

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie

Direktor: Prof. Dr. Rainer H. Böger

**Der Einfluss von Argininderivaten auf die Insulinsignalkaskade im
Zellkulturmodell**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin vorgelegt an der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Susann Groschke, geboren in Cottbus

Hamburg, Dezember 2013

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 16.12.2013

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Rainer H. Böger

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: PD Dr. Edzard Schwedhelm

Prüfungsausschuss, dritter Gutachter: Prof. Dr. F. U. Beil

Inhaltsverzeichnis

1	Arbeitshypothese und Fragestellung	1
2	Einleitung	2
2.1	Diabetes mellitus	2
2.2	Insulinsignaltransduktionskaskade	4
2.3	NO Produktion und Argininderivate	6
2.4	ADMA und Diabetes mellitus	8
2.5	NO, Insulinresistenz, Argininderivate	10
2.6	Zielsetzung	12
3	Methoden und Materialien	14
3.1	Zellkultur	14
3.1.1	L6 Myozyten (Rattus norvegicus)	14
3.1.2	3T3-L1-Adipozyten (Mus musculus)	15
3.2	Transfektion: Turbofect®	16
3.3	Western Blot	17
3.3.1	Proteingewinnung	17
3.3.2	Proteinkonzentration	18
3.3.3	SDS PAGE	18
3.3.4	Blotten der Proteine	20
3.4	RNA Aufbereitung	23
3.4.1	RNA-Gewinnung	23
3.4.2	DNase-Verdau	24
3.4.3	Umschreiben der RNA in cDNA	24
3.5	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	25
3.5.1	Primer Design und Qualitative PCR	26
3.5.2	Quantitative PCR-Methoden (qPCR)	29
3.6	Fluorimetrische Nitrit-Messung: Griess Assay	33
3.7	Radioaktiver 2-Deoxyglucosetransport	34
3.8	Statistische Auswertung der experimentellen Arbeit	35
3.9	Materialien	36

3.9.1	Laborgeräte	36
3.9.2	Substanzen.....	37
3.9.3	Zellen und Zellkulturmedien.....	39
3.9.4	Verbrauchsmaterialien und Kits	40
3.9.5	Antikörper und Vektoren	41
3.9.6	Software.....	41
4	Ergebnisse	42
4.1	Charakterisierung der verwendeten Zellkultursysteme.....	42
4.1.1	L6 Myozyten	42
4.1.1.1	mRNA-Expression.....	42
4.1.1.2	Proteinexpression.....	44
4.1.1.3	Radioaktive 2-Deoxyglucoseaufnahme	45
4.1.1.4	Transfektion.....	46
4.1.1.5	Messung von Natriumnitrit.....	47
4.1.2	3T3-L1-Adipozyten	48
4.1.2.1	mRNA-Expression.....	48
4.1.2.2	Proteinexpression.....	50
4.1.2.3	Radioaktive 2-Deoxyglucoseaufnahme	52
4.1.2.4	Transfektion.....	52
4.2	Einfluss von NO-Donatoren auf den Glucosetransport.....	53
4.3	Einfluss von ADMA auf die 3T3-L1-Adipozyten.....	54
4.3.1	mRNA-Expression	54
4.3.2	Proteinexpression	55
4.3.3	Radioaktive 2-Deoxyglucoseaufnahme	58
4.4	Einfluss von SDMA auf die 3T3-L1-Adipozyten.....	59
4.4.1	mRNA-Expression	59
4.4.2	Proteinexpression	60
4.4.3	Radioaktive 2-Deoxyglucoseaufnahme	62
5	Diskussion.....	64
5.1	Zellkultursysteme	64
5.2	Einfluss von ADMA.....	66

5.3	Einfluss von SDMA.....	66
5.4	Diabetes mellitus und iNOS Transfektion.....	67
5.5	Einfluss von NO-Donatoren.....	70
5.6	Ausblick.....	73
6	Zusammenfassung.....	75
7	Anhang.....	77
7.1	Literaturverzeichnis	77
7.2	Abkürzungen	85
7.3	Risiko- und Sicherheitssätze (R- und S-Sätze)	87
7.4	Abbildungsverzeichnis.....	90
7.5	Tabellenverzeichnis.....	95
8	Danksagung.....	96
9	Lebenslauf.....	98
10	Eidesstattliche Versicherung.....	99

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Die Pathophysiologie des Typ 2 Diabetes mellitus ist trotz intensiver Forschung nicht vollständig aufgeklärt. Mechanismen zur Entstehung von Insulinresistenz über chronische Entzündungsprozesse werden immer stärker diskutiert (Xu et al., 2003). Das asymmetrische Dimethylarginin (ADMA) hat sich in den letzten Jahren als Risikofaktor für kardiovaskuläre Ereignisse und Mortalität herausgestellt. ADMA reduziert die Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) über Hemmung von NO-Synthasen, was unter anderem zu einer endothelialen Dysfunktion führt (Böger et al., 2009). Die endotheliale Dysfunktion trägt ihrerseits zur Entstehung von Diabetes mellitus bei (Perticone et al., 2010). Das biologisch inaktive Strukturisomer symmetrisches Dimethylarginin (SDMA) wird dagegen als ein neuer Marker für die Nierenfunktion diskutiert (Kielstein et al., 2006). Studien, die einen Zusammenhang zwischen Diabetes mellitus, NO und Argininderivaten erforschten, lieferten bisher widersprüchliche Ergebnisse.

NO kann einerseits vasodilatativ und antiatherogen, andererseits über nitrosativen Stress entzündungsfördernd und diabetogen wirken. Argininderivate könnten über Hemmung der NO-Synthasen oder davon unabhängige Mechanismen Veränderungen der Insulinsensitivität bewirken.

Ziel dieser Arbeit war daher die Etablierung eines geeigneten Zellkulturmodells für Untersuchungen der Insulinsignalkaskade. In diesem sollte die Bedeutung der Argininderivate ADMA und SDMA auf die Insulinsignaltransduktion und die Glucoseaufnahme untersucht werden. Insbesondere sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- Gibt es einen Einfluss von ADMA auf die Insulinsignalkaskade auf mRNA- und Proteinebene? Als Zielmoleküle sollen dabei IRS-1/IRS-2, die Proteinkinase B (Akt/PKB), sowie der Glucosetransporter 4 (GLUT4) untersucht werden. Wirkt sich ADMA auf funktioneller Ebene, also auf die basale und die Insulin stimulierte 2-Deoxyglucoseaufnahme aus?
- Gibt es einen Einfluss von SDMA auf die Insulinsignalkaskade und die Glucoseaufnahme?
- Wie wirkt sich NO-Stimulation auf die Glucoseaufnahme aus? Welcher Zusammenhang besteht zu den Argininderivaten?

2 Einleitung

2.1 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus ist eine stetig an Bedeutung gewinnende Krankheit. Aktuelle Studien zeigen einen Anstieg der Prävalenz von 153 auf 347 Millionen Betroffene von 1980 bis 2008 weltweit (Danaei et al., 2011).

Der Begriff Diabetes mellitus, griech. für „honigsüßer Durchfluss“, bezeichnet dabei eine chronische Stoffwechselerkrankung, welche durch einen absoluten oder relativen Insulinmangel gekennzeichnet ist und in deren Folge es zu Schäden an Gefäßen, Nerven und Organen kommt (WHO, 1999).

Die Diagnose darf nach aktuellen Leitlinien (Bundesärztekammer (BÄK), 2013) bei Zutreffen eines der folgenden Kriterien gestellt werden:

- HbA_{1c} (glykiertes Hämoglobin) $\geq 6,5\%$
- Gelegenheits-Plasmaglucosewert von ≥ 200 mg/dl ($\geq 11,1$ mmol/l)
- Nüchtern-Plasmaglukose von ≥ 126 mg/dl ($\geq 7,0$ mmol/l)
- Oraler Glucosetoleranztest (oGTT) 2-h-Wert im venösen Plasma ≥ 200 mg/dl ($\geq 11,1$ mmol/l).

Derzeit werden vier verschiedene Typen unterschieden:

- Typ 1,
- Typ 2,
- andere spezifische Diabetestypen und
- Gestationsdiabetes.

Die genaue ätiologische Zuordnung bedarf weiterer Diagnostik, um eine bestmögliche Therapie zu garantieren (Kerner and Brückel, 2011).

