Ascorbat	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>
Biotin	<i>Serva, Heidelberg</i>
Bisindolylmaleimid I	<i>Sigma-Aldrich, Taufkirchen</i>
Bovines Serumalbumin Fraktion V	<i>Roth, Karlsruhe</i>
Bromphenolblau	<i>Sigma-Aldrich, Taufkirchen</i>
Corticosteron	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	<i>Lonza, Verviers, BE</i>
Dimethylsulfoxid (DMSO)	<i>Sigma-Aldrich, Taufkirchen</i>
Enhanced-chemiluminescence (ECL)-Reagenz	<i>Amersham, Buckinghamshire, GB</i>
Endothelin-1 human, porcine Produktnr. E 7764	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>
Ethanol	<i>Merck, Darmstadt</i>
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	<i>Roth, Karlsruhe</i>
Ethylenglykoltetraessigsäure (EGTA)	<i>Roth, Karlsruhe</i>
Fötales Kälberserum (FCS)	<i>Lonza, Verviers, BE</i>
Fungizone	<i>Lonza, Verviers, BE</i>
Gelatine	<i>Merck, Darmstadt</i>
Glutamin	<i>Lonza, Verviers, BE</i>

Glycerin	<i>Roth, Karlsruhe</i>
Glycin	<i>Roth, Karlsruhe</i>
4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazin- Ethansulfonsäure (HEPES)	<i>Roth, Karlsruhe</i>
IBMX (3-Isobutyl-1-methyl-Xanthin)	<i>Serva, Heidelberg</i>
Insulin Insuman Rapid 40 I.E./ml	<i>Aventis Pharma, Frankfurt am Main</i>
Isopropanol	<i>Merck, Darmstadt</i>
LY294002	<i>Calbiochem, San Diego, USA</i>
2-Mercaptoethanol	<i>Roth, Karlsruhe</i>
Methanol	<i>Merck, Darmstadt</i>
Magnesiumdichlorid (MgCl ₂)	<i>Merck, Darmstadt</i>
Natriumchlorid (NaCl)	<i>Merck, Darmstadt</i>
Natriumdodecylsulfat (engl.: sodium dodecyl sulfate; SDS)	<i>Roth, Karlsruhe</i>
Natriumfluorid (NaF)	<i>Sigma-Aldrich, Taufkirchen</i>
Natriumpyrophosphat (Na ₂ P ₂ O ₇)	<i>Sigma-Aldrich, Taufkirchen</i>
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	<i>Sigma-Aldrich, Taufkirchen</i>
Panthothenat	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>
Humanes rekombinantes (platelet derived growth factor) PDGF-BB	<i>Tebu-Bio, Rehovot, Israel</i>
Phosphate-buffered saline (PBS)	<i>Lonza, Verviers, BE</i>
PD98059	<i>Alexis Biochemical, Carlsbad, USA</i>
Penicillin/Streptomycin (PenStrep)	<i>Lonza, Verviers, BE</i>
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	<i>Roche Diagnostics, Mannheim</i>
Ponceau S	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>
Rapamycin	<i>Calbiochem, San Diego, USA</i>
Rotiphorese Gel 30	<i>Roth, Karlsruhe</i>
Salzsäure (HCl)	<i>AppliChem, Darmstadt</i>
SB20358	<i>Calbiochem, San Diego, USA</i>
SP600125	<i>Apotech, San Diego, USA</i>
Testlösung zur Proteinbestimmung	<i>Bio-Rad, München</i>
N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin	

(TEMED)	<i>Roth, Karlsruhe</i>
12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetat (TPA)	<i>Sigma-Aldrich, Taufkirchen</i>
Trichloressigsäure	<i>Roth, Karlsruhe</i>
Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan (TRIS)	<i>Sigma-Aldrich, Taufkirchen</i>
Triton X-100	<i>Roth, Karlsruhe</i>
Trypsin	<i>Cambrex, Verviers, BE</i>
Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)	<i>TEBU, Offenbach</i>
Wortmannin	<i>Sigma-Aldrich, Taufkirchen</i>

2.1.2 Antikörper (AK)

- *Cell Signaling, Beverly, USA*
Polyklonaler Kaninchen-Akt-Phosphoserin 473-spezifischer-AK (# 9271)
Polyklonaler Kaninchen-p70S6-Kinase-Phosphothreonin 389-spezifischer-AK (# 9205)
- *Upstate, Lake Placid, USA*
Polyklonaler Kaninchen-IRS-1-Antikörper (# 06-248)
- *Dieser Antikörper wurde uns freundlicherweise von Dr. M. F. White, Joslin Diabetes Center, Boston, MA, USA zur Verfügung gestellt:*
Polyklonaler Kaninchen-IRS1-Phosphoserin 307-spezifischer-Antikörper
- *Universität Tübingen, Laboratorien der Medizinischen Klinik, Abteilung IV*
Polyklonaler Kaninchen-IRS-1-Phosphoserin 318-spezifischer-Antikörper

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Auslauf-Pipetten (5, 10, 25 ml)	<i>Corning Inc., Corning, USA</i>
Bechergläser	<i>Schott, Mainz</i>
Einfrierröhrchen	<i>Nunc Roskilde, DK</i>
Einmalhandschuhe	<i>Ansell, Malaysia</i>
Filter (Porengröße 0,2 µm)	<i>Sartorius, Göttingen</i>
Filterpapier	<i>Sigma Aldrich, Taufkirchen</i>
Glasflaschen mit Plastikdeckel	<i>Schott, Mainz</i>
Hyperfilm ECL	<i>Amersham, Buckinghamshire, GB</i>
Kanülen (BD Microlance3)	<i>Becton Dickinson, Fraga, E</i>
Kunststoffküvetten	<i>Sarstedt, Nümbrecht</i>
Nitrocellulosemembranen	<i>Amersham, Buckinghamshire, GB</i>
Pasteur-Kapillarpipetten (150 mm)	<i>WU, Mainz</i>
Pipettenspitzen	<i>Peske, Aindling</i>
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	<i>Sarstedt, Nümbrecht</i>
Reaktionsgefäße (15 ml)	<i>Sarstedt, Nümbrecht</i>
Reaktionsgefäße (50 ml)	<i>Greiner Bio-one, Kremsmünster, A</i>
Spritzen (20 ml)	<i>Braun, Melsungen</i>
Zellkulturflaschen (250, 500 ml)	<i>Nunc, DK</i>
Zellkulturschalen (10 und 15 cm)	<i>TPP, Trasadingen, CH</i>
Zellkulturtestplatten	<i>TPP, Trasadingen, CH</i>
Zellschaber	<i>Corning Inc., Corning, USA</i>

2.1.4 Geräte

Blockthermostate	Kleinfeld Labortechnik, Gehrden
Blotkammern	H. Hölzel, Wörth
Eismaschine Frimont (MF 30)	<i>Scotsman, Mailand, I</i>
Feinwaagen (PG2002 / AB104)	<i>Mettler Toledo, Giessen</i>
Fotometer (Genesys 5)	Spectronic Inst., Rochester, USA
Inkubationsschränke (function line)	<i>Heraeus, Osterode</i>
Kreis-Schüttler Vortex-Genie-2	<i>Scientific Ind., Bohemia, USA</i>
Magnetrührer (RCT basic)	<i>IKA Labortechnik, Staufen</i>
Mikroskop Axiovert 25	<i>Zeiss, Jena</i>
Netzgeräte	<i>Dr. L. Fischer, Heidelberg</i>
pH-Meter (pH 526)	<i>Techn. Werkstätten, Weilheim</i>
Pipetten (2,5 / 20 / 200 / 1000 µl)	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Pipettierhilfe (Pipet Aid XP)	<i>Drummond, Broomall, USA</i>
Standzentrifuge (Megafuge 2.0 R)	<i>Heraeus, Osterode</i>
Sterilbänke (Hera safe)	<i>Heraeus, Osterode</i>
Stickstoffbehälter (Chronos Biosafe)	<i>Messer, Griesheim</i>
Tiefkühlgeräte	<i>Heraeus, Osterode</i>
	<i>Liebherr, Biberach a. d. Riss</i>
Tisch-Zentrifugen Biofuge pico / fresco	<i>Heraeus, Osterode</i>
Wasseraufbereitungsgerät	<i>Millipore, Billerica, USA</i>
Wasserbäder	<i>GFL, Burgwedel</i>
Wipp-Schüttler Rocky	LTF Labortechnik, Wasserburg

2.1.5 Verwendete Puffer und Lösungen

Die verwendeten Puffer und Lösungen wurden wie folgt hergestellt:

- Elektrophorese-Laufpuffer
250 mM TRIS; 2,5 M Glycin; 1 % SDS
- Gelatine-haltiger Puffer
50 mM TRIS (pH 7,4); 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,05 % Triton-X-100;
0,25 % Gelatine
- 5-fach-konzentrierte Laemmli-Lösung
125 mM TRIS (pH 8,8); 10 % Glycerin; 4 % SDS; 10 % β -
Mercaptoethanol; 0,02 % Bromphenolblau
- Lower TRIS
1,5 M TRIS (pH 6,8); 2 % SDS
- Ponceau S
0,2 % Ponceau S; 3 % Trichloressigsäure
- Transfer-Puffer
48 mM TRIS; 39 mM Glycin; 0,004 % SDS; 20 % Methanol
- Upper TRIS
0,5 M TRIS (pH 8,8); 2 % SDS
- Zell-Lysepuffer
50 mM HEPES (pH 7,5); 150 mM NaCl; 1,5 mM $MgCl_2$; 1 mM EGTA; 10
% Glycerin; 1 % Triton X-100; Protease-Phosphatase-Inhibitor-Mix aus
1 mM PMSF; 10 $\mu g/ml$ Aprotinin; 100 mM NaF; 10 mM $Na_4P_2O_7$; 1 mM
 Na_3VO_4

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die C2C12- und L6-Myoblasten wuchsen zunächst in DMEM Wachstumsmedium (4,5 g/l Glukose, 10 % Fötales Kälberserum (FCS), 2 mM Glutamin (Glut), 0,2 % Penicillin-Streptomycin (PenStrep) und 5 µg/ml Fungizone). Bei 80 %-iger Konfluenz wurden die Zellen in DMEM Differenzierungsmedium (4,5 g/l Glukose, 0,5 % FCS, 2 mM Glut, 0,2 % PenStrep und 5 µg/ml Fungizone) überführt und inkubiert. Dabei differenzierten die Myoblasten zu Myotuben. 24 h vor Versuchsbeginn wurden die Zellen in DMEM Hungermedium (1 g/l Glukose, 0,5 % FCS, 2 mM Glut, 0,2 % PenStrep und 5 µg/ml Fungizone) überführt.

Die 3T3L1-Adipozyten wuchsen zunächst in DMEM Wachstumsmedium (1 g/l Glukose, 10 % FCS, 2 mM Glut und 1 % PenStrep). Bei Erreichen nahezu vollständiger Konfluenz wurden die Zellen für 4 Tage mit DMEM/F12 Induktionsmedium (2 mM Glut, 1 % PenStrep, 1 µM Insulin, 17 µM D-Panθοthenat, 1 µM Biotin und 2 µg/ml Apotransferrin; frisch zugesetzt: 0,2 mM IBMX, 0,5 µM Corticosteron, 2 nM PDGF und 0,2 mM Ascorbat) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 4 Tage mit DMEM/F12 Differenzierungsmedium (2 mM Glut, 1 % PenStrep, 1 µM Insulin, 17 µM D-Panθοthenat, 1 µM Biotin und 2 µg/ml Apotransferrin; frisch zugesetzt: 0,2 mM Ascorbat) behandelt. 48 h vor Durchführung der Versuche wurden die Zellen in DMEM/F12 Hungermedium (2 mM Glut, 1 % PenStrep, 17 µM D-Panθοthenat, 1 µM Biotin und 2 µg/ml Apotransferrin; frisch zugesetzt: 0,2 mM Ascorbat) überführt.

Für die jeweiligen Versuche wurden die Zellen mit Endothelin-1 bei 37 °C stimuliert. Die Konzentrationen waren 0,1-10 µM und die Stimulationszeiten 1 min bis 24 h. Für die Inhibitorversuche wurden die Zellen für 30 min mit 50 µM JNK-Inhibitor SP600125, 1 µM p38-MAP-Kinase-Inhibitor SB203580, 20 µM MAP-Kinase/extracellular-signal-regulated-kinase (ERK) (MEK)-1-Inhibitor PD98059, 500 nM PKC-Inhibitor Bisindolylmaleimid I (BIS), 15 µM IκB-Kinase-β

(IKK- β)-Inhibitor 15dPGJ2, 10 μ M PI3-Kinase-Inhibitor LY294002 oder 25 nM mTOR-Inhibitor Rapamycin bei 37 $^{\circ}$ C vorinkubiert.

2.2.2 Gewinnung von Zelllysaten

Nach der Stimulation der Zellen wurden die Zellkulturschalen auf Eis gestellt und das Medium abgesaugt. Jede Schale wurde mit eiskühlem Phosphat-Natriumchlorid-Puffer (phosphate buffered saline; PBS) gewaschen und anschließend wurde jeweils Lysepuffer auf die Schalen gegeben.

Mit einem Plastischaber konnten so die Zellen abgelöst und dann in Reaktionsgefäße überführt werden. Durch mehrmaliges Ratschen der Reaktionsgefäße über einen Gefäßständer wurden die Zellen zusätzlich mechanisch aufgeschlossen und sofort für 5 min auf Eis gestellt.

Im nächsten Schritt wurden die Lysate für 5 min bei 4 $^{\circ}$ C mit 13 000 rpm zentrifugiert. Vom abgenommenen Überstand mit den zytosolischen Proteinen wurden je 10 μ l in separate Reaktionsgefäße zur Proteinbestimmung überführt und dann alle Reaktionsgefäße bei -80 $^{\circ}$ C eingefroren. Das jeweilige Pellet mit den enthaltenen Kernen und Membrantrümmern wurde verworfen.

2.2.3 Proteinbestimmung

Für die Proteinbestimmung nach Bradford [Bradford, M. M., 1976] wurde zunächst eine Eichkurve mit bovinem-Serum-Albumin (BSA, 100 μ g/ml in zweifach destilliertem Wasser H_2O_{dd}) mit Konzentrationen von 0,25 bis 1,0 μ g/ μ l erstellt und ein Leerwert ohne Protein gemessen. Zu den 10 μ l der Proben wurden jeweils 90 μ l H_2O_{dd} zugegeben und kurz gemischt. Anschließend wurde jede Probe zur Doppelbestimmung in 2 weitere Reaktionsgefäße überführt und diese mit verdünntem Bio-Rad versetzt und gemischt. Bei einer Emission von 595 nm wurden die Extinktionswerte der Farblösungen photometrisch bestimmt.

Anhand der Eichkurve konnten aus den Mittelwerten beider Proben die Proteinkonzentration des Überstandes ermittelt werden.

2.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Das Gel für die Elektrophorese wurde entsprechend der **Tabelle 1** hergestellt. Anschließend konnten die Proben, die zuvor mit 5-fach konzentriertem Laemmli-Puffer versetzt und 5 min bei 98 °C inkubiert wurden, vollständig gemäß der aus der Proteinbestimmung erhaltenen Tabelle in die Taschen pipettiert werden. In die äußeren Taschen der Gelkammer wurde ein Proteinmarker mit Laufgewichten von 31-200 kD zur Abschätzung des Molekulargewichts der Proben pipettiert und die restlichen freien Taschen mit 10 µl 0,5 %-iger BSA-Lösung befüllt, um den „Smiley-Effekt“ zu minimieren. Die Proben mit gleichen Proteinmengen (40 µl Gesamtprotein/Geltasche) wurden für 12-18 h bei 8-12 mA aufgetrennt.

Tabelle 1: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für die SDS-PAGE

Trenngel 7,5 %		Sammelgel 3,9 %	
Polyacrylamid (30 %)	10 ml	Polyacrylamid (30 %)	1,8 ml
H ₂ O	20 ml	H ₂ O	9,4 ml
Lower TRIS	10 ml	Upper TRIS	3,5 ml
TEMED	66 µl	TEMED	15 µl
APS (0,1 g/ml)	270 µl	APS (0,1 g/ml)	150 µl

2.2.5 Western-Blotting

Das Western-Blotting dient dem Nachweis und der Semiquantifizierung der zu untersuchenden Proteine, die in der Elektrophorese entsprechend ihrer jeweiligen Molekülgröße aufgetrennt wurden.

Nach erfolgter Gelelektrophorese wurde das Sammelgel vom Trenngel abgelöst und in Transfer-Puffer getränkt.

6 Filterpapiere und eine Nitrozellulosemembran wurden auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten und dann die Blotkammer wie folgt bestückt:

Benetzung der Metallflächen mit Transfer-Puffer, 3 Lagen mit Puffer getränkten Filterpapieren, Nitrozellulosemembran, Gel, 3 Lagen mit Puffer getränkten Filterpapieren. Um Luftblasen zu vermeiden wurden diese nach jeder neuen Lage mit einer 5 ml Pipette sorgfältig ausgestrichen. Zum Schluss wurde die Innenseite des Deckels der Blotkammer gut mit Puffer benetzt und anschließend erfolgte der Transfer bei 12 mA pro Gel für 3-4 h in der Kühlkammer bei 4 °C.

Nach dem Blottvorgang wurde die Membran kurz in Ponceau-S auf dem Schüttler gefärbt, so dass der Erfolg des Blottens überprüft werden konnte und die Markerproteine nach kurzem Waschen in Aqua bidest mit einem Kugelschreiber beschriftet werden konnten.

Anschließend wurde die Membran für 1 h in einem gelatinehaltigem Puffer auf dem Schüttler bei Zimmertemperatur gewaschen, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Der Puffer wurde dabei mindestens dreimal gewechselt.

Der Primärantikörper wurde im Anschluss über Nacht auf die Membran gegeben und diese bei 4 °C weiter geschüttelt.

Am nächsten Tag wurde die Membran erneut 3x10 min in dem gelatinehaltigen Puffer gewaschen und für 1-1,5 h mit dem meerrettich-peroxidase-konjugiertem Sekundär-Antikörper zur Detektion der gebundenen, spezifischen Primärantikörper inkubiert. Nach weiterem Waschen wurde die Membran für etwa 1 min in der enhanced-chemoluminescence (ECL)-Detektionslösung (frisch hergestellt aus gleichen Mengen von Lösung A und B) geschwenkt,

abgetropft, in Frischhaltefolie verpackt und in der Dunkelkammer auf einen Hyperfilm ECL gelegt. Hierbei wurde die ablaufende Reaktion zwischen der Meerrettich-Peroxidase und dem ECL durch die entstandene Lichtenergie detektiert. Die Expositionszeiten wurden je nach Strahlungsintensität zwischen 30 sek und 50 min gewählt.

Als letzter Schritt wurde der Röntgenfilm je 1 min in die Entwicklerlösung und den Fixierer gehalten, zwischendurch mit Wasser gespült und zum Trocknen aufgehängt.

2.2.6 Densitometrie und statistische Analyse

Die Signalintensität der Westernblot-Banden wurde unter Verwendung der EasyWin32 Herolab Software quantifiziert. Dazu wurden die Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten herangezogen und jeweils der Quotient aus den Werten der phospho-Serin-318/307-Antikörper-spezifischen Signale und den Werten der IRS-1-Antikörper-spezifischen Signale gebildet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels des Student-t-Tests.

3. Ergebnisse

3.1 Die Endothelin-1-abhängige Phosphorylierung von IRS-1 an Serin 318 und Serin 307

In C2C12-Myotuben kam es nach 30-minütiger Inkubation bereits bei der geringsten Konzentration von 0,1 μM Endothelin-1 zu einer starken Phosphorylierung von IRS-1 an Serin 318, welche bei weiterer Steigerung der Konzentration bis 10 μM lediglich noch leicht zunahm (**Abb. 4(A)**).

Abb. 4 (A)

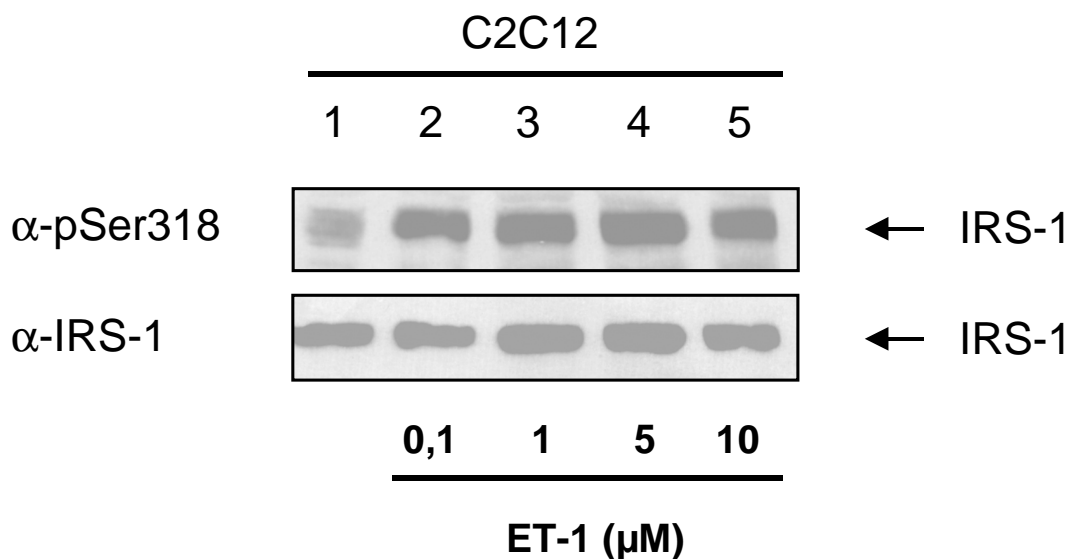


Abb. 4 (A): Konzentrationsreihe der ET-1-induzierten Phosphorylierung von IRS-1 an Serin 318. C2C12-Myotuben wurden für jeweils 30 min mit ET-1 mit steigenden Konzentrationen von 0,1-10 μM behandelt.

Gezeigt ist hier - wie auch in den nachfolgenden Abbildungen - ein repräsentativer Westernblot von mindestens 3 unabhängigen Versuchen.

Bei der Endothelin-1-induzierten Phosphorylierung von IRS-1 an Serin 307 zeigte sich ein starker Effekt schon mit der geringsten Konzentration, der ebenfalls mit einer Steigerung der Endothelin-1-Konzentration nicht weiter zunahm (**Abb. 4(B)**).

Abb. 4 (B)

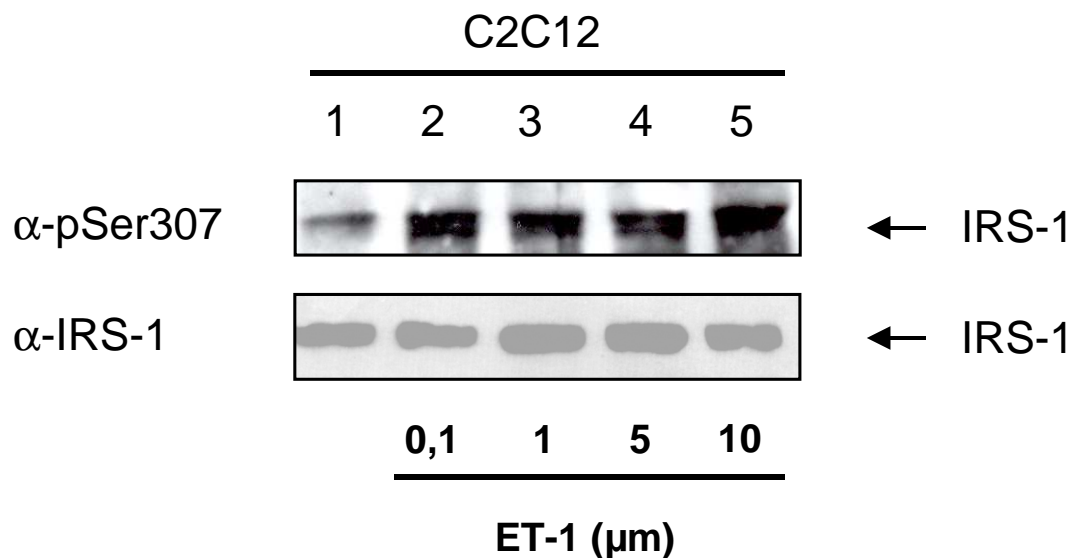


Abb. 4 (B): Konzentrationsreihe der ET-1-induzierten Phosphorylierung von IRS-1 an Serin 307. C2C12-Myotuben wurden für jeweils 30 min mit steigenden Konzentrationen von 0,1-10 μ M behandelt.

Im folgenden Versuch wurde eine Zeitreihe mit 0,1 μ M Endothelin-1 durchgeführt. Hier zeigte sich bereits nach 1 min eine starke IRS-1-Phosphorylierung an Serin 318. Während nach 30 Minuten ein Maximum erreicht wurde, nahm die Serin-318-Phosphorylierung nach 60- und 180-

minütiger Behandlung mit Endothelin-1 wieder ab (**Abb. 5(A)**). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde in den nachfolgenden Versuchen die Serin-318-Phosphorylierung nach 30-minütiger Inkubation mit Endothelin-1 in einer Konzentration von 0,1 μ M untersucht.

Abb. 5 (A)

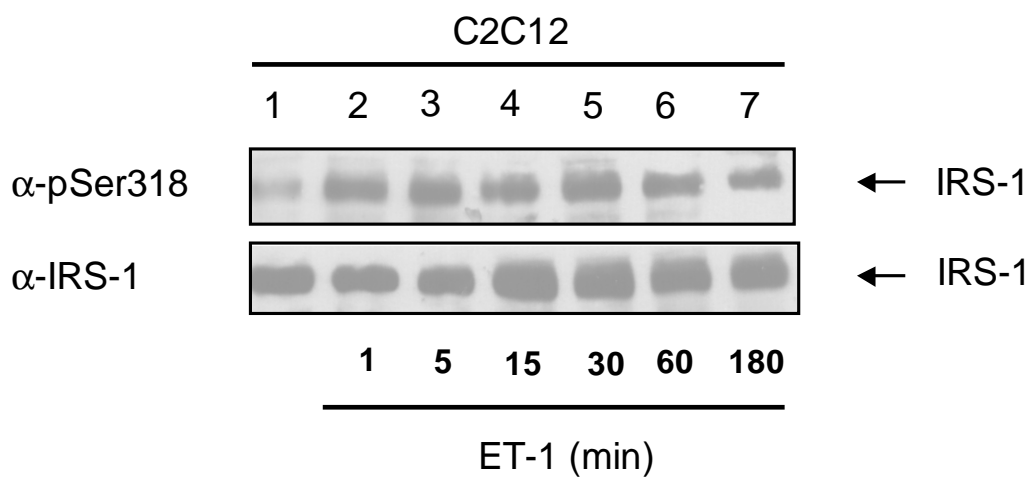


Abb. 5 (A): Zeitreihe der ET-1-induzierten Phosphorylierung von IRS-1 an Serin 318. C2C12-Myotuben wurden 0-180 min mit jeweils 0,1 μ M Endothelin-1 behandelt.

Die Endothelin-1-induzierte IRS-1-Phosphorylierung an Serin 307 zeigte erst nach 15 min einen deutlichen Anstieg. Auch bei dieser Phosphorylierung war eine deutliche Abnahme des Signals nach 60- und 180-minütiger Stimulation zu beobachten (**Abb. 5 (B)**).