Diabetes mellitus Typ 1 betrifft etwa 5% aller Diabetiker und ist eine Autoimmunerkrankung. Pathophysiologische Grundlage ist hierbei die Zerstörung der Insulin produzierenden pankreatischen β -Zellen durch autoreaktive Antikörper. Die Patienten sind meistens jung und zeigen zu Krankheitsbeginn oft einen dramatischen Krankheitsverlauf mit Polyurie und lebensbedrohlicher ketoazidotischer Stoffwechselentgleisung. Bei Subtyp A kann man Autoantikörper

identifizieren, Subtyp B ist idiopathisch, es sind also keine Antikörper nachweisbar (Böhm et al., 2011).

Etwa 85% der Patienten haben einen Diabetes mellitus Typ 2. Diese Form ist gekennzeichnet durch einen langsameren, schleichenden Beginn und einen Zustand der Insulinresistenz, der sich meist auf dem Boden einer langjährig hochkalorischen Diät und Bewegungsmangel entwickelt. Insulinresistenz beschreibt einen Zustand, in dem zwar noch Insulin gebildet wird, die peripheren Zellen aber zunehmend weniger auf diese Stimulation reagieren (Lillioja et al., 1993). Im weiteren Verlauf kann es nach langer kompensatorischer Hyperinsulinämie schließlich zur Erschöpfung der Bauchspeicheldrüse kommen, sodass ein absoluter Insulinmangel entsteht. Der Großteil der Erkrankungen entwickelt sich im Rahmen des sogenannten metabolischen Syndroms, bei dem vier Risikofaktoren zusammentreffen (Reaven, 1993):

- Abdominelle Adipositas
- Dyslipoproteinämie
- Essentieller Hypertonus
- Glucosetoleranzstörung bzw. Typ 2 Diabetes mellitus.

Es gibt auch einige Sonderformen, wie zum Beispiel der sogenannte „latent autoimmune Diabetes in adults“ (LADA), bei dem ältere Patienten Autoantikörper gegen die Glutamatdecarboxylase entwickeln und schnell insulinpflichtig werden. Die Sonderformen machen in Deutschland etwa 5% aller Diabetesvarianten aus (Giani et al., 2004).

Ein Gestationsdiabetes tritt definitionsgemäß erstmalig in der Schwangerschaft auf und betrifft weltweit etwa eine von 25 Schwangerschaften. Das Risiko, daraufhin innerhalb der nächsten 10 Jahre einen Typ 2 Diabetes mellitus zu entwickeln, ist deutlich erhöht und beträgt in Studien bis zu 70% (Kim et al., 2002).

Allen Typen gemeinsam sind die durch die langfristig erhöhten Blutzuckerspiegel bedingten makro- und mikrovaskulären Komplikationen, die mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität einhergehen (Creager et al., 2003). Mikrovaskuläre Komplikationen betreffen die kapillare Versorgung der Organe und äußern sich als diabetische Nephro-, Retino- und Neuropathie. Die diabetische Nephropathie ist dabei die häufigste Ursache für eine Niereninsuffizienz in industrialisierten

Ländern (Abholz et al., 2011). Makrovaskuläre Komplikationen zeigen sich als erhöhte Prävalenz von Arteriosklerose, Herzinfarkten und Schlaganfällen (Moore et al., 2009).

Die vorliegende Arbeit soll sich mit der Pathophysiologie des Typ 2 Diabetes mellitus befassen, die bis heute nicht ganz verstanden ist. In der Wissenschaft werden genetische und metabolische Faktoren diskutiert. So besteht beispielsweise bei Kindern eines Patienten mit Typ 2 Diabetes mellitus ein 50%iges Risiko der Erkrankung, bei eineiigen Zwillingen beträgt das Erkrankungsrisiko fast 100% für den zweiten Zwilling, wenn ein Zwilling erkrankt ist. Andererseits spielen metabolische Faktoren eine bedeutende Rolle. Es gibt starke Hinweise, dass chronische Entzündungsprozesse im Körper eine schleichende Insulinresistenz verursachen. Diese Hypothese wird unterstützt durch die Beobachtung, dass septische Patienten oder solche mit großflächigen Verbrennungen eine Hyperglycämie entwickeln. Die Gabe von Insulin verringert dabei die Morbidität und Mortalität der Patienten (van den Berghe et al., 2001). Als pathophysiologische Ursache vermutet man, dass die disproportionierte Ausschüttung von gegenregulatorischen Hormonen, wie Glucagon, Cortisol und Wachstumshormonen, sowie inflammatorische Zytokine zu einer Insulinresistenz führen (Nasraway, 2006). Ähnliche Veränderungen werden auf zellulärer Ebene, als sogenannte Mikroinflammation, bei nicht kritisch kranken Diabetikern vermutet.

2.2 Insulinsignaltransduktionskaskade

Insulin ist ein Peptidhormon, welches in den β -Zellen des endokrinen Pankreas gebildet wird. Es ist als einziges Hormon in der Lage, den Blutzuckerspiegel zu senken. Es gibt im Wesentlichen drei Zielgewebe, die auf Insulinstimulation reagieren: Leber, Skelettmuskel und weißes Fettgewebe (Rassow, 2012). Die erleichterte Glucoseaufnahme in die Zellen und damit die Senkung des Blutzuckerspiegels wird durch die Insulin stimulierte Translokation des Glucosetransporters 4 (GLUT4) in die Zellmembran von Fett- und Muskelzellen erreicht. Im Gegensatz dazu steht der Glucosetransporter 1 (GLUT1), welcher Insulin unabhängig Glucose aufnimmt. Dieser Transporter ist für die basale Glucoseversorgung vieler Zelltypen verantwortlich und wird insbesondere in Erythrocyten und an der Blut-Hirn-Schranke exprimiert, wo eine stetige Insulin

unabhängige Nährstoffzufuhr essentiell ist. In Zellkulturmodellen der Insulinsignaltransduktionskaskade verändert sich das Expressionsmuster mit zunehmender Differenzierung der Zellen in Richtung der GLUT4-Transporter (Mitsumoto and Klip, 1992). GLUT4 liegt unter Ruhebedingungen größtenteils im Zytosol und werden nach Stimulation in die Zellmembran eingebaut (Dugani and Klip, 2005). Insulin bindet dabei an einen transmembranären Rezeptor, was zur Autophosphorylierung der intrazellulären Domäne führt. Durch darauffolgende Phosphorylierung der Tyrosinreste der Insulin-Rezeptor-Substrate 1 und 2 (IRS-1/2) werden zwei wichtige Kaskaden aktiviert (Klip, 2009) (vgl. Abbildung 1).