Abb. 5 (B)

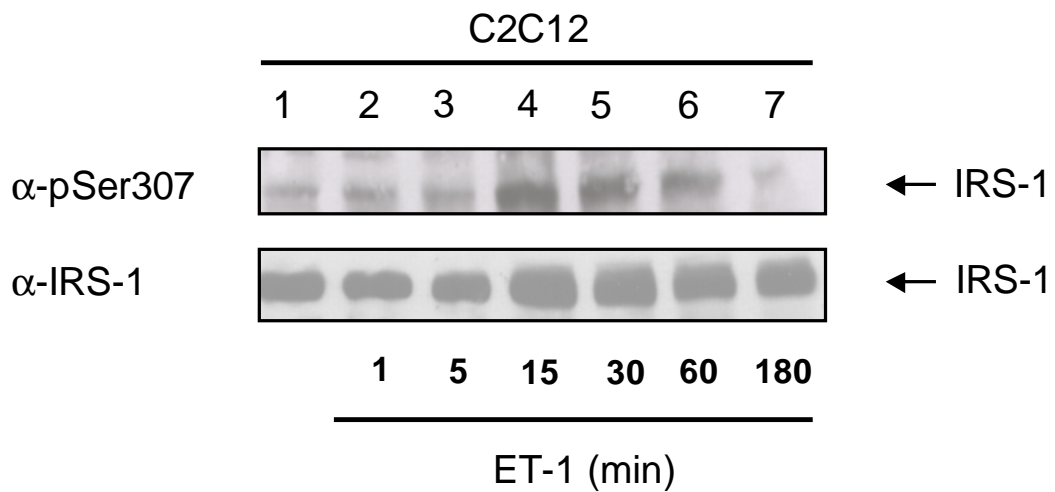


Abb. 5 (B): Zeitreihe ET-1-induzierter Phosphorylierung von IRS-1 an Serin 307. C2C12-Myotuben wurden 0-180 min mit jeweils 0,1 μ M Endothelin-1 behandelt.

An dieser Stelle galt es zu untersuchen, ob eine Verlängerung der Inkubationszeit zu einem weiteren Abfall der Phosphorylierung von IRS-1 an Serin 318 führen und ob sich dabei die Gesamtmenge an IRS-1-Protein verändern würde. Stimuliert wurde wieder mit 0,1 μ M Endothelin-1. Es ergab sich bei konstanter IRS-1-Gesamtproteinmenge eine Reduktion der Serin-318-Phosphorylierung bis 24 Stunden (**Abb. 6**).

Abb. 6

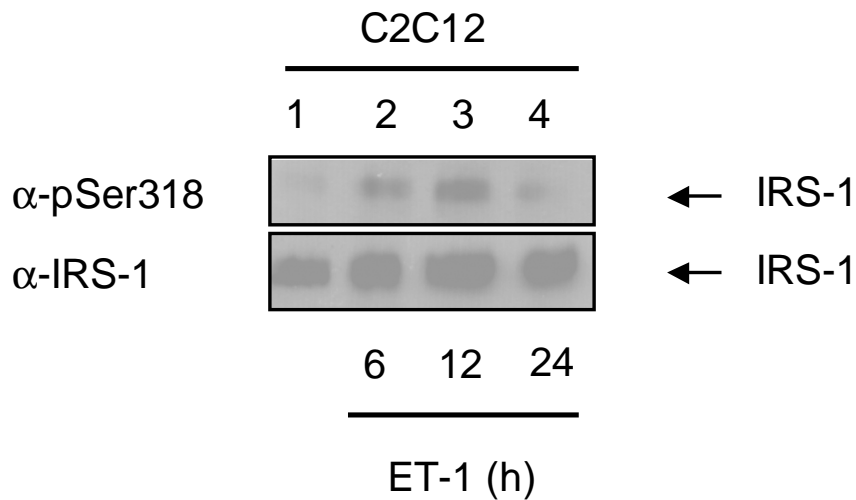


Abb. 6: Zweite Zeitreihe ET-1-induzierter Phosphorylierung von IRS-1 an Serin 318. C2C12-Myotuben wurden für 6-24 h mit jeweils 0,1 μ M Endothelin-1 behandelt.

3.2 Kinasen der Endothelin-1-induzierten Serin-318-Phosphorylierung an IRS-1

Für verschiedene Kinasen wie JNK [Aguirre, V. et al., 2000], IKK- β [Gao, Z. et al., 2002] oder mTOR [Ozes, O. N. et al., 2001] konnte gezeigt werden, dass sie an der IRS-1-Phosphorylierung beteiligt sein können.

Aus diesem Grund wurde als nächstes die Beteiligung dieser und anderer Kinasen an der Endothelin-1-induzierten Serin-318-Phosphorylierung untersucht, indem jeweils spezifische Inhibitoren der jeweiligen Kinasen eingesetzt wurden.

Die Endothelin-1-induzierte (0,1 μ M) Serin-318-Phosphorylierung in C2C12-Myotuben konnte durch Vorbehandlung mit dem mTOR-Inhibitor Rapamycin (25 nM) signifikant reduziert werden. Auch die Vorinkubation mit dem JNK-

Inhibitor SP600125 (50 μM) führte zu einer - jedoch nicht statistisch signifikanten (siehe unten) - Reduktion der Serin-318-Phosphorylierung. Durch Vorbehandlung mit dem PI3-Kinase-Inhibitor LY 294002 (10 μM) konnte eine noch stärkere, wiederum signifikante Abschwächung des Phosphorylierungssignals beobachtet werden.

Im Gegensatz dazu hatte die Vorinkubation mit dem p38-MAP-Kinase-Inhibitor SB203580 (1 μM), dem MEK-1-Inhibitor PD098059 (20 μM), dem PKC-Inhibitor Bisindolylmaleimid I (BIS; 500 nM) oder dem IKK- β -Inhibitor 15-Desoxy-Prostaglandin J2 (15dPGJ2; 15 μM) keinen Einfluss auf die Endothelin-1-induzierte Serin-318-Phosphorylierung (**Abb. 7**).

Diese Ergebnisse wiesen auf eine Beteiligung des PI3-Kinase/mTOR-Signalweges bei der Endothelin-1-induzierten Serin-318-Phosphorylierung hin, nicht jedoch der JNK, der p38-MAP-Kinase, der MEK-1, der PKC oder der IKK- β .

Abb. 7 (A)

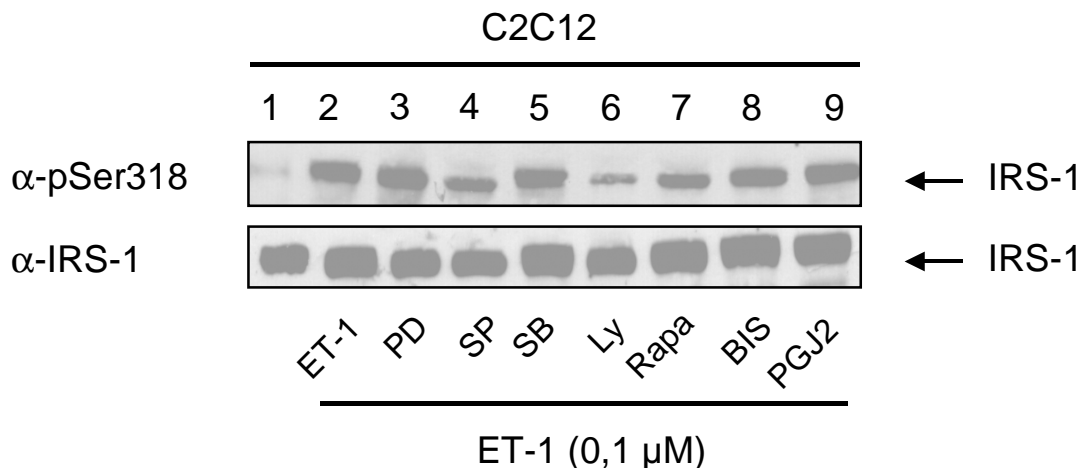


Abb. 7 (A): Untersuchung der Inhibitoren bei der ET-1-induzierten Phosphorylierung von IRS-1 an Serin 318. Vorinkubation der C2C12-Myotuben für jeweils 30 min mit den Inhibitoren MEK-Inhibitor PD098059 (PD; 20 μM),

JNK-Inhibitor SP600125 (SP; 50 μ M), p38 MAP-Kinase-Inhibitor SB203580 (SB; 1 μ M), PI3-Kinase-Inhibitor Ly294002 (Ly; 10 μ M), mTOR-Inhibitor Rapamycin (Rapa; 25 nM), PKC-Inhibitor Bisindolylmaleimid I (BIS; 500 nM) und Ikk- β -Inhibitor 15dPGJ2 (PGJ2; 15 μ M), anschließend Stimulation mit Endothelin-1 für 30 min mit einer Konzentration von 0,1 μ M.

Abb. 7 (B)

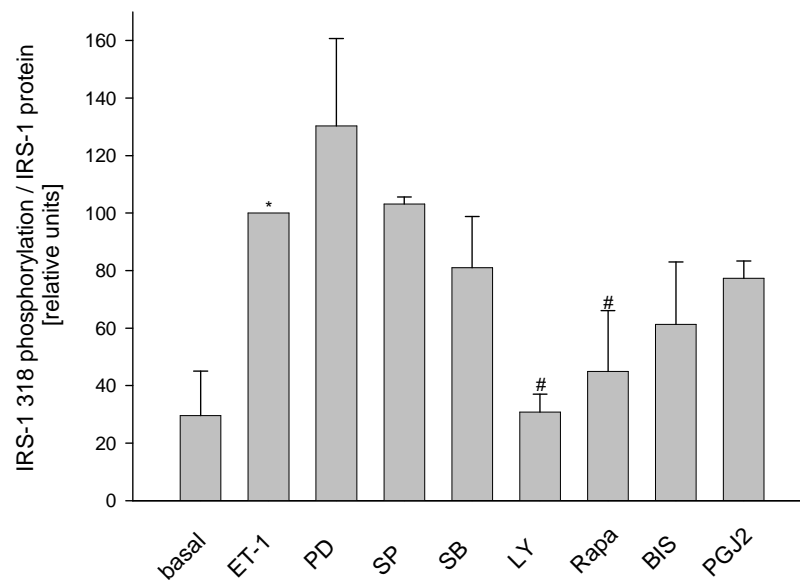


Abb. 7 (B): Die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung von mindestens 3 unabhängigen Experimenten ($n \geq 3$). Signifikante Unterschiede ($p < 0.05$, ungepaarter Student-t-Test) wurden markiert.

* basal vs. ET-1, # ET-1 vs. LY bzw. Rapa.

3.3 IRS-1-Phosphorylierung an Serin 318 infolge der Aktivierung des PI3-Kinase/mTOR-Signalweges

Um zu überprüfen, ob Endothelin-1 zu einer Aktivierung von PI3-Kinase und mTOR führt, wurde die Phosphorylierung ihrer Substrate p70S6K und Akt untersucht (**Abb. 8**).

Eine Phosphorylierung von Akt war bereits nach 1 min der Endothelin-1-Behandlung zu erkennen und nahm bis zum Zeitpunkt 30 min weiter zu. Nach 60 und 180 min nahm die Signalstärke wieder ab. Die Phosphorylierung von p70S6K ergab bereits nach 5 min ein Maximum und ähnlich wie die Akt-Phosphorylierung eine deutliche Reduktion des Signals nach 60 und 180 min.

Abb. 8

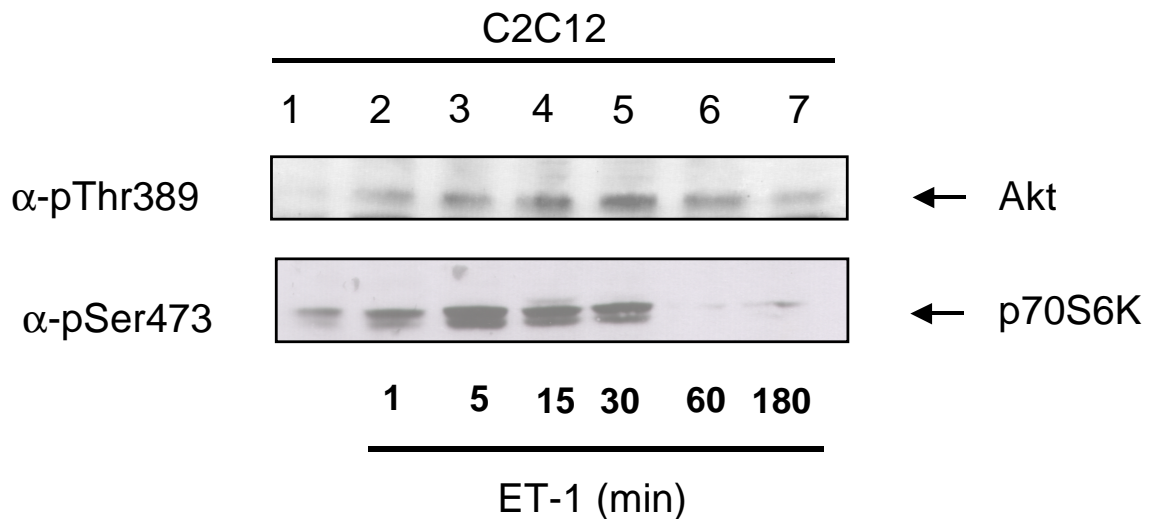


Abb. 8: Endothelin-1-induzierte Phosphorylierung von Akt und p70S6K. C2C12-Myotuben wurden mit Endothelin-1 (0,1 μM) für 0-180 min behandelt.

3.4 Hemmung (Inhibierung) der Insulin-induzierten Glukoseaufnahme durch Endothelin-1

Abschließend galt es zu untersuchen, ob die in den C2C12-Myotuben beobachtete Endothelin-1-abhängige Serinphosphorylierung an IRS-1 auch mit einer Beeinträchtigung der Glukoseaufnahme einherging.

Die Vorbehandlung mit Endothelin-1 - sowohl für 10 min als auch für 24 h - führte zu einer signifikanten Abnahme der Insulin-stimulierten Glukoseaufnahme in L6-Myotuben (**Tabelle 2**).

Tabelle 2: Die Behandlung mit Endothelin-1 führte zu einer Abnahme der Insulin-stimulierten Glukoseaufnahme ($n \geq 3$).

$P < 0,05$; * basal vs. Insulin; # Insulin vs. Endothelin-1 + Insulin.

Glukoseaufnahme [dpm/Platte]	
Basal	7409±783
Insulin	9526±1251 *
ET-1 15 min	6938±592
ET-1 15 min + Insulin	8525±762 #
ET-1 24 h	6937±707
ET-1 24 h + Insulin	8641±831 #

Die Glukoseaufnahme wurde in mit Glut4-stabil-transfizierten L6-Zellen gemessen, da C2C12-Myotuben nicht über eine ausreichend hohe endogene Glut4-Expression verfügen.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen in den C2C12-Zellen, führte auch in den L6-Zellen die Endothelin-1-Stimulation zu einer deutlichen IRS-1-Serinphosphorylierung, wie am Beispiel von Serin 318 gezeigt (**Abb. 9**).

Abb. 9

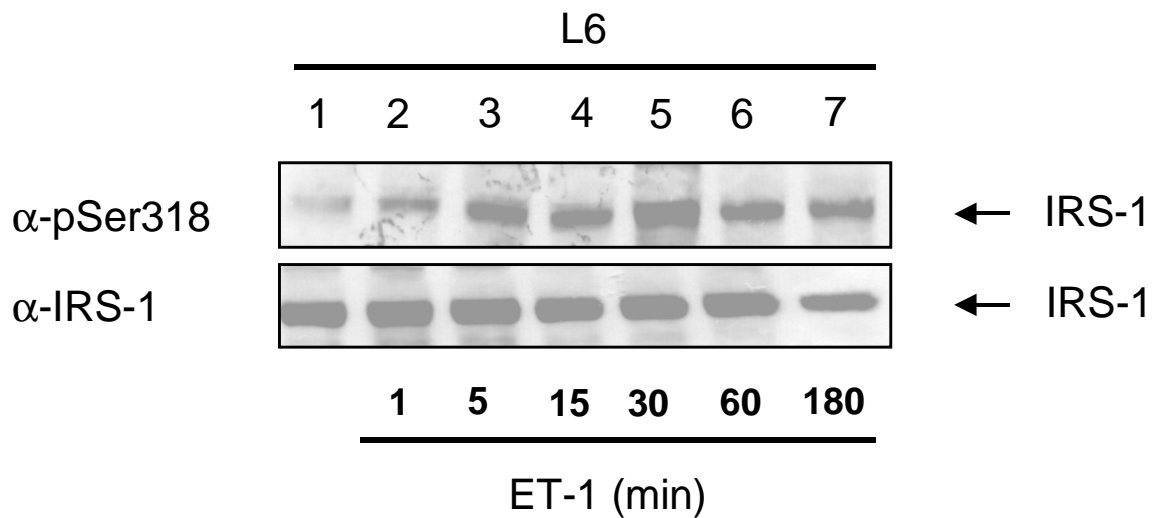


Abb. 9: Endothelin-1-induzierte Phosphorylierung von IRS-1 an Serin 318 in L6-Myotuben. Diese wurden 0-180 min mit jeweils 0,1 μ M Endothelin-1 behandelt.

3.5 Endothelin-1-abhängige Phosphorylierung von IRS-1 an Serin 318 in Adipozyten

Überdies wurde untersucht, ob die zuvor beschriebenen Effekte von Endothelin-1 auf die Phosphorylierung von IRS-1 an Serin 318 auch in Adipozyten gezeigt werden können, da diese ebenfalls ein wichtiges Gewebe für die Entwicklung der Insulinresistenz sind.

Die Experimente wurden mit 3T3L1-Adipozyten durchgeführt. Zunächst wurde wiederum eine Konzentrationsreihe für Endothelin-1 mit ansteigenden Konzentrationen von 0,1-10 μM erstellt (**Abb.10**). Die Zellen wurden jeweils 30 min behandelt. Auch in den 3T3L1-Adipozyten wurde schon mit der niedrigsten Konzentration von 0,1 μM ein deutlicher Anstieg der Serin-318-Phosphorylierung festgestellt, der durch weitere Konzentrationssteigerung nicht mehr gesteigert werden konnte analog zu dem Ergebnis in C2C12-Myotuben.

Abb. 10

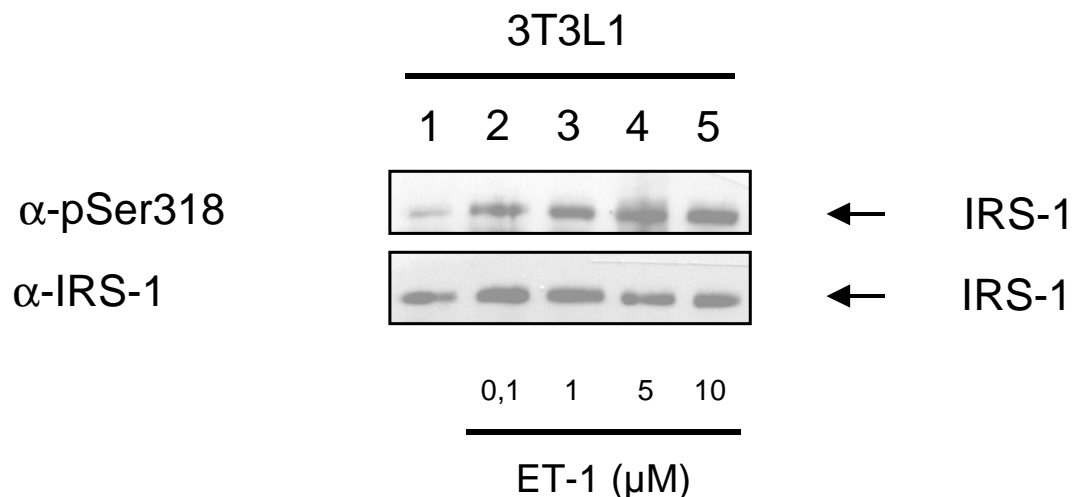


Abb. 10: Endothelin-1-induzierte Phosphorylierung von IRS-1 an Serin 318 in 3T3L1-Adipozyten. Die Zellen wurden für jeweils 30 min mit steigenden Konzentrationen von 0,1-10 μM behandelt.

Anschließend wurde eine Zeitreihe von 0-180 min für die Behandlung der 3T3L1-Adipozyten mit 0,1 μM Endothelin-1 erstellt.

Hier konnte ebenfalls schon nach 1 min ein deutlicher Anstieg der Serin-318-Phosphorylierung beobachtet werden, welcher bis 30 min noch leicht zunahm und danach wieder rückläufig war (**Abb. 11**).

Abb. 11

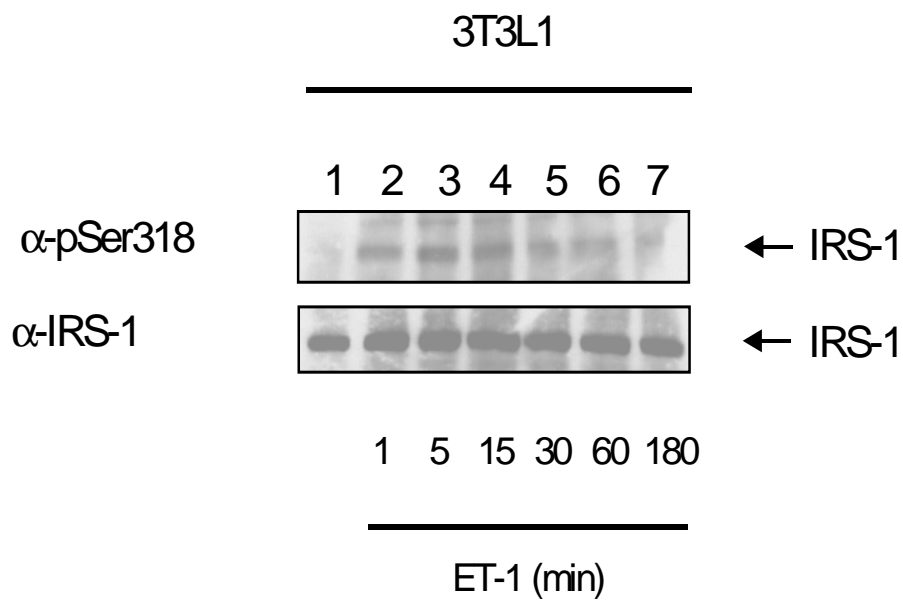


Abb. 11: Endothelin-1-induzierte Phosphorylierung von IRS-1 an Serin 318 in 3T3L1-Adipozyten. Die Zellen wurden 0-180 min mit jeweils 0,1 μ M Endothelin-1 behandelt.

4. Diskussion

Im Zell- und im Tiermodell, sowie auch beim Menschen [Ottosson-Seeberger, A. et al., 1997], konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit Endothelin-1 zu einer verminderten Insulin-induzierten Glukoseaufnahme in Skelettmuskelzellen infolge einer Beeinträchtigung der Insulinsignalkaskade führt. Insbesondere wurde auch eine Endothelin-1-induzierte Serin-Phosphorylierung an IRS-1 beobachtet [Ishibashi, K. I. et al., 2001; Wilkes, J. J. et al., 2003; Egawa, K. et al., 2000]. Für eine Serinstelle, Serin 612, wurde bereits gezeigt, dass sie Endothelin-1-abhängig phosphoryliert wird. In der vorliegenden Arbeit galt es zu untersuchen, ob andere Serinstellen, wie Serin 307 und Serin 318, die bei der Entstehung der Insulinresistenz eine wichtige Rolle spielen [Aguirre, V. et al., 2002; Moeschel, K. et al., 2004], auch nach Endothelin-1-Behandlung phosphoryliert werden. Zudem sollten die an diesen Phosphorylierungen beteiligten Kinasen identifiziert werden.

In den hierzu durchgeführten Experimenten gelang es nachzuweisen, dass die Stimulation mit Endothelin-1 in C2C12-Myotuben zu einer deutlichen IRS-1-Phosphorylierung an Serin 307 und Serin 318 führt. Auch in 3T3L1-Adipozyten konnte diese konzentrations- und zeitabhängige Steigerung der Serin 307- und Serin 318- Phosphorylierung nach Stimulation mit Endothelin-1 gezeigt werden. Als an der Endothelin-1-induzierten Serin 318-Phosphorylierung von IRS-1 beteiligte Kinasen konnte der PI3-Kinase/mTOR-Signalweg identifiziert werden. Außerdem wurde in dieser Untersuchung bestätigt, dass auch in dem gewählten Zellmodell (mit Glut4 stabil-transfizierten L6-Zellen) Endothelin-1 zu einer signifikanten Reduktion der Insulin-abhängigen Glukoseaufnahme führte. Neben Serin 318 werden weitere Serinstellen von IRS-1 infolge der Aktivierung des PI3-Kinase/mTOR/p70S6-Kinase-Signalwegs phosphoryliert, unter anderem Serin 302 [Werner, E. D. et al., 2004; Harrington, L. S. et al., 2004], Serin 307 [Carlson, C. J. et al., 2004], Serin 632 [Gual, P. et al., 2003] und Serin 636 [Ozes, O. N. et al., 2001].

Die p70S6-Kinase ist eine durch mTOR regulierte Serin-/Threoninkinase, die infolge der Insulin-induzierten Aktivierung des PI3-Kinase-Signalweges aktiviert

wird und an der Steuerung des Insulin-abhängigen Glukosetransports beteiligt ist [Trembley, F. et al., 2001; Hay, N. et al., 2004]. Darüber hinaus spielt sie aber auch bei der negativen Regulation des Insulinsignalweges eine Rolle. Infolge der Serinphosphorylierung wird die Weiterleitung des intrazellulären Insulinsignals zum einen durch Hemmung der Tyrosinphosphorylierung von IRS-1 [Hotamisligil, G. S. et al., 1996] und zum anderen durch eine IRS-1 Degradation durch Proteasomen beeinträchtigt [Egawa, K. et al., 2000].

Die Bedeutung der p70S6-Kinase für die Regulation der Insulinsensitivität konnte auch in Knockout-Tiermodellen gezeigt werden. Während bei den Kontrolltieren, die über das p70S6-Kinase-Protein verfügten, eine fettreiche Diät zu einer Steigerung der Phosphorylierung von Serin 307 und Serin 636/639 im Fettgewebe und in der Folge zu einer Abnahme der Insulinsensitivität führte, blieb dies bei den p70S6-Kinase-Knockout-Tieren aus. Das Fehlen der p70S6-Kinase in Mäusen wirkte somit protektiv gegen alters- und ernährungsbedingte Adipositas und steigerte die Insulinsensitivität [Um, S. H. et al., 2004].

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Serinstellen 307 und 318 an IRS-1 können neben Endothelin-1 durch eine Vielzahl von Stimuli phosphoryliert werden. Freie Fettsäuren [Müssig, K. et al., 2005], TNF- α [Müssig, K. et al., 2005], IGF-1 [Weigert, C. et al., 2005], TPA [Weigert, C. et al., 2005], IL-6 [Weigert, C. et al., 2006], Leptin [Hennige, A. et al., 2006] oder eine chronische Insulinbehandlung [Moeschel, K. et al., 2004] führen zu einer Phosphorylierung von IRS-1 an Serin 318.

Serin 307 wird durch TNF- α [Aguirre, V. et al., 2000], TPA [Müssig, K. et al., 2005], IGF-1, Insulin [Rui, L. et al., 2001], Advanced-glycation-end-products (AGEs) [Yoshida, T. et al., 2008], fettreiche Ernährung [Morino, K. et al., 2008], freie Fettsäuren [Gao, Z. et al., 2004], C-reaktives Protein (CRP) [D'Alessandris, C. et al., 2007], IL-6 [Weigert, C. et al., 2006], Arachnoidonsäure [Talukdar, I. et al., 2005], Anisomycin [Hiratani, K. et al., 2005], Glukosamine [Andreozzi, F. et al., 2004] und Glutamat [Garcia-Galloway, E. et al., 2003] phosphoryliert. Auch kommt es im Rahmen einer Verbrennung oder einer arteriellen Hypertonie zu einer Serin-307-Phosphorylierung [Zhang, Q. et al., 2005; Sugita, M. et al., 2004].

Die in den C2C12-Myotuben erzielten Ergebnisse der Endothelin-1-induzierten Serin-318-Phosphorylierung konnten wie oben beschrieben auch in dem Modell mit 3T3L1-Adipozyten gezeigt werden. Diese Resultate stimmen mit denen aus vorherigen Arbeiten überein, die bereits eine Endothelin-1-abhängige Serinphosphorylierung an IRS-1 in Adipozyten zeigen konnten [Ishibashi, K. I. et al., 2001].