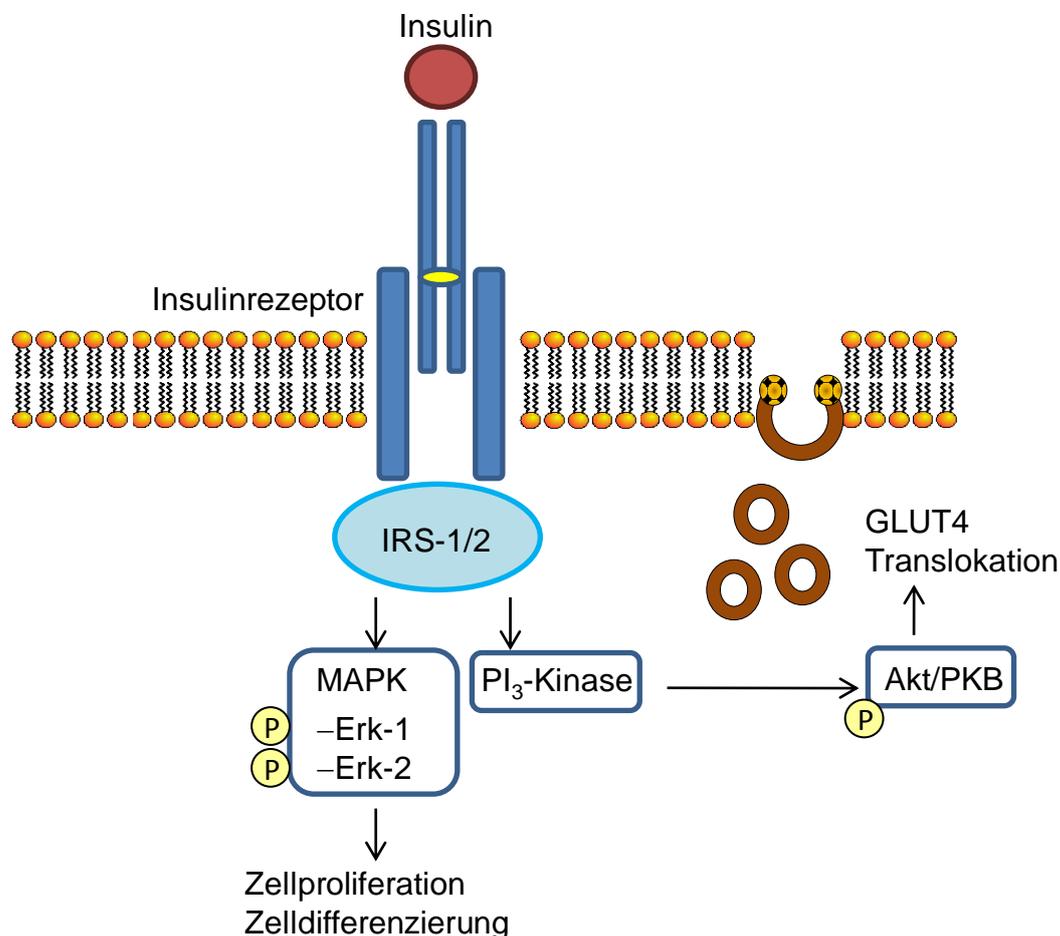


Abbildung 1: Schematische Darstellung der intrazellulären Insulinsignaltransduktionskaskade. IRS-1/2 Insulin Rezeptor Substrat-1/2, MAPK *mitogen activated protein kinase*, Erk-1/2 *extracellular regulated kinase-1/2*, PI₃-Kinase Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase, Akt/PKB Proteinkinase B, GLUT4 Glucosetransporter 4, (P) Phosphorylierung, eigene Darstellung.

Einerseits kommt es über Induktion der *mitogen activated protein kinase* (MAPK) zu Veränderungen auf transkriptioneller Ebene, die zu Reifung und Proliferation

anregen. Die MAPK hat zwei Phosphorylierungsstellen Erk-1 und Erk-2 (*extracellular regulated Kinase-1/2*). Der zweite Signalweg führt zu dem Akuteffekt von Insulin auf die Zellen – die erleichterte Glucoseaufnahme. IRS-1 bindet dabei an eine regulatorische Untereinheit der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI₃-Kinase), die durch Phosphorylierung die Proteinkinase B (Akt/PKB)¹ zu phospho-Akt (pAkt) aktiviert. Dies führt über weitere Schritte zu einer Translokation der GLUT4-Transporter in die Zellmembran und damit zu einer erhöhten Glucoseaufnahme in die Zelle.

2.3 NO Produktion und Argininderivate

NO Produktion

Stickstoffmonoxid (NO) wird in Endothelzellen aus der Aminosäure L-Arginin unter Bildung von Citrullin durch das Enzym endotheliale NO-Synthase (eNOS) gebildet und hat vielfältige Aufgaben im Bereich der vaskulären Homöostase. Es reguliert den Gefäßtonus, inhibiert die Monozytenadhäsion und Thrombozytenaggregation, sowie die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen (Böger, 2006). Auf Grund der vasodilatativen Eigenschaften werden Nitrate als NO-Donatoren seit langem für die symptomatische Therapie der Angina pectoris bzw. des akuten Koronarsyndroms eingesetzt (Wimalawansa, 2008).

NO kann im Organismus allerdings auch potentiell schädliche Wirkungen haben (Schmidt and Walter, 1994). Es kann beispielsweise mit Superoxid (O₂⁻) zu Peroxinitrit (ONOO⁻) reagieren. Diese Reaktion ist dreimal schneller, als die Superoxiddismutase Superoxid abfangen kann. Peroxinitrit ist wiederum in der Lage, Proteine und Lipide zu nitrieren, was zu einer veränderten Funktion von bestimmten Enzymen führen kann (Beckman and Koppenol, 1996). Zudem wurde gezeigt, dass sogenannte reaktive Nitrogen-Spezies eine Rolle in den frühen Phasen der Arterioskleroseentstehung haben (Darley-Usmar et al., 1992). Diese Daten deuten an, dass NO sowohl oxidative, als auch antioxidative Funktionen in der Pathogenese von kardiovaskulären Erkrankungen und Diabetes mellitus hat (Patel et al., 2000). Es existieren 3 Isoformen der NO-Synthase (NOS): die

¹ Akt/PKB wird in den folgenden Abschnitten zur Vereinfachung nur als Akt bezeichnet.

endotheliale NOS (eNOS, NOS I), die neuronale NOS (nNOS, NOS III) und die induzierbare NOS (iNOS, NOS II). Die eNOS und die nNOS werden in vielen Geweben konstitutiv exprimiert und daher teilweise als konstitutive NOS (cNOS) zusammengefasst. Ihre Aktivierung ist im Gegensatz zu der iNOS Calcium abhängig (Kuo and Schroeder, 1995). Die induzierbare NO-Synthase wird vor allem in Makrophagen und Monozyten exprimiert, kann aber durch Zytokine auch in vielen anderen Geweben induziert werden. Sie produziert etwa die 1000-fache Menge an NO im Vergleich zu den cNOS. In den Immunzellen dient das produzierte NO sowohl zur unspezifischen Erregerabwehr, als auch als Signalmolekül (Bogdan, 2001).

Argininderivate

Bislang sind drei Argininderivate beschrieben: asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA), Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA); sowie das symmetrische Dimethylarginin (SDMA). Sie entstehen physiologisch durch posttranslationale Modifikation von Proteinen und werden nach Hydrolyse der Proteine freigesetzt. Auf Grund der sehr geringen Konzentration ist der Einfluss von L-NMMA in vivo wahrscheinlich zu vernachlässigen (Böger, 2006). ADMA und L-NMMA sind kompetitive Inhibitoren aller NO-Synthasen. SDMA inhibiert die Aufnahme von L-Arginin in die Zelle (vgl. Abbildung 2).

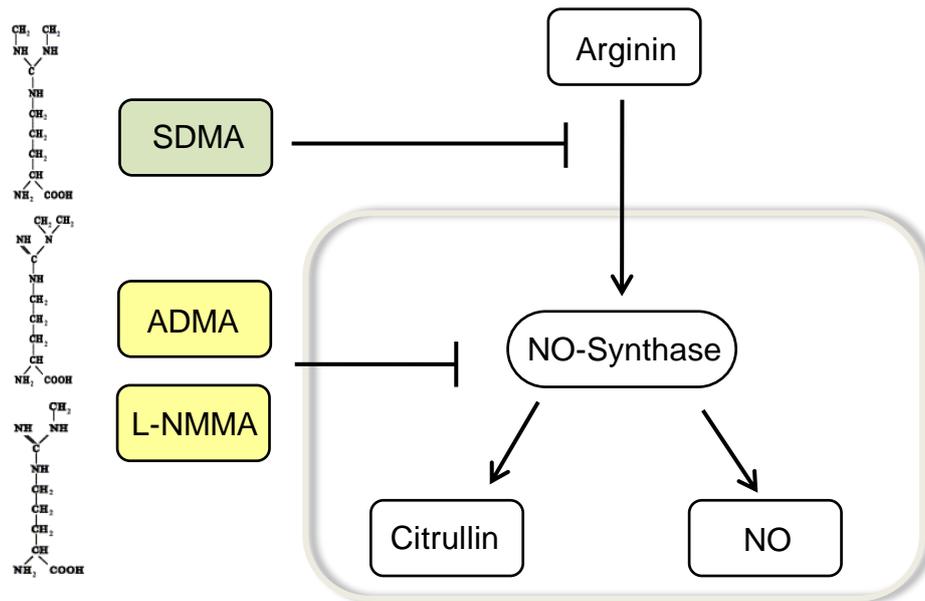


Abbildung 2: Schematische Darstellung der NO-Produktion. ADMA Asymmetrisches Dimethylarginin, L-NMMA Monomethyl-L-Arginin, SDMA Symmetrisches Dimethylarginin, eigene Darstellung, Strukturformeln aus Tran et al (2003).

Durch Hemmung der NO-Synthase wird das vasodilatative Molekül NO vermindert gebildet. ADMA hat sich in den letzten Jahren als neuer, unabhängiger kardiovaskulärer Risikofaktor erwiesen (Böger, 2006, Schulze et al., 2006, Valkonen et al., 2001). Die ADMA-Spiegel sind in vivo im Wesentlichen durch zwei Enzyme reguliert: die Protein-Arginin-Methyltransferase-Typ 1 (PRMT-1), welche ADMA produziert und die Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH), welche ADMA zu mehr als 90% abbaut (Tran et al., 2003). Oxidativer Stress führt dabei zu einer Hemmung der DDAH und Stimulation der PRMT (Sydow und Münzel, 2003).