Um die Bedeutung der Serinphosphorylierungen bei der Entstehung der Insulinresistenz genauer verstehen zu können, ist es wichtig, Serinstellen nicht nur isoliert zu betrachten, sondern detaillierte Erkenntnisse über die Interaktion verschiedener Serinstellen und deren zeitliche Kinetik zu gewinnen [Fritsche, L. et al., 2008]. In unserer Arbeitsgruppe wurde kürzlich die Interaktion der Serinstellen 302, 307 und 318 im Detail untersucht [Weigert, C. et al., 2008]. Dabei zeigte sich für Serin 302, Serin 318 und Serin 789 sowohl ein positiver, als auch ein negativer Einfluss auf die Insulinsignalkaskade. Diese Entdeckung lässt annehmen, dass in Abhängigkeit der Dauer der Insulinstimulation verschiedene Kinasen die Phosphorylierungen derselben Serinstellen an IRS-1 vermitteln und dass diese Phosphorylierungen einen unterschiedlichen Einfluss auf die Weiterleitung des Insulinsignals nehmen können.

Für die drei genannten Serinstellen Serin 302, 307 und 318 konnten Ergebnisse aus unserer Arbeitsgruppe eine für jede dieser Stellen charakteristische Kinetik der Phosphorylierung zeigen und nachweisen, dass die Interaktion der verschiedenen Phosphorylierungsstellen für die Regulation der Insulinsignalkaskade weit bedeutender ist als die Phosphorylierung einer einzigen Serinstelle isoliert [Weigert, C. et al., 2008]. Es kommt nach Insulinstimulation zuerst zu einer Serin-302-Phosphorylierung, welche die frühe PKC- ζ -vermittelte Phosphorylierung an Serin 318 induziert. Der positive Einfluss dieser beiden Phosphorylierungen auf die Weiterleitung des Insulinsignals wird zudem über die Akt-induzierte Serin-473-Phosphorylierung erzeugt. Es kommt zu einer gesteigerten Aktivität der Akt-Kinase und einer Reduktion der inhibitorisch wirksamen GSK-3. Das Resultat ist eine Erhöhung der Glukoseaufnahme in die Zelle. Somit wirkt sich die Serinphosphorylierung der Stellen 302 und die frühe Phosphorylierung an Serin 318 im IRS-1-Protein

positiv auf die vor allem durch Tyrosinphosphorylierung induzierte Steigerung der Insulin-abhängigen Glukoseaufnahme in die Zelle aus. Die Beteiligung der PKC- ζ an der frühen Serin-318-Phosphorylierung unterstreicht die Bedeutung der atypischen Isoformen der PKC für die positive Regulation der Insulin-abhängigen Glukoseaufnahme [Sajan, M. P. et al., 2004]. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen findet sich eine verminderte Aktivität dieser atypischen Isoformen der PKC in Muskelzellen bei übergewichtigen Personen und Menschen mit Diabetes mellitus Typ 2 [Vollenweider, P. et al., 2002].

Hingegen konnte in Experimenten aus unserer Arbeitsgruppe mit transgenen Mäusen gezeigt werden, dass eine permanente und damit gesteigerte Expression der PKC- β im Skelettmuskel mitverantwortlich ist für die Entstehung einer Fettleber, von Insulinresistenz besonders im Gehirn und einer Abnahme der körperlichen Aktivität [Hennige, A. M. et al., 2008]. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die atypischen PKC-Isoformen auch an der Abschwächung des Insulinsignals in Form eines negativen Feedback-Mechanismus beteiligt sind. Für eine weitere Serinstelle, Serin 357, konnte gezeigt werden, dass eine Phosphorylierung von IRS-1 an Serin 357 über die atypische Proteinkinase PKC- δ vermittelt wird und eine Abschwächung der Insulin-induzierten Phosphorylierung der Akt und damit des Insulinsignals zur Folge hat [Waraich, R. et al., 2008]. Die atypische Proteinkinase PKC- δ spielt zudem eine bedeutsame Rolle bei der durch freie Fettsäuren induzierten Apoptose von Betazellen des Pankreas [Eitel, K. et al., 2003]. Die Betazell-dysfunktion ist neben der Insulinresistenz ein wichtiger Mechanismus bei der Entwicklung des Diabetes mellitus Typ 2.

Im weiteren Verlauf der Insulinsignalkaskade kommt es zu einer Dephosphorylierung von Serin 302 durch Phosphatasen und einer späten Serin-318-Phosphorylierung, die nicht über die PKC- ζ , sondern über den mTOR/raptor-Signalweg vermittelt wird. Die folgende JNK-induzierte Phosphorylierung von Serin 307 ereignet sich unabhängig von den beiden erstgenannten Serinphosphorylierungen [Weigert, C. et al., 2008]. Es zeigt sich dabei jedoch keine relevante Beeinflussung der Glukoseaufnahme in Abhängigkeit der Serin-307- und der späten Serin-318-Phosphorylierung.

Diese Ergebnisse sind zunächst überraschend, da für beide Serinstellen eine Beteiligung an der Abschwächung des Insulinsignals in vorherigen Arbeiten gezeigt wurde [Hennige, A. M. et al., 2006]. Eine mögliche Erklärung für diese Entdeckung ist, dass in den meisten Veröffentlichungen über einen negativen Einfluss dieser Serinstellen zwar eine Stimulation mit Insulin stattgefunden hat, die Zellen jedoch mit anderen Aktivatoren für Serinphosphorylierungen, wie TNF- α [Aguirre, V. et al., 2000], Anisomycin [Aguirre, V. et al., 2002], Phorbol ester (TPA) [Moeschel, K. et al., 2004] oder freien Fettsäuren [Yu, C. et al., 2002], vorinkubiert wurden. Daher scheint eher die Phosphorylierung weiterer Serinstellen für den negativen Feedback-Mechanismus verantwortlich zu sein.

Aus diesen Erkenntnissen lässt sich der Schluss ziehen, dass die detaillierte Untersuchung weiterer Interaktionen der verschiedenen Serinphosphorylierungen, ihrer zeitlichen Kinetik, den jeweiligen Einfluss unterschiedlicher Stimuli auf die Wechselwirkungen und die zudem gewebeabhängige Signaltransduktion in zukünftigen Experimenten aufgeklärt werden muss. Nur so lassen sich die bisherigen Erkenntnisse zusammenhängend in ein Erklärungsmodell für positive und negative Regulationsmechanismen der Insulinsignalkaskade einfügen und neue pharmakologische Angriffspunkte zur Behandlung der Insulinresistenz etablieren.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass die Behandlung mit Endothelin-1 sowohl in C2C12-Myotuben, als auch in 3T3L1-Adipozyten zu einer Phosphorylierung von IRS-1 an Serin 307 und Serin 318 führt und dass der PI3-Kinase/mTOR-Signalweg dabei eine bedeutsame Rolle spielt. Die Stimulation mit Endothelin-1 bedingt in dem gewählten Zellmodell (mit Glut4 stabil-transfizierten L6-Myotuben) eine signifikant verminderte Insulin-abhängige Glukoseaufnahme in die Zelle. Die Untersuchung der an der Serin-307-Phosphorylierung von IRS-1 nach Stimulation mit Endothelin-1 beteiligten Kinasen bleibt weiteren Experimenten vorbehalten.

5. Zusammenfassung

Frühere Arbeiten belegen einen starken Zusammenhang zwischen gestörter Glukosetoleranz und einem erhöhten kardiovaskulären Risiko. Neben einer Reihe anderer Faktoren stellt Endothelin-1 ein mögliches Bindeglied dieser beiden Entitäten dar. Eine chronische Aktivierung des Endothelin-1-Systems kann zu einer gestörten Glukosetoleranz und zur Insulinresistenz führen. Endothelin-1-Plasmaspiegel sind bei Adipositas und bei arterieller Hypertonie erhöht und Endothelin-1 führt, wie im Zell- und Tiermodell gezeigt werden konnte, zu einer Beeinträchtigung der Insulinsignalkaskade, die unter anderem eine Serinphosphorylierung an IRS-1 mit einschließt.

Die genauen Serinstellen im Detail wurden bislang allerdings nicht identifiziert. Daher galt es in der vorliegenden Arbeit zu untersuchen, ob Serin 307 und Serin 318 Endothelin-1-abhängig phosphoryliert werden. Sowohl Serin 307, als auch Serin 318, sind an der Negativregulation der Insulinsignalkaskade beteiligt.

Da dem Skelettmuskel große Bedeutung in der Entstehung der peripheren Insulinresistenz zukommt, wurden C2C12-Myotuben als Zellmodell gewählt.

In C2C12-Zellen führte die Stimulation mit Endothelin-1 für 30 Minuten zu einer starken Phosphorylierung von IRS-1 sowohl an Serin 307, als auch an Serin 318 bereits bei einer Konzentration von 0,1 μM , die durch eine Steigerung der Konzentration nicht weiter erhöht werden konnte. Die daraufhin mit 0,1 μM Endothelin-1 durchgeführten Zeitreihen von 0-180 Minuten zeigten für Serin 307 nach 15 Minuten einen deutlichen Anstieg der Phosphorylierung und ein Maximum bei 30 Minuten. Bei Serin 318 war bereits nach 1 Minute ein deutlicher Anstieg der Phosphorylierung zu erkennen, der ebenfalls ein Maximum bei 30 Minuten zeigte. Nach 60 Minuten der Endothelin-1-Stimulation war eine Abschwächung der Phosphorylierung zu beobachten, die nach längerer Inkubation noch weiter abnahm.

Die Vorinkubation mit Inhibitoren der PI3-Kinase LY294002 (10 μ M) und von mTOR Rapamycin (25 nM) führten zu einer signifikanten Reduktion der Insulin-induzierten IRS-1-Phosphorylierung an Serin 318.

In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen führte die Stimulation mit Endothelin-1 zu einer verstärkten Phosphorylierung der PI3-Kinase- und mTOR-Substrate Akt und p70S6-Kinase. Unsere Ergebnisse bestätigen somit, dass die PI3-Kinase und mTOR im Zellsystem mit C2C12-Myotuben durch Stimulation mit Endothelin-1 aktiviert werden und legen eine wichtige Rolle des PI3-Kinase/mTOR-Signalweges in der Endothelin-1-induzierten Serin-307- und Serin-318-Phosphorylierung nahe. Durch Vorbehandlung mit Endothelin-1 wurde die durch Insulin induzierte Glukoseaufnahme in L6-Myotuben signifikant reduziert.

Abschließend konnte gezeigt werden, dass Endothelin-1 auch zu einer Phosphorylierung an Serin 318 in Adipozyten, einem weiteren für die Entstehung der peripheren Insulinresistenz wichtigen Gewebe, führte. Die Untersuchung der an der Endothelin-1-vermittelten Serin-307-Phosphorylierung von IRS-1 beteiligten Kinasen sowie die weitere Aufklärung der Interaktion der einzelnen Serinphosphorylierungen und deren Einfluss auf die Insulinsignalkaskade bleibt weiteren Experimenten vorbehalten. Ziel solcher Versuche sollte dabei immer die Aufdeckung möglicher pharmakologischer Angriffspunkte zur Verbesserung der Insulinsensitivität sein.

6. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

A	Ampere (SI-Einheit der elektrischen Stromstärke)
Abb	Abbildung
ANP	antinatriuretisches Peptid
APS	Ammoniumpersulfat (Ammoniumperoxodisulfat)
ATP	Adenosintriphosphat
BIS	Bisindolylmaleimid I
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: bovine serum albumin)
°C	Grad Celsius (Einheit für Temperatur)
PKC	Proteinkinasen C
D	Dalton (Einheit für Größen von Proteinen; 1 D = 1 g/mol)
DMEM	engl.: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dpm	decays per minute
ECL	Enhanced-chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
ET-1	Endothelin-1
F	femto- (10^{-15})
FCS	Fötale Kälberserum (engl.: foetal calf serum)
g	Gramm (SI-Gewichtseinheit)
GDP	Guanosindiphosphat
Glut	Glutamin
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde/Stunden (Einheit für Zeit)

HEPES	engl.: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethanesulfonic acid
H ₂ O _d	destilliertes Wasser
H ₂ O _{dd}	zweifach destilliertes Wasser
IBMX	3-Isobutyl-1-methyl-Xanthin
IR	Insulinrezeptor
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
k	kilo- (1000)
l	Liter (Einheit für Volumen)
m	Meter (SI-Längeneinheit)
M	Molar (SI-Einheit für Stoffmengenkonzentration), 1 M = 1 mol/l
m	milli- (10 ⁻³)
μ	mikro- (10 ⁻⁶)
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEK	MAP-Kinase/ERK
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MMPs	Matrixmetalloproteinasen
mol	Mol (SI-Substanzmengeneinheit)
mTOR	mammalian target of rapamycin
n	nano- (10 ⁻⁹)
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
Na ₄ P ₂ O ₇	Natriumpyrophosphat
Na ₃ VO ₄	Natriumorthovanadat
NO	Stickstoffmonoxid

P	pico- (10^{-12})
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAI-1	engl.: plasminogen activator inhibitor-1
PBS	Phosphat-Natriumchlorid-Puffer (engl.: phosphate-buffered saline)
PDGF	engl.: plateled derived growth factor
PDK	Phospholipid-abhängige Kinase (engl.: phospholipid-dependent kinase)
PenStrep	Penicillin-Streptomycin
15dPGJ2	15-Desoxy-Prostaglandin J2
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: revolutions per minute)
s	Sekunde/Sekunden (SI-Einheit für Zeit)
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: sodium dodecyl sulfate)
Ser	Serin
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (engl.: standard error of the mean)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin
TGS-Puffer	Puffer aus TRIS, Glycin und SDS
tPA	thrombogener gewebespezifischer Plasminogenaktivator
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetat
TRIS	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
V	Volt (Einheit für elektrische Spannung)
vWF	von Willebrand Faktor

7. Abbildungen und Tabellen

7.1 Abbildungen

Abb. 1 :

Regulation des Endothelin-1-Systems (modifiziert nach Marasciulo, L. et al., 2006).

Abb. 2:

Ausschnitt aus der Insulinsignalkaskade (entnommen aus Fiedler, H., 2007).