SDMA wird hingegen von der PRMT-Typ 2 gebildet und wird vor allem renal eliminiert. Es wird deswegen als neuer Marker für die Einschätzung der Nierenfunktion diskutiert (Kielstein et al., 2006).

2.4 ADMA und Diabetes mellitus

Es ist noch nicht geklärt, ob und wie die ADMA-Spiegel mit dem diabetischen Status in Zusammenhang zu bringen sind. In einigen Studien waren die ADMA-Spiegel bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 erhöht (Sugai et al., 2007, Devangelio et al., 2007, Abbasi et al., 2001, Ito et al., 2002), in anderen erniedrigt

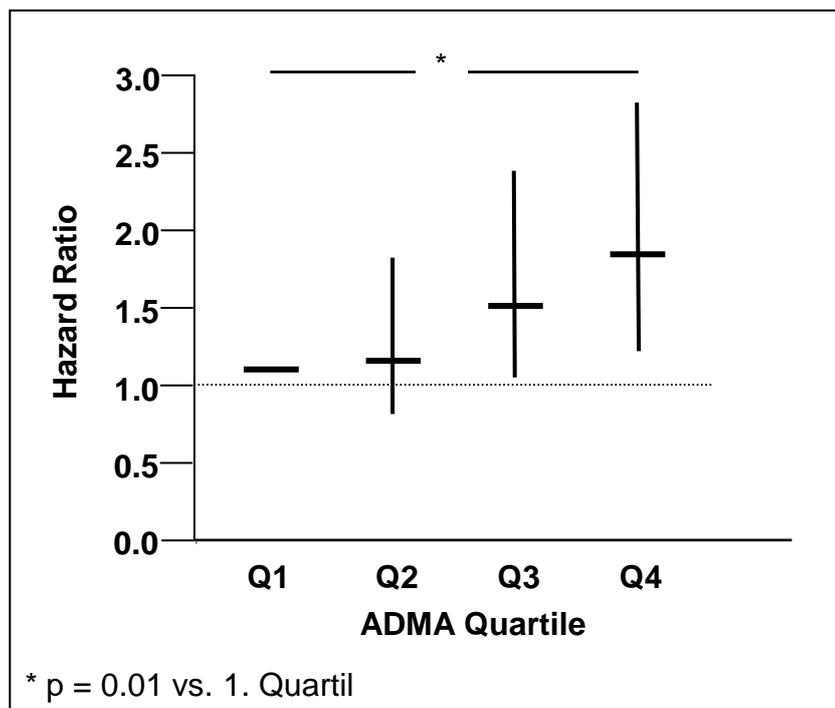
(Paiva et al., 2003) oder auch unverändert (Böger, 2006) im Vergleich zu Nicht-Diabetikern.

Die Vermutung liegt nahe, dass der diabetische Status und erhöhte ADMA-Spiegel sich als additive Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen verhalten könnten. In einigen Forschungsarbeiten zeigte sich auch ein solcher Zusammenhang. Erhöhte ADMA-Spiegel waren mit einem höherem Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse bei Patienten mit Typ 2 Diabetes mellitus (Krzyzanowska et al., 2007) und bei Typ 1 Diabetikern mit verschlechterter Nierenfunktion assoziiert (Lajer et al., 2008).

In der Framingham-Herz-Studie, einer bedeutenden epidemiologischen Studie zu kardiovaskulären Risikofaktoren, stellte sich allerdings überraschenderweise das Gegenteil heraus. Sie zeigte erhöhte ADMA-Spiegel als unabhängigen Risikofaktor für Mortalität bei Nichtdiabetikern. Erstaunlicherweise gab es keine erhöhte Mortalität bei Diabetikern (Böger et al., 2009), sondern sogar eine leichte, aber nicht signifikante Risikoreduktion mit steigenden ADMA Quartilen (vgl. Abbildung 3). Daraus ergibt sich die Frage, welche Bedeutung ADMA für den Stoffwechsel von Diabetikern hat.

Probanden ohne Diabetes mellitus (N = 2948)

A



B

Probanden mit Diabetes mellitus (N = 372)

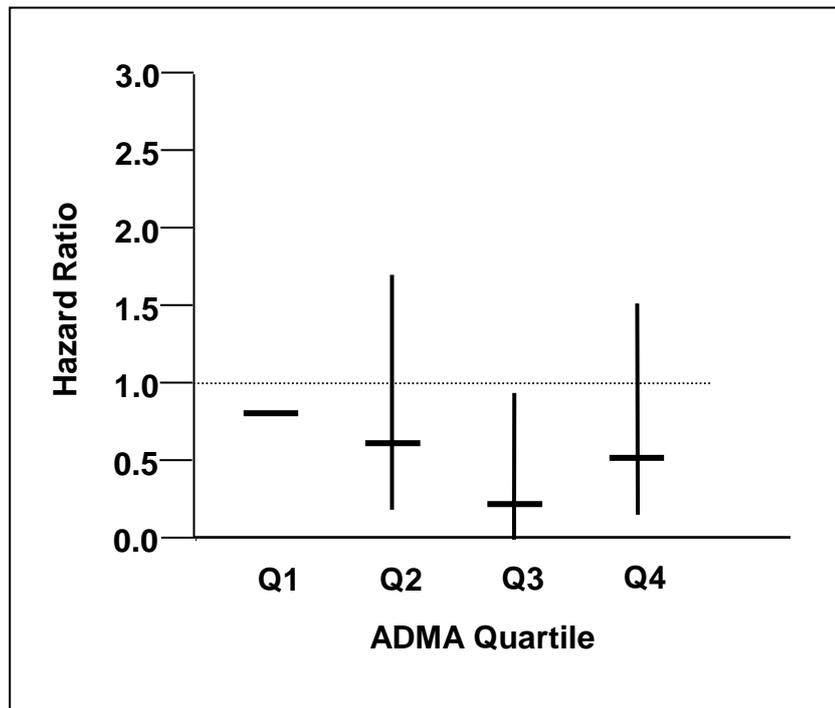


Abbildung 3: Grafische Darstellung des Hazard Ratio für Mortalität nach steigenden ADMA Quartilen. A Nicht-Diabetiker (n = 2948), B Diabetiker (n = 372), Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Anderssohn et al. (2010).

2.5 NO, Insulinresistenz, Argininderivate

Zum Einen scheinen physiologische NO-Mengen einen fördernden Einfluss auf die Glucoseaufnahme im Skelettmuskel zu haben (Balon and Nadler, 1997). Die genauen Mechanismen sind dazu noch nicht geklärt, es wird aber eine Insulin- und Kontraktions- unabhängige Signalkaskade diskutiert (Higaki et al., 2001). Shankar et al. (2000) zeigten zudem eine Insulinresistenz bei Mäusen, in denen die nNOS und die eNOS ausgeknockt wurden.

Zum Anderen kann chronischer nitrosativer oder oxidativer Stress eine Verschlechterung der Insulinsensitivität verursachen (Kaneki et al., 2007, Archuleta et al., 2009). In einigen Arbeiten konnten unter Anwesenheit von NO-Donatoren verschiedene chemische Veränderungen an Proteinen in der Insulinsignalkaskade gezeigt werden, die zu einer verminderten Antwort der Zellen auf Insulin führten. So konnte eine Nitrosylierung und damit Inaktivierung der Proteinkinase B in Gegenwart von S-Nitrosoglutathion beobachtet werden (Carvalho-Filho et al., 2005). Nomiya et al. (2004) zeigten eine durch

Peroxinitrit verursachte Nitrierung des IRS-1 und eine dadurch verminderte Insulin stimulierte 2-Deoxyglucose-Aufnahme. Es wurde zudem eine Induktion der iNOS in Muskeln von Diabetikern gefunden, welche über nitrosativen Stress eine Schädigung des Muskels, sowie Insulinresistenz auslöste (Torres et al., 2004). Eine durch ADMA vermittelte Hemmung der NO Produktion könnte daher positive Effekte für Diabetiker haben.

Andere Arbeiten zeigten, dass ADMA selbst durch Entkopplung der eNOS oxidativen Stress auslösen kann (Antoniades et al., 2009). Entkopplung bedeutet, dass das Enzym z.B. durch einen Mangel des Co-Faktors Tetrahydrobiopterin anstelle von NO Superoxid produziert (Guzik et al., 2002).