Abb. 3:

Posttranslationale Modifikation der IRS-Proteine und Interaktion der einzelnen Signalwege (modifiziert nach Fritsche, L. et al., 2008)

Abb. 4:

(A): Konzentrationsreihe der Endothelin-1-induzierten Phosphorylierung von IRS-1 an Serin 318 in C2C12-Myotuben.

(B): Konzentrationsreihe der Endothelin-1-induzierten Phosphorylierung von IRS-1 an Serin 307 in C2C12-Myotuben.

Abb. 5:

(A): Zeitreihe Endothelin-1-induzierter Phosphorylierung von IRS-1 an Serin 318 in C2C12-Myotuben.

(B): Zeitreihe Endothelin-1-induzierter Phosphorylierung von IRS-1 an Serin 307 in C2C12-Myotuben.

Abb. 6:

Zweite Zeitreihe Endothelin-1-induzierter Phosphorylierung von IRS-1 an Serin 318 in C2C12-Myotuben.

Abb. 7:

PI3K und mTOR sind an der Endothelin-1-induzierten Serin-318-Phosphorylierung in beteiligt.

Abb. 8:

Endothelin-1-induzierte Phosphorylierung von Akt und p70S6K in C2C12-Myotuben.

Abb. 9:

Zeitreihe Endothelin-1-induzierter Phosphorylierung von IRS-1 an Serin 318 in L6-Myotuben.

L6-Myotuben wurden 0-180 min mit jeweils 0,1 μ M Endothelin-1 behandelt.

Abb. 10:

Konzentrationsreihe der Endothelin-1-induzierten Phosphorylierung von IRS-1 an Serin 318 in 3T3L1-Adipozyten.

Abb. 11:

Zeitreihe Endothelin-1-induzierter Phosphorylierung von IRS-1 an Serin 318 in 3T3L1-Adipozyten.

7.2 Tabellen

Tabelle 1:

Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für die SDS-PAGE.

Tabelle 2:

Die Behandlung mit Endothelin-1 führte zu einer Abnahme der Insulin-stimulierten Glukoseaufnahme ($n \geq 3$).

8. Literaturverzeichnis

Aguirre, V.; Uchida, T.; Yenush, L.; Davis R.; White, M. F., The c-jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *J. Biol. Chem.* 275: 9047-9054 (2000)

Aguirre, V.; Werner, E. D.; Giraud, J.; Lee, Y. H.; Shoelson, S. E.; White, M. F., Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *J. Biol. Chem.* 277(2): 1531-1537 (2002)

Alessi, D. R.; James, S. R.; Downes, C. P.; Holmes, A. B.; Gaffney, P. R.; Reese, C. B.; Cohen, P., Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr. Biol.* 7(4): 261-269 (1997)

Andreozzi, F.; D'Alessandris, C.; Federici, M.; Laratta, E.; Del Guerra, S.; Del Prato, S.; Marchetti, P.; Lauro, R.; Perticone, F.; Sesti, G., Activation of the hexosamine pathway leads to phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on Ser307 and Ser612 and impairs the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin insulin biosynthetic pathway in RIN pancreatic beta-cells. *Endocrinology* 145(6): 2845-2857 (2004)

Bazzano, L. A.; Serdula, M.; Liu, S., Prevention of type 2 diabetes by diet and lifestyle modification. *J. Am. Coll. Nutr.* 24(5): 310-319 (2005)

Beck, A.; Moeschel, K.; Deeg, M.; Häring, H.-U., Voelter, W.; Schleicher, E. D.; Lehmann, R., Identification of an in vitro insulin receptor substrate-1 phosphorylation site by negative-ion μ LC/ES-API-CID-MS hybrid scan technique. *J. Am. Mass Spectrom.* 14: 401-405 (2003)

Bennett, B. L.; Satoh, Y.; Lewis, A. J., JNK: a new therapeutic target for diabetes. *J. Curr. Opin. Pharm.* 3: 420-425 (2003)

Björnholm, M.; Kawano, Y.; Lehtihet, M.; Zierath, J. R., Insulin receptor substrate-1 phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase activity in skeletal muscle from NIDDM subjects after in vivo insulin stimulation. *Diabetes* 46(3): 524-527 (1997)

Bossenmaier, B.; Strack, V.; Stoyanov, B.; Krützfeldt, J.; Beck, A.; Lehmann, R.; Kellerer, M.; Klein, H.; Ullrich, A.; Lammers, R.; Häring, H.-U., Serine Residues 1177/78/82 of the Insulin Receptor Are Required for Substrate Phosphorylation but not Autophosphorylation. *Diabetes* 49: 889-895 (2000)

Boyle, P. J., Diabetes mellitus and macrovascular disease: mechanisms and mediators. *Am. J. Med.* 120: 12-17 (2007)

Bradford, M. M., 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 (1976)

Carlson, C. J.; White, M. F.; Rondinone, C. M., Mammalian target of rapamycin regulates IRS-1 serine 307 phosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 316(2): 533-539 (2004)

Cohen, P.; Alessi, D. R.; Cross, D. A., PDK1, one of the missing links in insulin signal transduction? *FEBS Lett.* 410(1): 3-10 (1997)

Cusi, K.; Maezono, K.; Osman, A.; Pendergrass, M.; Patti, M. E.; Pratipanawatr, T.; DeFronzo, R. A.; Kahn, C. R.; Mandarino, L. J., Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *J. Clin. Invest.* 105(3): 311-320 (2000)

Cyr, C.; Kris, R. M., Desensitization of human endothelin A receptor. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 8: 11-14 (1993)

D'Alessandris, C.; Lauro, R.; Presta, I.; Sesti, G., C-reactive protein induces phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on Ser 307 and Ser 612 in L6 myocytes, thereby impairing the insulin signalling pathway that promotes glucose transport. *Diabetologia* 50(4): 840-849 (2007)

De Alvaro, C.; Teruel, T.; Hernandez, R.; Lorenzo, M., Tumor necrosis factor alpha produces insulin resistance in skeletal muscle by activation of inhibitor kappaB kinase in a p38 MAPK-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 279: 17070-17078 (2004)

De Fea, K.; Roth, R. A., Modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation and function by mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 272: 31400-31406 (1997)

De Fronzo, R. A.; Ferrannini, E., Regulation of intermediary metabolism during fasting and feeding. *Endocrinology* 737-755 (2001)

Egawa, K.; Nakashima, N.; Sharma, P. M.; Maegawa, H.; Nagai, Y.; Kashiwagi, A.; Kikkawa, R.; Olefsky, J. M., Persistent activation of phosphatidylinositol 3-kinase causes insulin resistance due to accelerated insulin-induced insulin receptor substrate-1 degradation in 3T3L1 adipocytes. *Endocrinology* 141: 1930-1935 (2000)

Egawa, K.; Maegawa, H.; Shimizu, S.; Morino, K.; Nishio, Y.; Bryer-Ash, M.; Cheung, A. T.; Kolls, J. K.; Kikkawa, R.; Kashiwagi, A., Protein-tyrosine

phosphatase-1B negatively regulates insulin signaling in I6 myocytes and Fao hepatoma cells. *J. Biol. Chem.* 276: 10207-10211 (2001)

Eitel, K.; Staiger, H.; Rieger, J.; Mischak, H.; Brandhorst, H.; Brendel, M. D.; Bretzel, R. G.; Häring, H.-U.; Kellerer, M., Protein Kinase C δ Activation and Translocation to the Nucleus Are Required for Fatty Acid-Induced Apoptosis of Insulin-Secreting Cells. *FASEB J.* 20: 1206-1208 (2003)

Ferri, C.; Carlomagno, A.; Coassin, S.; Baldoncini, R.; Cassone Faldetta, M. R.; Laurenti, O.; Properzi, G.; Santucci, A.; De Mattia, G., Circulating endothelin-1 levels increase during euglycemic hyperinsulinemic clamp in lean NIDDM men. *Diabetes Care* 18(2): 226-233 (1995)

Fiedler, H., Untersuchungen zur Regulation der Phosphorylierung des Insulin-Rezeptor-Substrates-1 an Serin 318. (2007)

Fritsche, L.; Weigert, C.; Häring, H.-U.; Lehmann, R., How Insulin Receptor Substrate Proteins Regulate the Metabolic Capacity of the Liver – Implications for Health and Disease. *Curr. Med. Chem.* 15: 1316-1329 (2008)

Gao, Z.; Hwang, D.; Bataille, F.; Lefevre, M.; York, D.; Quon, M. J.; Ye, J., Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor kappa B kinase complex. *J. Biol. Chem.* 277(5): 48115-48121 (2002)

Gao, Z.; Zuberi, A.; Quon, M. J.; Dong, Z.; Ye, J., Aspirin inhibits serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 in tumor necrosis factor-treated cells through targeting multiple serine kinases. *J. Biol. Chem.* 278: 24944-24950 (2003)

Gao, Z.; Zhang, X.; Zuberi, A.; Hwang, D.; Quon, M. J.; Lefevre, M.; Ye, J., Inhibition of insulin sensitivity by free fatty acids requires activation of multiple serine kinases in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Endocrinol.* 18(8): 2024-2034 (2004)

Garcia-Galloway, E.; Arango, C.; Pons, S.; Torres-Aleman, I., Glutamate excitotoxicity attenuates insulin-like growth factor-I prosurvival signaling. *Mol. Cell. Neurosci.* 24(4): 1027-1037 (2003)

Giraud, J.; Haas, M.; Feener, E. P.; Copps, K. D.; Dong, X.; Dunn, S. L.; White, M. F., Phosphorylation of Irs1 at SER-522 inhibits insulin signaling. *Mol. Endocrinol.* 21: 2294-2302 (2007)

Giraud, J.; Leshan, R.; Lee, Y. H.; White, M. F., Nutrient-dependent and insulin-stimulated phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on serine 302 correlates with increased insulin signaling. *J. Biol. Chem.* 279: 3447-3454 (2004)

Gogg, S.; Smith, U.; Jansson, P. A., Increased MAPK activation and impaired insulin signaling in subcutaneous microvascular endothelial cells in type 2 diabetes: the role of endothelin-1. *Diabetes* 58(10): 2238-2245 (2009)

Gual, P.; Gremeaux, T.; Gonzalez, T.; Marchand-Brustel, Y.; Tanti, J. F., MAP kinases and mTOR mediate insulin-induced phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on serine residues 307, 612 and 632. *Diabetologia* 46(11): 1532-1542 (2003)

Gual, P.; Marchand-Brustel, Y.; Tanti, J. F., Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie* 87(1): 99-109 (2005)

Häring, H.-U., The insulin receptor: signalling mechanism and contribution to the pathogenesis of insulin resistance. *Diabetologia* 34(12): 848-861 (1991)

Häring, H.-U.; Kellerer, M.; Mosthaf, L., Modulation of insulin receptor signalling: significance of altered receptor isoform patterns and mechanism of hyperglycaemia-induced receptor modulation. *Diabetologia* 37(2): 149-154 (1994)

Häring, H.-U.; Kirsch, D.; Obermaier, B.; Ermel, R.; Machicao, F., Tumor-promoting phorbol esters increase the Km of the ATP-binding site of the insulin receptor kinase from rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* 261: 3869-3875 (1986)

Häring, H.-U.; White, M. F.; Kahn, C. R.; Ahmad, Z.; De Paoli-Roach, A. A.; Roach, P. J. Interaction of the insulin receptor kinase with serine/threonine kinases in vitro. *J. Cell. Biochem.* 28(2): 171-182 (1985)

Haffner, S. M., Epidemiology of insulin resistance and its relation to coronary artery disease. *Am. J. Cardiol.* 84(1A): 11-14 (1999)

Haffner, S. M.; Morales, P. A.; Stern, M. P.; Gruber, M. K., Lp(a) concentrations in NIDDM. *Diabetes* 41(10): 1267-1272 (1992)

Harrington, L. S.; Findlay, G. M.; Gray, A.; Tolkacheva, T.; Wigfield, S.; Rebholz, H.; Barnett, J.; Leslie, N. R.; Cheng, S.; Shepherd, P. R.; Gout, I.; Downes, C. P.; Lamb, R. F., The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins. *J. Cell. Biol.* 166(2): 213-223 (2004)

Hay, N.; Sonenberg, N., Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.* 18(16): 1926-1945 (2004)

Hennige, A. M.; Heni, M.; Machmann, J.; Staiger, H.; Sartorius, T.; Hoene, M.; Lehmann, R.; Weigert, C.; Peter, A.; Bornemann, A.; Kroeber, S.; Pujol, A.; Franckhauser, S.; Bosch, F.; Schick, F.; Lammers, R.; Häring, H.-U., Enforced expression of protein kinase C in skeletal muscle causes physical

inactivity, fatty liver and insulin resistance in the brain. *J. Cell. Mol. Med.* 24 (2008)

Hennige, A. M.; Stefan, N.; Kapp, K.; Lehmann, R.; Weigert, C.; Beck, A.; Moeschel, K., Mushack, J.; Schleicher, E.; Häring, H.-U., Leptin down-regulates insulin action through phosphorylation of Ser318 in insulin receptor substrate 1. *FASEB J.* 20: 1206-1208 (2006)

Hernández, L. R.; Lundberg, U.; Arocha-Piñango, C. L., Experimental thrombosis I: relation with fibrinogen and other haemostatic parameters. *Thromb. Res.* 99(3): 295-305 (2000)

Hilder, T. L.; Tou, J. C.; Grindeland, R. E.; Wade, C. E.; Graves, L. M., Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 serine 307 correlates with JNK activity in atrophic skeletal muscle. *FEBS Lett.* 553(1-2): 63-67 (2003)

Hiratani, K.; Haruta, T.; Tani, A.; Kawahara, J.; Usui, I.; Kobayashi, M., Roles of mTOR and JNK in serine phosphorylation, translocation, and degradation of IRS-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 335(3): 836-842 (2005)

Hoene, M.; Lehmann, R.; Hennige, A. M.; Pohl, A. K.; Häring, H.-U.; Schleicher, E. D.; Weigert, C., Acute regulation of metabolic genes and insulin receptor substrates in the liver of mice by one single bout of treadmill exercise. *J. Physiol.* 587: 241-252 (2009)

Hoene, M.; Franken, H.; Fritsche, L.; Lehmann, R.; Pohl, A. K.; Häring, H.-U.; Zell, A.; Schleicher, E. D.; Weigert, C., Activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signalling pathway in the liver of mice is related to plasma glucose levels after acute exercise. *Diabetologia* 53(6): 1131-1141 (2010)

Horike, N.; Takemori, H.; Katoh, Y.; Doi, J.; Min, L.; Asano, T.; Sun, X. J.; Yamamoto, H.; Kasayama, S.; Muraoka, M.; Nonaka, Y.; Okamoto, M., Adipose-specific expression, phosphorylation of Ser794 in insulin receptor substrate-1, and activation in diabetic animals of salt-inducible kinase-2. *J. Biol. Chem.* 278: 18440-18447 (2003)

Hotamisligil, G. S.; Peraldi, P.; Budavari, A.; Ellis, R.; White, M. F.; Spiegelman, B. M., IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. *Science* 271(5249): 665-668 (1996)

Ishibashi, K. I.; Imamura, T.; Sharma, P. M.; Huang, J.; Ugi, S.; Olefsky, J. M., Chronic endothelin-1 treatment leads to heterologous desensitization of insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes. *J. Clin. Invest.* 107(9): 1193-1202 (2001)

Jakobsen, S. N.; Hardie, D. G.; Morrice, N.; Tornquist, H. E., 5'-AMP-activated protein kinase phosphorylates IRS-1 on Ser-789 in mouse C2C12 myotubes in response to 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside. *J. Biol. Chem.* 276: 46912-46916 (2001)

Jiang, Z. Y.; Zhou, Q. L.; Chatterjee, A.; Feener, E. P.; Myers, M. G. Jr.; White, M. F.; King, G. L., Endothelin-1 modulates insulin signaling through phosphatidylinositol 3-kinase pathway in vascular smooth muscle cells. *Diabetes* 48(5): 1120-1130 (1999)

Juhan-Vague, I.; Collen, D., On the role of coagulation and fibrinolysis in atherosclerosis. *Ann. Epidemiol.* 2(4): 427-438 (1992)

Kannel, W. B., Overview of hemostatic factors involved in atherosclerotic cardiovascular disease. *Lipids.* 40(12): 1215-1220 (2005)

Kasuga, M.; Zick, Y.; Blith, D. L.; Karlsson, F. A.; Häring, H.-U.; Kahn, C. R., Insulin stimulation of phosphorylation of the beta subunit of the insulin receptor: formation of both phosphoserine and phosphotyrosine. *J. Biol. Chem.* 257: 9891-9894 (1982)

Kawamura, K.; Ohgawara, H.; Naruse, M.; Suzuki, N.; Iwasaki, N.; Hori, S.; Demura, H.; Omori, Y., Increased plasma endothelin in NIDDM patients with retinopathy. *Diabetes Care* 15(10):1396-1397 (1992)

Kellerer, M.; Häring, H.-U., Pathogenesis of insulin resistance: modulation of the insulin signal at receptor level. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 28: 173-177 (1995)

Kellerer, M.; Mushack, J.; Seffer, E.; Mischak, H.; Ullrich, A.; Häring, H.-U., Protein kinase C isoforms alpha, delta and theta require insulin receptor substrate-1 to inhibit the tyrosine kinase activity of the insulin receptor in human kidney embryonic cells (HEK 293 cells). *Diabetologia* 41(7): 833-838 (1998)

Kelley, D. E.; Goodpaster, B. H., Effects of physical activity on insulin action and glucose tolerance in obesity. *Med. Sci. Sports Exerc.* 31: 619-623 (1999)

Kim, J. K.; Kim, Y. J.; Fillmore, J. J.; Chen, Y.; Moore, I.; Lee, J.; Yuan, M.; Li, Z. W.; Karin, M.; Perret, P.; Shoelson, S. P.; Shulman, G. I., Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate. *J. Clin. Invest.* 108: 437-446 (2001)

Klarlund, J. K.; Cherniack, A. D.; Conway, B. R.; Van Renterghem, B.; Czech, M. P., Mechanisms of insulin action. *Ellenberg and Rifkin's Diabetes mellitus. Appleton and Lange, Stamford* 5: 75-93 (1997)

Kohno, M.; Yasunari, K.; Murakawa, K.; Yokokawa, K.; Horio, T.; Fukui, T.; Takeda, T., Plasma immunoreactive endothelin in essential hypertension. *Am. J. Med.* 88(6): 614-618 (1990)

Kroder, G.; Bossenmaier, B.; Kellerer, M.; Capp, E.; Stoyanov, B.; Mühlhöfer, A.; Berti, L.; Horikoshi, H.; Ullrich, A.; Häring, H.-U., Tumor necrosis factor- α - and hyperglycemia-induced insulin resistance. Evidence for different mechanisms and different effects on insulin signaling. *J. Clin. Invest.* 97(6): 1471-1477 (1996)

Le Marchand-Brustel, Y.; Gual, P.; Grémeaux, T.; Gonzalez, T.; Barrès, R.; Tanti, J. F., Fatty acid-induced insulin resistance: role of insulin receptor substrate 1 serine phosphorylation in the retroregulation of insulin signaling. *Biochem. Soc. Trans.* 31: 1152-1156 (2003)

Li, J.; De Fea, K.; Roth, R. A., Modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation by an Akt/phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 274(14): 9351-9356 (1999)

Li, Y.; Soos, T. J.; Li, X.; Wu, J.; Degennaro, M.; Sun, X.; Littman, D. R.; Birnbaum, M. J.; Polakicwicz, R. D., Protein kinase C Theta inhibits insulin signaling by phosphorylating IRS1 at Ser(1101). *J. Biol. Chem.* 279: 45304-45307 (2004)

Liberman, Z.; Eldar-Finkelman, H., Serine 332 phosphorylation of insulin receptor substrate-1 by glycogen synthase kinase-3 attenuates insulin signaling. *J. Biol. Chem.* 280: 4422-4428 (2005)

Liu, Y. F.; Herschkovitz, A.; Boura-Halfon, S.; Ronen, D.; Paz, K.; Le Roith, D.; Zick, Y., Serine phosphorylation proximal to its phosphotyrosine binding domain inhibits insulin receptor substrate 1 function and promotes insulin resistance. *Mol. Cell. Biol.* 24: 9668-9681 (2004)

Löffler, G.; Petrides, P., *Biochemie und Pathobiochemie*, 7. Auflage 838-849 (2003)

Luo, M.; Reyna, S.; Wang, L.; Yi, Z.; Carroll, C.; Dong, L. Q.; Langlais, P.; Weintraub, S. T.; Mandarino, L. J., Identification of insulin receptor substrate 1 serine/threonine phosphorylation sites using mass spectrometry analysis: regulatory role of serine 1223. *J. Endocrinology* 146: 4410-4416 (2005)

Luo, M.; Langlais, P.; Yi, Z.; Lefort, N.; De Filippis, E. A.; Hwang, H.; Christ-Roberts, C. Y.; Mandarino, L. J., Phosphorylation of human insulin receptor substrate-1 at serine 629 plays a positive role in insulin signaling. *Endocrinology* 148: 4895-4905 (2007)

Lyn, H. Y.; Kaji, E. H.; Winkel, G. K.; Ives, H. E.; Lodish, H. F., Cloning and functional expression of a vascular smooth muscle endothelin 1 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88(8): 3185-3189 (1991)

Marasciulo, L.; Montagnani, M.; Potenza, M. A., Endothelin-1: The Yin and Yang on Vascular Function. *Curr. Med. Chem.* 13: 1655-1665 (2006)

Masaki, T., The discovery, the present state, and the future prospects of endothelin. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 5: 1-4 (1989)

Matsumoto, H.; Suzuki, N.; Onda, H.; Fujino, M., Abundance of endothelin-3 in rat intestine, pituitary gland and brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164(1): 74-80 (1989)

Mc Culloch, K. M.; Mac Lean, M. R., EndothelinB receptor-mediated contraction of human and rat pulmonary resistance arteries and the effect of pulmonary hypertension on endothelin responses in the rat. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 3: 169-176 (1995)

Meigs, J. B.; Mittleman, M. A.; Nathan, D. M.; Tofler, G. H.; Singer, D. E.; Murphy-Sheehy, P. M.; Lipinska, I.; D'Agostino, R. B.; Wilson, P. W. F., Hyperinsulinemia, Hyperglycemia, and impaired Hemostasis – The Framingham Offspring Study. *JAMA* 283(2): 221-228 (2000)

Moeschel, K.; Beck, A.; Weigert, C.; Lammers, R.; Kalbacher, H.; Voelter, W.; Schleicher, E. D.; Häring, H. U.; Lehmann, R., Protein kinase C-zeta-induced phosphorylation of Ser318 in insulin receptor substrate-1 (IRS-1) attenuates the interaction with the insulin receptor and the tyrosine phosphorylation of IRS-1. *J. Biol. Chem.* 279(24): 25157-25163 (2004)

Molina, J. M.; Ciaraldi, T. P.; Brady, D.; Olefsky, J. M., Decreased activation rate of insulin-stimulated glucose transport in adipocytes from obese subjects. *Diabetes* 38(8): 991-995 (1989)

Morino, K.; Neschen, S.; Bilz, S.; Sono, S.; Tsigotis, D.; Reznick, R. M.; Moore, I.; Nagai, Y.; Samuel, V.; Sebastian, D.; White, M.; Philbrick, W.; Shulman, G. I., Muscle-specific IRS-1 Ser->Ala transgenic mice are protected from fat-induced insulin resistance in skeletal muscle. *Diabetes* 57(10): 2644-2651 (2008)

Mothe, I.; Van Obberghen, E., Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on multiple serine residues, 612, 632, 662, and 731, modulates insulin action. *J. Biol. Chem.* 271: 11222-11227 (1996)

Müssig, K.; Fiedler, H.; Staiger, H.; Weigert, C.; Lehmann, R.; Schleicher, E. D.; Häring, H. U., Insulin-induced stimulation of JNK and the PI3K/mTOR pathway leads to phosphorylation of serine 318 of IRS-1 in C2C12 myotubes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 335(3): 819-825 (2005)

Müssig, K.; Staiger, H.; Fiedler, H.; Moeschel, K.; Beck, A.; Kellerer, M.; Häring, H. U., Shp2 is required for protein kinase C-dependent phosphorylation of serine 307 in insulin receptor substrate-1. *J. Biol. Chem.* 280(38): 32693-32699 (2005)

Myers, M. G.; Backer, J. M.; Sun, X. J.; Shoelson, S.; Hu, P.; Schlessinger, J.; Yoakim, M.; Schaffhausen, B.; White, M. F., IRS-1 activates phosphatidylinositol 3'-kinase by associating with src homology 2 domains of p85. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10350-10354 (1992)

Nawaratne, R.; Gray, A.; Jorgensen, C. H.; Downes, C. P.; Siddle, K.; Sethi, J. K., Regulation of insulin receptor substrate 1 pleckstrin homology domain by protein kinase C: role of serine 24 phosphorylation. *Mol. Endocrinol.* 20: 1838-1852 (2006)

Ottosson-Seeberger, A.; Lundberg, J. M.; Alvestrand, A.; Ahlborg, G., Exogenous endothelin-1 causes peripheral insulin resistance in healthy humans. *Acta. Physiol. Scand.* 161(2): 211-220 (1997)

Ozes, O. N.; Akca, H.; Mayo, L. D.; Gustin, J. A.; Maehama, T.; Dixon, J. E.; Donner, D. B., A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR pathway mediates and PTEN antagonizes tumor necrosis factor inhibition of insulin signaling through insulin receptor substrate-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98(8): 4640-4645 (2001)

Panek, R. L.; Major, T. C.; Hingorani, G. P.; Doherty, A. M.; Taylor, D. G.; Rapundalo, S. T., Endothelin and structurally related analogs distinguish between endothelin receptor subtypes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 183(2): 566-571 (1992)

Paz, K.; Liu, Y. F.; Shorer, H.; Hemi, R.; Le Roith, D.; Quan, M.; Kanety, H.; Seger, R.; Zick, Y., Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1) by protein kinase B positively regulates IRS-1 function. *J. Biol. Chem.* 274: 28816-28822 (1999)

Reaven, G. M., Insulin secretion and insulin action in non-insulin-dependent diabetes mellitus: which defect is primary? *Diabetes Care* 7(1): 17-24 (1984)

Remuzzi, G.; Perico, N.; Benigni, A., New therapeutics that antagonize endothelin: promises and frustrations. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1: 986-1001 (2002)

Rui, L.; Aguirre, V.; Kim, J. K.; Shulman, G. I.; Lee, A.; Corbould, A.; Dunaif, A.; White, M. F., Insulin/IGF-1 and TNF- α stimulate phosphorylation of IRS-1 at inhibitory Ser³⁰⁷ via distinct pathways. *J. Clin. Invest.* 107: 181-189 (2001)

Sajan, M. P.; Standaert, M. L.; Miura, A.; Bandyopadhyay, G.; Vollenweider, P.; Franklin, D. M.; Lea-Currie, R.; Farese, R. V., Impaired activation of protein kinase C- ζ by insulin and phosphatidylinositol-3,4,5-(PO₄)₃ in cultured preadipocyte-derived adipocytes and myotubes of obese subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89: 3994-3998 (2004)

Sandquist, M.; Nyberg, G.; Hammarstedt, A.; Klintland, N.; Gogg, S.; Caidahi, K.; Ahren, B.; Smith, U.; Jansson, P. A., Low adipocyte IRS-1 protein expression is associated with an increased arterial stiffness in non-diabetic males. *Atherosclerosis* 180: 119-125 (2005)

Scarlett, J. A.; Kolterman, O. G.; Ciaraldi, T. P.; Kao, M.; Olefsky, J. M., Insulin treatment reverses the postreceptor defect in adipocyte 3-O-methylglucose transport in type II diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metabolism* 56(6): 1195-1201 (1983)

Schäfer, S.; Kantartzis, K.; Machmann, J.; Venter, C.; Niess, A.; Schick, F.; Machicao, F.; Häring, H.-U.; Fritsche, A.; Stefan, N., Lifestyle intervention in individuals with normal versus impaired glucose tolerance. *Eur. J. Clin. Invest.* 37: 619-623 (2007)