Außerdem wurde gezeigt, dass Frauen mit Gestationsdiabetes bei höheren ADMA-Spiegeln häufiger einen Typ 2 Diabetes mellitus entwickeln (Paiva et al., 2003). Zudem wurde eine Verbesserung der Insulinsensitivität bei transgenen Mäusen, die die DDAH, als ADMA-abbauendes Enzym, überexprimieren, beobachtet (Sydow et al., 2008).

Erste Zusammenhänge zwischen NO, ADMA und Insulinresistenz konnten somit gezeigt werden, auch wenn die Datenlage dazu bislang recht widersprüchlich ist. Mögliche Wege der Beeinflussung von ADMA auf die Insulinsensitivität, die die gegensätzlichen Daten erklären könnten, sollen im Folgenden zusammengefasst werden:

- Einerseits wirken physiologische NO-Konzentrationen fördernd auf die Glucoseaufnahme im Skelettmuskel. Eine ADMA vermittelte Hemmung der eNOS könnte daher zu Insulinresistenz führen (vgl. Abbildung 4 A).
- Andererseits können übermäßige Mengen an NO durch Induktion der iNOS oder die Entkopplung der eNOS nitrosativen bzw. oxidativen Stress auslösen. Dieser kann über chemische Modifikation von Proteinen zur Inaktivierung in der Insulinsignaltransduktionkaskade führen. ADMA könnte daher als kompetitiver Inhibitor aller NO-Synthasen vorteilhaft für die Insulinsensitivität sein (vgl. Abbildung 4 B).

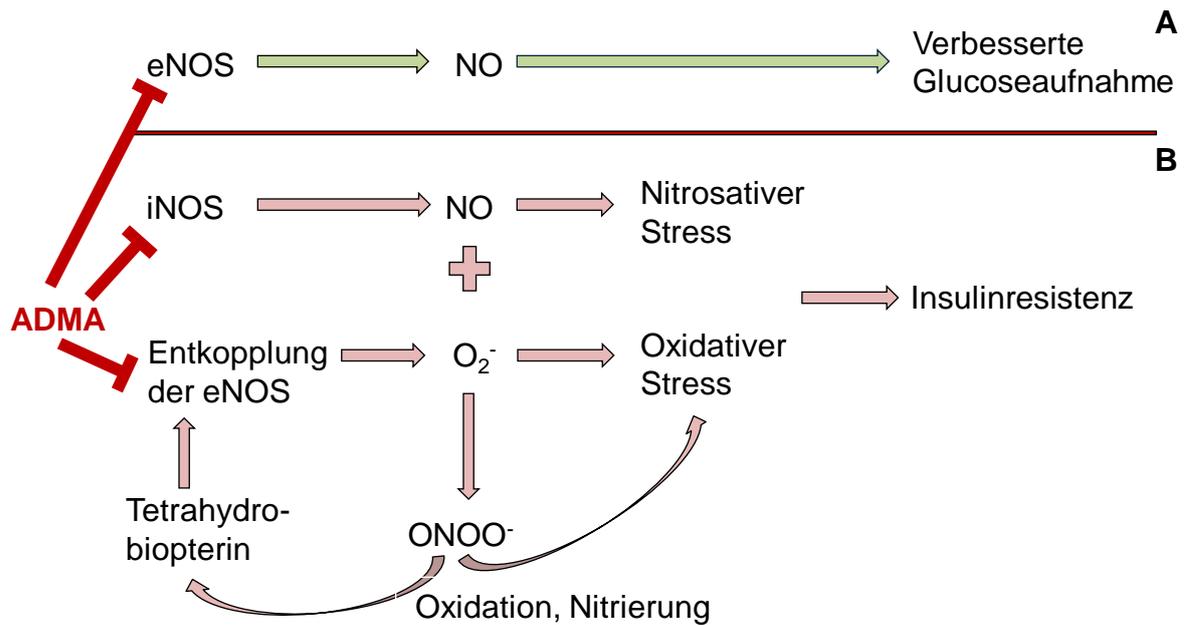


Abbildung 4: Wirkmechanismen von NO-Spezies auf die Glucoseaufnahme, eigene Darstellung.

Die Wirkung von Argininderivaten selbst auf die Insulinsensitivität wurde bisher kaum untersucht. Yang et al. konnten eine Hemmung der Glucoseaufnahme durch ADMA zeigen. Dabei verminderte sich die IRS-1 und GLUT4 Expression im Zellkulturmodell. Die Datenlage zu SDMA ist bislang sehr spärlich und umfasst vor allem epidemiologische Studien. So konnten Abhary et al. (2009) beispielsweise erhöhte Spiegel von L-Arginin, ADMA und SDMA bei Patienten mit diabetischer Retinopathie finden. Eine Modulation der Insulinsensitivität über SDMA ist über die hemmende Wirkung auf die Argininaufnahme und damit Modulation der intrazellulären NO-Produktion vorstellbar.

2.6 Zielsetzung

Aus diesen Überlegungen ergaben sich für die vorliegende Arbeit folgende Zielsetzungen:

- Es soll ein geeignetes Zellkultursystem zur Darstellung der Insulinsignaltransduktionskaskade, inklusive deren Funktionalität etabliert werden. Daher soll zunächst die Expression von wichtigen Schritten der Insulinsignalkaskade auf mRNA-/Transkriptions- und Protein-/Translationsebene untersucht werden.

Als Zielmoleküle sollen dabei IRS-1/IRS-2, die Proteinkinase B (Akt), sowie der GLUT4-Transporter dienen, da diese in vorherigen Arbeiten Veränderungen durch nitrosativen Stress zeigten und sie wichtige Schritte in der Insulinsignaltransduktionskaskade darstellen (Archuleta et al., 2009, Carvalho-Filho et al., 2005, Carvalho-Filho et al., 2006, Kaneki et al., 2007, Yang et al., 2009). Die Funktion der verwendeten Zellkultursysteme soll mittels radioaktiven 2-Deoxyglucose-Transports untersucht werden.

- Zudem soll der Einfluss der methylierten Arginine ADMA und SDMA auf die Expression der Zielmoleküle und die Insulin stimulierte Glucoseaufnahme der verwendeten Zellkultursysteme untersucht werden.
- In den verwendeten Zellen soll anschließend versucht werden, nitrosativen Stress zu erzeugen, entweder durch Zugabe von NO-Donatoren oder, wenn möglich, durch Überexpression der induzierbaren NO-Synthase in den Zellen. Zudem soll ein Assay etabliert werden, um die NO-Produktion im Zellkultursystem zu messen.

3 Methoden und Materialien

3.1 Zellkultur

Alle Zellen wurden in handelsüblichen sterilen Brutschränken bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt kultiviert. Die Kultivierung und Passagierung erfolgte unter sterilen Bedingungen einer handelsüblichen Zellkulturwerkbank. Alle Medien wurden nach Herstellung in einem 4°C Kühlschrank aufbewahrt und vor Kontakt mit den Zellen auf 37°C erwärmt. Die Zellen wurden in 25 bzw. 75 cm²-Zellkulturflaschen oder in 6-Well-Platten kultiviert und in 6-Well- oder 12-Well-Platten differenziert.

3.1.1 L6 Myozyten (*Rattus norvegicus*)

L6 Myozyten sind eine etablierte Zelllinie, die von Yaffe 1968 entwickelt wurde. Es sind embryonale Rattenmuskelzellen, die durch klonale Selektion eine hohe Tendenz zur Konfluenz und damit zur Ausbildung so genannter Myotuben haben. Myotuben sind Synzytien, geben also ihre Zellautorität auf und schließen sich zu funktionellen Einheiten zusammen (Yaffe, 1968). Für die Versuche wurden uns freundlicherweise Vials dieser Zellen von PD Dr. Karim Sultan, ehemals Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie Universitätsklinikum Eppendorf, überlassen.

Die Zellen wurden in einem High Glucose Medium (DMEM+GlutaMAXTM-I 4,5 g/l D-Glucose) mit 10% fetalem Kälberserum (FCS, Fa. Invitrogen) + 1% Penicillin/Streptomycin (P/S, Fa. Invitrogen) kultiviert bis sie zu ca. 60-70% konfluent waren. Daraufhin wurden sie mit warmer Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und dann mit Hilfe von Trypsin/Ethylendiamintetraacetat (EDTA) (Fa. Invitrogen) von der Oberfläche abgelöst und zu circa 150.000 Zellen pro Well in 6-Well-Platten ausgesät. Die Zellzahl wurde mikroskopisch mittels Neubauer-Zählkammer (Fa. Hecht) bestimmt. Am Folgetag, wenn ca. 90% Konfluenz erreicht wurden, wurde das Medium auf DMEM+GlutaMAXTM-I (1 g/l D-Glucose) + 2% Horse Serum (Fa. Invitrogen) umgestellt. Dies stellte das sogenannte Differenzierungsmedium dar, worunter sich die Zellen streckten und zu Synzytien zusammenschlossen. Die ersten beiden Tage nach Differenzierungsbeginn wurde das Medium unter kräftigem Abschlagen der toten Zellen täglich, danach jeden zweiten Tag gewechselt. Am sechsten Tag wurden die Zellen mit der zu untersuchenden

Substanz für 24 Stunden inkubiert. Danach wurden die Myozyten für drei Stunden mit Hungermedium (DMEM+GlutaMAXTM-I 1 g/l Glucose ohne Zusätze) versetzt und gegebenenfalls anschließend für eine weitere halbe Stunde mit 1 µg/ml (170nM) Insulin stimuliert. Anschließend wurden die jeweiligen Proben gewonnen oder Versuche durchgeführt.

3.1.2 3T3-L1-Adipozyten (Mus musculus)

Als zweite Insulin sensible Zellkultur wurden 3T3-L1-Zellen gewählt, die ebenfalls fibroblastischen Ursprungs sind und zu Adipozyten differenzieren (Green and Meuth, 1974). Vials dieser Zellen wurden uns für unsere Versuche freundlicherweise von Dr. Ludger Scheja, Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie, überlassen.

Die Adipozyten wurden ebenfalls in einem High Glucose Medium (DMEM+GlutaMAXTM-I 4,5 g/l Glucose) mit 10% Calf Serum (CS), 1% P/S und 1% 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES, Fa. Invitrogen) kultiviert (vgl. Tabelle 1). Zum Erhalt ihrer Differenzierungsfähigkeit wurden sie so passagiert, dass sie maximal 60%ige Konfluenz erreichten. Des Weiteren wurden sie nur bis zur 15. Passage verwendet.

Tabelle 1: Kulturmedien für die 3T3-L1-Zellen

Kulturmedium	Differenzierungsmedium
DMEM+GlutaMAX TM -I 4,5 g/l Glucose	
10% CS	10% FCS
1% HEPES	1% HEPES
1% P/S	1% P/S

Für die Versuche wurden die Zellen in 12-Well- oder 6-Well-Platten gesät. Nach etwa zwei Tagen post Konfluenz, wurde auf Differenzierungsmedium + 1,25 µM Dexamethason + 250 µM 3-Isobutyl-2-methylxanthin (IBMX, Fa. Invitrogen, Darmstadt) + 1 µg/ml (170 nM) Insulin umgestellt. Weitere drei Tage später wurde die Nährlösung zu dem Differenzierungsmedium + 1 µg/ml (170 nM) Insulin verändert. Für die letzten vier Tage wurden sie ohne weitere Zusätze im Differenzierungsmedium inkubiert. In dieses Medium wurden die zu untersuchenden Substanzen für 24 Stunden gegeben. Anschließend wurden die Zellen für drei Stunden mit dem Hungermedium versetzt und gegebenenfalls für

30 Minuten mit 1 µg/ml (170 nM) Insulin stimuliert, um danach die jeweiligen Proben zu gewinnen.

3.2 Transfektion: Turbofect®

Turbofect® (Fa. Fermentas, St. Leon Rot) ist ein kationisches Polymer, das sich mit der vektorialen cDNA verbindet und über das endo-/lysosomale System in die Zelle gelangt. Die chemischen Eigenschaften des *Turbofect*®-Reagenz sorgen dafür, dass massiv H⁺-Ionen akkumulieren und die Endosomen durch den folgenden osmotischen Wassereinstrom platzen. Der Vektor befindet sich dadurch frei im Zytosol und kann anschließend leicht in den Kern gelangen.

Die Zellen wurden für die Transfektion in 6-Well-Platten ausgesät und für einen Tag ruhen gelassen, bis sie circa zu 30-40% konfluent wurden. Am Folgetag wurde frisches Kulturmedium (DMEM+GlutaMAXTM-I 4,5 g/l Glucose + 10% FCS oder 10% CS, je nach Zelllinie) ohne antibiotischen Zusatz auf die Zellen gegeben. Hergestellt wurde ein Mix aus 200 µl reinem Medium (DMEM+GlutaMAXTM-I 4,5 g/l Glucose), 2 µg DNA und 4 µl *Turbofect*® Reagenz. Dieser wurde für etwa 40 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die hergestellte Mixtur tröpfchenweise in das Well auf die Zellen gegeben und 5 Minuten auf den Rüttler bei 150 rpm und 37°C platziert. Die Transfektionsdauer betrug 48 Stunden, dann wurden die Zellen mit frischem Medium gefüttert. Selektioniert wurden die Zellen über eine im Vektor enthaltene Geneticinresistenz (vgl. Abbildung 5). Der Transfektionserfolg wurde mit Polymerase Kettenreaktion (PCR) und Western Blot überprüft. Der Vektor wurde uns freundlicherweise von Dr. Richard Shapiro, University of Pittsburgh zur Verfügung gestellt.

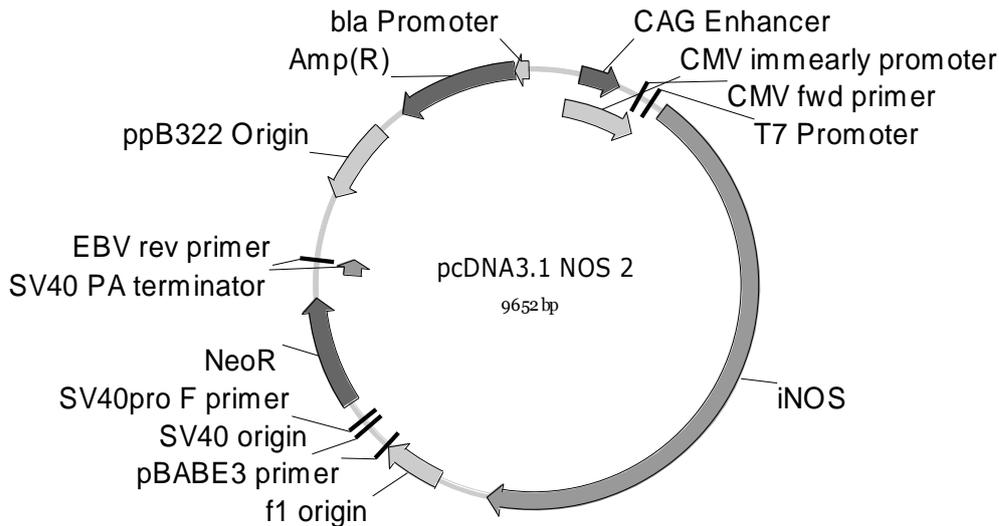


Abbildung 5: Vektorkarte des pcDNA3.1 iNOS-Vektors mit integrierter Neomycin/ Geneticin-Resistenz-Kassette (NeoR), Abbildung mit Vector NTI® Software (Fa. Invitrogen).

3.3 Western Blot

3.3.1 Proteingewinnung

Die gesamte Proteingewinnung wurde auf Eis durchgeführt, um ein Denaturieren der Proteine zu vermeiden. Zunächst wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Pro Well wurden 80 μ l Lysispuffer (+ Proteaseinhibitor 1:1.000, Zusammensetzung des Lysispuffers vgl. Tabelle 2) hinzugegeben, mit einem Zellschaber abgelöst und in 1,5 ml Eppendorf Tubes überführt. Diese Suspension aus Zellen und Lysispuffer wurde daraufhin mit einer 1 ml-Spritze und einer 27''G-Kanüle fünfmal hoch- und runtergezogen und dann bei 12.000 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Am Boden der Tubes bildete sich dadurch ein Pellet mit allen übrigen Zellbestandteilen. Die Proteine befanden sich in der Lösung, wurden aliquotiert, und bei -80°C eingefroren.