Shepherd, P. R.; Withers, D. J.; Siddle, K., Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem. J.* 333(3): 471-490 (1998)

Shinmi, O.; Kimura, S.; Sawamura, T.; Sugita, Y.; Yoshizawa, T.; Uchiyama, Y.; Yanagisawa, M.; Goto, K.; Masaki, T.; Kanazawa, I., Endothelin-3 is a novel neuropeptide: isolation and sequence determination of endothelin-1 and endothelin-3 in porcine brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164: 587-593 (1989)

Staiger, K.; Schatz, U.; Staiger, H.; Weyrich, P.; Haas, C.; Guirguis, A.; Machicao, F.; Häring, H.-U.; Kellerer, M., Protein kinase C ι mediates lipid-induced apoptosis of human coronary artery endothelial cells. *Microvasc. Res.* 78(1): 40-44 (2009)

Stefan, N.; Fritsche, A.; Häring, H.-U., [Individualized prevention of type 2 diabetes] *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 52(7): 877-882 (2009)

Steyn, N. P.; Mann, J.; Bennett, P. H.; Temple, N.; Zimmet, P.; Tuomilehto, J.; Lindstrom, J.; Louheranta, A., Diet, nutrition and the prevention of type 2 diabetes. *Public Health Nutr.* 7: 147-165 (2004)

Strack, V.; Hennige, A. M.; Krütfeld, J.; Bossenmaier, B.; Klein, H. H.; Kellerer, M.; Lammers, R.; Häring, H.-U., Serine residues 994 and 1023/25 are important for insulin receptor kinase inhibition by protein kinase C isoforms β_2 and θ . *Diabetologia* 43(4): 443-449 (2000)

Straus, D. S., Regulation by insulin of cellular growth and proliferation: Relationship to the insulin-like growth factors. *Insulin Action. A. R. Liss* 143 (1989)

Sugita, M.; Sugita, H.; Kaneki, M., Increased insulin receptor substrate 1 serine phosphorylation and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal

kinase activation associated with vascular insulin resistance in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 44(4): 484-489 (2004)

Sun, X. J.; Rothenberg, P.; Kahn, C. R.; Backer, J. M.; Araki, E.; Wilden, P. A.; Cahill, D. A.; Goldstein, B. J.; White, M. F., Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* 352: 73-77 (1991)

Sykiotis, G. P.; Papavassiliou, A. G., Serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1: a novel target for the reversal of insulin resistance. *Mol. Endocrinol.* 15: 1864-1869 (2001)

Takahashi, K.; Ghatei, M. A.; Lam, H. C.; O'Halloran, D. J.; Bloom, S. R., Elevated plasma endothelin in patients with diabetes mellitus. *Diabetologia* 33: 306-310 (1990)

Talukdar, I.; Szeszel-Fedorowicz, W.; Salati, L. M., Arachidonic acid inhibits the insulin induction of glucose-6-phosphate dehydrogenase via p38 MAP kinase. *J. Biol. Chem.* 289(49): 40660-40667 (2005)

Tanti, J. F.; Grémenaux, T.; Van Obberghen, E.; Le Marchand-Brustel, Y., Insulin receptor substrate 1 is phosphorylated by the serine kinase activity of phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.* 269: 6051-6057 (1994)

Tanti, J. F.; Gual, P.; Gremeaux, T.; Gonzalez, T.; Barres, R.; Le Marchand-Brustel, Y., Alteration in insulin action: role of IRS-1 serine phosphorylation in the retroregulation of insulin signalling. *Ann. Endocrinol. (Paris)* 65(1): 43-48 (2004)

Tremblay, F.; Marette, A., Amino Acid and Insulin Signaling via the mTOR/p70 S6 Kinase Pathway. *J. Biol. Chem.* 276(41): 38052-38060 (2001)

Trichitta, V.; Brunetti, A; Chiavetta, A; Benzi, L; Papa, V; Vigneri, R., Defects in insulin-receptor internalization and processing in monocytes of obese subjects and obese NIDDM patients. *Diabetes* 38: 1579-1584 (1989)

Ueki, K.; Yamamoto-Honda, R.; Kaburagi, Y.; Yamauchi, T.; Tobe, K.; Burgering, B. M.; Coffey, P. J.; Komuro, I.; Akanuma, Y.; Yazaki, Y.; Kadowaki, T., Potential role of protein kinase B in insulin-induced glucose transport, glycogen synthesis, and protein synthesis. *J. Biol. Chem.* 273(9): 5315-5322 (1998)

Um, S. H.; Frigerio, F.; Watanabe, M.; Picard, F.; Joaquin, M.; Sticker, M.; Fumagalli, S.; Allegrini, P. R.; Kozma, S. C.; Auwerx, J.; Thomas, G., Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature* 431(7005): 200-205 (2004)

Vinereanu, D., Risk factors for atherosclerotic disease: present and future. *Herz* 31(3): 5-25 (2006)

Vollenweider, P.; Menard, B.; Nicod, P., Insulin resistance, defective insulin receptor substrate 2-associated phosphatidylinositol-3' kinase activation, and impaired atypical protein kinase C (ζ/λ) activation in myotubes from obese patients with impaired glucose tolerance. *Diabetes* 51: 1935-1942 (2002)

Wallberg-Henriksson, H., Interaction of exercise and insulin in type II diabetes mellitus. *Diabetes Care* 15(11): 1777-1782 (1992)

Waraich, R. S.; Weigert, C.; Kalbacher, H.; Hennige, A. M.; Lutz, S.; Häring, H.-U.; Schleicher, E. D.; Voelter, W.; Lehmann, R., Phosphorylation of Ser357 of rat insulin receptor substrate-1 mediates adverse effects of protein kinase C-delta on insulin action in skeletal muscle cells. *J. Biol. Chem.* 283(17): 11226-11233 (2008)

Watanabe, T.; Kusumoto, K.; Kitayoshi, T.; Shimamoto, N., Positive inotropic and vasoconstrictive effects of endothelin-1 in in vivo and in vitro experiments: characteristics and the role of L-type calcium channels. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 5: 108-111 (1989)

Weigert, C.; Hennige, A. M.; Brodbeck, K.; Häring, H.-U.; Schleicher, E. D., Interleukin-6 acts as insulin sensitizer on glycogen synthesis in human skeletal muscle cells by phosphorylation of Ser473 of Akt. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 289: 251-257 (2005)

Weigert, C.; Hennige, A. M.; Brischmann, T.; Beck, A.; Moeschel, K.; Schäuble, M.; Brodbeck, K.; Häring, H. U.; Schleicher, E. D.; Lehmann, R., The phosphorylation of Ser318 of insulin receptor substrate 1 is not per se inhibitory in skeletal muscle cells but is necessary to trigger the attenuation of the insulin-stimulated signal. *J. Biol. Chem.* 280(45): 37393-37399 (2005)

Weigert, C.; Hennige, A. M.; Lehmann, R.; Brodbeck, K.; Baumgartner, F.; Schäuble, M.; Häring, H. U.; Schleicher, E. D., Direct cross-talk of interleukin-6 and insulin signal transduction via insulin receptor substrate-1 in skeletal muscle cells. *J. Biol. Chem.* 281(11): 7060-7067 (2006)

Weigert, C.; Kron, M.; Kalbacher, H.; Pohl, A. K.; Runge, H.; Häring, H.-U.; Schleicher, E.; Lehmann, R., Interplay and Effects of Temporal Change in the Phosphorylation State of Serine-302, -307, and -318 of Insulin Receptor Substrate-1 on Insulin Action in Skeletal Muscle Cells. *Molecular Endocrinology* 22(12): 2729-2740 (2008)

Werner, E. D.; Lee, J.; Hansen, L.; Yuan, M.; Shoelson, S. E., Insulin resistance due to phosphorylation of insulin receptor substrate-1 at serine 302. *J. Biol. Chem.* 279(34): 35298-35305 (2004)

White, M. F.; Kahn, C. R., Cascade of autophosphorylation in the beta-subunit of the insulin receptor. *J. Cell. Biochem.* 39(4): 429-441 (1989)

White, M. F.; Kahn, C. R., The insulin signaling system. *J. Biol. Chem.* 269: 1-4 (1994)

White, M. F., Regulating insulin signaling and beta-cell function through IRS proteins. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 84:725-737 (2006)

Wilden, P. A.; Kahn, C. R., The level of insulin receptor tyrosine kinase activity modulates the activities of phosphatidylinositol 3-kinase, microtubule-associated protein, and S6 kinases. *Mol. Endocrinol.* 8(5): 558-567 (1994)

Wilkes, J. J.; Hevener, A.; Olefsky, J., Chronic endothelin-1 treatment leads to insulin resistance in vivo. *Diabetes* 52(8): 1904-1909 (2003)

Yoshida, T.; Yamagishi, S.; Nakamura, K.; Matsui, T.; Imaizumi, T.; Takeuchi, M.; Koga, H.; Ueno, T.; Sata, M., Pigment epithelium-derived factor (PEDF) ameliorates advanced glycation end product (AGE)-induced hepatic insulin resistance in vitro by suppressing Rac-1 activation. *Horm. Metab. Res.* 40(9): 620-625 (2008)

Yu, C.; Chen, Y.; Cline, G. W.; Zhang, D.; Zong, H.; Wang, Y.; Bergeron, R.; Kim, J. K.; Cushman, S. W.; Cooney, G. J.; Atcheson, B.; White, M. F.; Kraegen, E. W.; Shulman, G. I., Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J. Biol. Chem.* 277: 50230-50236 (2002)

Zhang, Q.; Carter, E. A.; Ma, B. Y.; White, M.; Fischman, A. J.; Tompkins, R. G., Molecular mechanism(s) of burn-induced insulin resistance in murine skeletal muscle: role of IRS phosphorylation. *Life Sci.* 77(24): 3068-3077 (2005)

Zick, Y., Uncoupling insulin signalling by serine/threonine phosphorylation: a molecular basis for insulin resistance. *Biochem. Soc. Trans.* 32: 812-816 (2004)

9. Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand von September 2006 bis Dezember 2007 in der Abteilung für Endokrinologie, Diabetologie, Angiologie, Nephrologie und Klinische Chemie an der Medizinischen Klinik und Poliklinik der Universität Tübingen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H.-U. Häring.

Herrn **Prof. Dr. Dr. h. c. Hans- Ulrich Häring** danke ich ganz herzlich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in seinem Labor, die interessante Aufgabenstellung, seine freundliche Unterstützung, seine Geduld und seine zahlreichen Anregungen zur Bearbeitung.

Mein ganz besonderer Dank gilt **PD Dr. Karsten Müssig** für die großartige und zeitintensive Betreuung und für die äußerst freundliche, herzliche und große Unterstützung beim Erlernen der zellbiologischen und proteinbiochemischen Methoden. Auch darüber hinaus ist er für mein Studium und meinen beruflichen Werdegang zu einem wertvollen Berater geworden. Noch wesentlicher und zum Vorbild wurde für mich in der Zeit, in der diese Arbeit entstanden ist, seine ansteckend große und unerschöpfliche Motivation für diese Forschung.

Mein besonderer Dank gilt darüber hinaus **Prof. Dr. Harald Staiger**, der nicht nur durch seine umfangreiche Erfahrung, sondern auch aufgrund seiner herzlichen und verständnisvollen Haltung für mich immer eine großzügige Unterstützung war und ich viel von seinen fachlichen Ratschlägen profitieren durfte.

Weiter möchte ich den lieben Kollegen **Carina Haas, Heike Lönz, Dr. Yuko Grichisch, Anja Böhm, Alexander Krogmann, Martina Melzer, Elisabeth Metzinger, Dr. Anita Hennige, Doro Neuscheler, PD Dr. Reiner Lammers, PD Dr. Cora Weigert und PD Dr. Rainer Lehmann** danken, die mir mit ihrer oft langjährigen Erfahrung oft weiterhelfen konnten und immer ein offenes Ohr für meine Anliegen hatten.

Danken möchte ich außerdem den Kollegen aus den Nachbarlaboren **Anna-Maria Kovacs, Dr. Martin Heni, Sabine Hopp, Dr. Stefan Lutz, Felicia Ranta, Diana Avram und Mary-Ann Schneider** für die freundliche und hilfsbereite Stimmung, die hier stets herrschte.

Meiner Familie und meinen Freunden vielen lieben Dank für ihr Verständnis und ihre Unterstützung. Der allergrößte Dank aber gebührt meinen Eltern, die mich auf einzigartig liebevolle, geduldige und großzügige Art und Weise immer uneingeschränkt unterstützt und motiviert haben. Nur mit ihrer Hilfe war es mir möglich, mein Studium zu betreiben und diese Promotion zu vollenden.

10. Lebenslauf

Sylvia Carina Barth

Geburtsdatum: 22.04.1984

Geburtsort: Schwäbisch Gmünd

Eltern: Dr. Hartwig Barth, Zahnarzt

Karin Barth geb. Kränzle, Gymnasiallehrerin

Geschwister: Dominik Barth, geb. 1986

Schulbesuch:

Grundschule: 1990 - 1994 Schillerschule in Heubach

Gymnasium: 1994 - 2003 Rosensteingymnasium in Heubach

Schulabschluss: Juni 2003 Abitur

Studium:

Medizinstudium: Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen 2003 - 2009

Krankenpflegepraktika: im Kreiskrankenhaus Schwäbisch Gmünd-Mutlangen
vom 07.07.2003 bis zum 31.08.2003 und vom 01.03.2004 bis zum 04.04.2004

Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung: bestanden am 25.08.2005

Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung: bestanden am 12.11.2009

Famulaturen:

März 2006 am Klinikum Großhadern in München im Fach Chirurgie

September 2006 am Universitätsklinikum Tübingen im Fach Pädiatrie

März 2007 am Universitätsklinikum Tübingen im Fach Inneren Medizin

August 2007 am Klinikum Hamburg-Alsterdorf im Fach Psychiatrie

März 2008 am Ostalbklinikum Aalen im Fach Neonatologie

Praktisches Jahr:

August bis Dezember 2008: Innere Medizin am Universitätsklinikum Tübingen

Dezember 2008 bis April 2009: Chirurgie am Inselspital in Bern (Schweiz)

April bis Juli 2009: Pädiatrie am Universitätsklinikum Tübingen