Tabelle 2: Zusammensetzung des Lysispuffers zur Proteingewinnung

Triton X 100	0,5%
Nonidet P 40	0,5%
Tris pH 7,5	10 mM
KCl	2,5 mM
NaCl	150 mM
b-Glycerolphosphat	30 mM
NaF	50 mM
Na ₃ VO ₄	1 mM

3.3.2 Proteinkonzentration

Die Konzentrationsbestimmung der Proteine erfolgte mit dem *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (Fa. Bio-Rad GmbH, München) nach Bradford. Die Methode beruht auf der Komplexbildung des Triphenylmethanfarbstoffes Coomassie-Brilliant-Blau G-250 (CBBG) mit basischen und aromatischen Aminogruppen der Proteine. Diese Reaktion führt zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des roten, ungebundenen Bradford-Reagenz von 470 nm zu 595 nm des blauen, komplexierten Farbstoffes. Folglich ist die Zunahme der Absorption bei 595 nm ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Zur Bestimmung wurde eine Standardkurve mit Immunglobulin G (IgG) in den Konzentrationen 3,45, 6,90, 10,35, 13,8 µg/ml und ein Leerwert (800 µl *Aqua ad iniectabilia* plus 200 µl Bradford-Reagenz) angefertigt. In eine Photometerküvette wurde 790 µl *Aqua ad iniectabilia*, 10 µl Standard (IgG) bzw. Probe und 200 µl Bradford-Reagenz gegeben und mit einem Plastikspatel gut durchmischt. Nach 15-minütiger Inkubation erfolgte die Messung bei 595 nm im Photometer Smart Spec 3000 (Fa. Bio-Rad GmbH, München).

3.3.3 SDS PAGE

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mit Hilfe eines SDS-PAGE (*sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese). Die negativ geladenen SDS-Protein-Komplexe wandern dabei während der Elektrophorese zum Plus-Pol und werden durch Siebeffekte der porösen Polyacrylamidmatrix ihrem Molekulargewicht nach aufgetrennt. Das Polyacrylamid-Gel bestand aus einem 10%igen Trenn- und einem 4%igen Sammelgel (vgl. Tabelle 3). Bei beiden Gelen wurden zunächst die entsprechenden Mengen Bis-Acrylamid, Wasser, Tris-Puffer und SDS

zusammengefügt und nach kurzem Rühren die Polymerisationsstarter Ammoniumpersulfat (APS) und Tetramethylethyldiamin (TEMED) hinzugegeben. Zuerst wurde das Trenngel hergestellt und unmittelbar im noch flüssigen Zustand in die Gelkammern gegossen. Zum Schutz vor Austrocknung wurde es mit etwa 1 ml Isopropanol überschichtet und für etwa eine Stunde ruhen gelassen. Danach wurde das Isopropanol abgegossen und das polymerisierte Trenngel mit dem frisch hergestellten Sammelgel überschichtet. In dieses wurde im flüssigen Zustand zügig ein 10-Taschen-Gelkamm von Bio-Rad eingesetzt. Das Sammelgel brauchte etwa 30 Minuten zum Polymerisieren.

Tabelle 3: Zusammensetzung der Gele

	Sammelgel (4%)	Trenngel (10%)
Bis Acrylamid 40%ig	0,6 ml	2,53 ml
Aqua ad iniectibilia	3,8 ml	5,48 ml
Upper Tris 2 M (pH 8,8)		2,0 ml
Lower Tris 0,5 M (pH 6,8)	1,6 ml	
SDS 20%	30 µl	50 µl
Während des Rührens:		
10% APS- Lösung	30 µl	50 µl
TEMED	3 µl	5 µl

Die Proteinproben wurden auf Eis aufgetaut. Zur Auflösung der Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturen trug die Denaturierung der Proteine bei 95°C für 5 Minuten, das SDS und das im Lämmli-Puffer enthaltene β -Mercaptoethanol bei. Es wurde 50 µg Protein mit Wasser auf 10 µl Volumen aufgefüllt und mit 10 µl Lämmli-Puffer (mit 5% β -Mercaptoethanol) versetzt. Nach gutem Mischen und kurzer Zentrifugation (12.000 g) wurden die Lösungen für fünf Minuten auf 95°C erhitzt und dann wieder auf Eis überführt. Währenddessen wurden die Gele senkrecht in eine dafür vorgesehene Gelkammer eingesetzt und mit etwa einem Liter Laufpuffer (vgl. Tabelle 4) aufgefüllt. Nach einer weiteren Zentrifugation für drei Minuten bei 12.000 g wurden die Taschen des Gels vorsichtig mit 20 µl Lämmli-Puffer-Protein-Gemisch gefüllt. Das Gel lief etwa 15 Minuten bei 80 V und etwa eine Stunde bei 130 V. Als Molekulargewicht Standard lief in einer Tasche ein *Precision Plus Protein Standard*® Ladder (Fa. Bio-Rad) mit.

Tabelle 4: Herstellung des Laufpuffers

Tris	15 g
Glycin	72 g
SDS (20%)	25 ml

→ ad 1 l destilliertes Wasser (Aqua dest.)

→ Gebrauchspuffer: 200 ml 5x Laufpuffer + 800 ml Aqua dest.

3.3.4 Blotten der Proteine

Nach vorsichtigem Ablösen des Gels von den Glasplatten und Abtrennen des Sammelgels wurden die Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran nach dem Prinzip des biochemischen Blottens übertragen. Die verwendeten Membranen haben eine Porengröße von 0,45 µm, sind hydrophob und besitzen eine hohe Proteinbindungskapazität. Der Transfer-Puffer enthielt zur Aktivierung der Bindungsstellen der Nitrocellulosemembran 10% Methanol. Vor dem Transfer der Proteine wurden die Filterpapiere (Fa. Whatman), die Membran und die Schwämme für 5 Minuten im Puffer äquilibriert. Anschließend wurde das Gel und die Membran zwischen je zwei Lagen Filterpapier und einen Schwamm gelegt und vorsichtig in einen Halter eingespannt. In der Zwischenzeit wurde der Stapel immer wieder vorsichtig glatt gestrichen, um Luftblasen zu entfernen. Der Transfer-Stapel und ein Kühlakkumulator wurden in die Blotkammer eingesetzt und die Kammer mit kaltem Transferpuffer (vgl. Tabelle 5) aufgefüllt. Der Transfer erfolgte bei 100 V für 1,5 Stunden. Nach der Hälfte der Blotting-Zeit wurde der Kühlakkumulator gewechselt.

Tabelle 5: Zusammensetzung des Transferpuffers für den Western Blot

Glycin	144,2 g
Tris	30,3 g
20 % SDS	10 ml

→ad 1 l Aqua dest.

→Gebrauchspuffer: 100 ml Methanol + 100 ml 10x Puffer ad 1 l Aqua dest.

Um zu überprüfen, ob die Proteine gleichmäßig auf die Membran geblottet wurden, erfolgte eine unspezifische Proteinfärbung mit Ponceaurot, dessen Nachweisgrenze schon bei etwa 50 ng Protein pro Bande liegt. Nach 10-minütiger Inkubation mit Ponceau wurde die Membran mehrfach mit destilliertem Wasser gewaschen und mit dem ChemiGenius² Bioimaging System (Fa. Syngene) fotografiert. Die Membran wurde anschließend nach der Höhe der gesuchten

Banden mit einem Skalpell geschnitten. Zur Entfernung des Farbstoffes wurde die Membran für 5 Minuten mit TBS-T (Tris Buffered Saline, Tween, vgl. Tabelle 6) gewaschen.

Tabelle 6: Zusammensetzung von TBS, 10x und TBS-T

TBS, 10X

Tris/Trizma® Base	24,2 g (0,2 M)
NaCl	80 g (1,37 M)

→ ad 1 l Aqua dest.

TBS-T

TBS 10X	100 ml
Tween	1 ml

→ad 1 l Aqua dest.

Nach ca. einstündigem Blocken der unspezifischen Proteinbindungsstellen mit 5%iger TBS-T-Milch bei Raumtemperatur wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit dem ersten Antikörper (vgl. Tabelle 7) inkubiert. Als Ladungskontrollen dienten GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) und eIF4e (*Eukaryotic Initiation Factor 4E*), als so genannte Housekeeping Gene. Diese werden konstitutiv und unabhängig von der Stimulation der Zellen im gleichen Maße exprimiert.

Tabelle 7: 1. Antikörper für die Western Blot Analyse

1. Antikörper	Molekulargewicht	Verdünnung	Spezies
Akt	60 kDa	1:1000 TBS-T + 5% Milch	Mouse
GAPDH	37 kDa	1:2000 TBS-T + 5% Milch	Rabbit
GLUT4	55 kDa	1:200 TBS-T + 5% Milch	Mouse
GLUT4	50 – 63 kDa	1:100 TBS-T + 5% Milch	Rabbit
PathScan® Multiplex Western Cocktail	Phospho-p90RSK 90 kDa Phospho-Akt 60 kDa Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) 42, 44 kDa Phospho-S6 32 kDa eIF4E 25 kDa	1:200 TBS-T + 5% BSA	Rabbit
iNOS	130 kDa	1:200 TBS-T + 5% Milch	Rabbit
IRS-1	180 kDa	1:1000 TBS-T + 5% BSA	Rabbit
IRS-2	185 kDa	1:1000 TBS-T + 5% BSA	Rabbit

Am nächsten Morgen wurden die Membranen dreimal für zehn Minuten mit TBS-T gewaschen, um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Danach wurde der Blot mit dem 2. Antikörper (vgl. Tabelle 8) für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die zweiten Antikörper waren mit der Meerrettichperoxidase (Horseradish peroxidase, HRP) konjugiert, was eine Detektion der einzelnen Targets via Chemilumineszenzreaktion von Luminol ermöglichte.

Tabelle 8: 2. Antikörper für die Western Blot Analyse

2. Antikörper	Verdünnung	Spezies
Anti-Rabbit-HRP	1:2000 TBS-T + 1% Milch	Goat
Anti-Mouse-HRP	1:2000 TBS-T + 1% Milch	Donkey

Anschließend wurde der Blot wiederum 2 x 15 Minuten mit TBS-T und einmal 15 Minuten mit TBS gewaschen. Die Färbung des Blots erfolgte mit dem

SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate[®] (Fa. ThermoScientific). Kurz vor Gebrauch wurde etwa 1 ml Färbelösung durch Mischung der beiden Lösungen des Kits im Verhältnis 1:1 hergestellt. Die Membran wurde gleichmäßig damit benetzt, drei Minuten inkubiert und dann vorsichtig, unter Vermeidung von Luftblasen, zwischen zwei Folien gelegt. Der HRP-konjugierte 2. Antikörper katalysierte unter Belichtung die Oxidation des Luminol der Färbelösung und startete damit eine Chemilumineszenzreaktion, die mit dem ChemiGenius² Bioimaging System (Fa. Syngene) detektiert wurde. Die Belichtungszeit lag zwischen 30 Sekunden und 15 Minuten.

3.4 RNA Aufbereitung

3.4.1 RNA-Gewinnung

Die RNA-Gewinnung wurde auf Eis, unter dem Abzug und unter möglichst reinen Bedingungen durchgeführt, um eine Degradierung der RNA durch ubiquitär vorkommende Ribonucleasen (RNasen) zu vermeiden. Zunächst wurde, wie bei der Proteingewinnung, das Medium abgesaugt und anschließend die Wells unter sterilen Zellkulturbedingungen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen.

Die 6-Well-Platten wurden dann sofort auf Eis überführt und mit 800 µl *RNAzo*[®] B (Fa. WAK-Chemie Medical) pro Well benetzt. Durch das enthaltene Guanidinthiocyanat wurden die Zellen lysiert. Anschließend wurden die Wells gründlich mit einem Zellschaber abgeschabt und der Überstand in 2-ml-Tube überführt. Nach gründlichem Vortexen (30 Sekunden) wurden pro Tube 200 µl Chloroform hinzugegeben und wiederum gründlich für 30 Sekunden gevortext. Nach 15-minütigem Ruhen wurde das Chloroform-*RNAzo*[®] B-Gemisch für 15 Minuten bei 4°C und 12.000 g zentrifugiert. Dadurch kam es zu einer Trennung in drei Phasen: eine wässrige, obere Phase mit RNA, eine weißliche Interphase und eine untere, blaue, organische Phase, die DNA und Proteine enthielt. Die obere wässrige RNA-Lösung wurde vorsichtig, ohne die anderen Phasen zu berühren, in vorher mit 1 ml Propanol vorbereitete, 2-ml-Tubes pipettiert. Nach gründlichem Vortexen wurden die Tubes für mindestens eine Stunde im Gefrierschrank bei -20 °C aufbewahrt, um die RNA auszufällen. Danach wurden sie bei 4°C und 12.000 g für 30 Minuten zentrifugiert. Es bildete sich ein weißes Pellet am Boden und der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und verworfen.

Das Pellet wurde daraufhin mit 200 µl 70%igem Ethanol gründlich gewaschen. Nach weiteren 15 Minuten Zentrifugieren (12.000 g) in der auf 4°C gekühlten Zentrifuge wurde der Überstand (das Ethanol) vorsichtig abgesaugt und die Tubes vorsichtig, ohne das RNA-Pellet zu berühren, mit einem Wattestäbchen trocken gewischt. Nach circa einer Minute, nachdem das restliche Ethanol verdampft war, wurde das Pellet in 20 µl DEPC-Wasser resuspendiert. Danach erfolgten die Konzentrationsbestimmung und eine photometrische Abschätzung der Reinheit im NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Fa. ThermoScientific) bei einer Wellenlänge von 260 nm. Eine optische Dichte (OD) von 1 entsprach einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Bei einem OD₂₆₀/OD₂₈₀-Quotienten von 1,8 - 2,1 wurde die RNA als rein angesehen. Zusätzlich wurde dies durch Auftragen auf ein 1%iges Agarosegel überprüft. Bei intakter RNA wurden die 28S rRNA-Untereinheit und die 18S rRNA-Untereinheit, als zwei deutliche Banden sichtbar. Die isolierte RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.4.2 DNase-Verdau

Um einen weiteren Reinigungsschritt der RNA durchzuführen, wurde ein DNase-Verdau durchgeführt. Dazu wurde folgender Ansatz hergestellt (vgl. Tabelle 9):

Tabelle 9: Ansatz DNase-Verdau

RNA	4 µg
10 x Puffer mit MgCl ₂	2 µl
DNase I, RNase free®	2 µl (2 U)
Aqua ad iniectibilia	auf 20 µl auffüllen

Dieser Ansatz wurde nach gutem Durchmischen für 30 Minuten bei 37°C inkubiert, wodurch die gesamte genomische DNA verdaut werden sollte. Anschließend wurde 1 µl 25 mM EDTA hinzugeben, kurz gemischt und für 10 Minuten auf 65°C erhitzt. EDTA diente dabei als Chelator für das Mg²⁺, welches der Cofaktor für die DNase war. Durch diese Chelierung und das Erhitzen wurde das Enzym wieder inaktiviert. Anschließend wurde die Konzentration der RNA erneut photometrisch gemessen und die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

3.4.3 Umschreiben der RNA in cDNA

Die gesamte RNA wurde für die weiteren Analysen in cDNA umgeschrieben. Verwendet wurde ein *RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* (Fa.

Fermentas, St. Leon Rot). Zu 1 µg RNA wurden 1 µl *Random Hexamer Primer* hinzugegeben und auf 12 µl mit DEPC-Wasser aufgefüllt. Ein Master Mix (vgl. Tabelle 10) wurde angesetzt und 8 µl zu jeder Probe hinzugegeben.

Tabelle 10: Master Mix zum Umschreiben von RNA in cDNA

5x Reaction Buffer	4 µl
RiboLoc RNase Inhibitor (20 U/µl)	1 µl
10 mM dNTP Mix	2 µl
RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (200 U/µl)	1 µl

In einem PCR Gerät Mastercycler epgradient® (Fa. Eppendorf) wurden die Proben zunächst für fünf Minuten bei 25°C inkubiert, um dann für 60 Minuten auf 42 °C erhitzt zu werden. Dies stellte die optimale Arbeitstemperatur für die Reverse Transkriptase dar. Um die Reaktion zu beenden, also das Enzym abzulösen, wurden die Reaktionsgefäße auf 70°C erhitzt. Bis zur weiteren Verwendung wurde die cDNA bei -20°C gelagert.

3.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Standardmethode der Molekularbiologie zur Vervielfachung von DNA-Bereichen. Dazu werden eine thermostabile DNA-Polymerase, die zu vervielfältigende DNA (sog. template), sequenzspezifische Oligonucleotid-Primer, ein Puffer und Desoxynucleotidtriphosphate (dNTPs) benötigt. Ein PCR-Programm besteht immer aus folgenden drei Schritten:

- Auftrennung des DNA-Doppelstranges in zwei Einzelstränge (Denaturierung),
- Hybridisierung der Oligonucleotidprimer an die einzelsträngige Template-DNA (Annealing) und
- Verlängerung der DNA Stücke durch die Polymerase (Elongation).

Pro Zyklus wird die Zahl der Template-DNA verdoppelt, was bei durchschnittlich 25-40 durchgeführten Zyklen zu einer exponentiellen Synthese der Template-DNA führt.

3.5.1 Primer Design und Qualitative PCR

Primer Design

Zum Design der einzelnen Primer wurde die Sequenz für die jeweilige Spezies in der Genbank durchsucht. Mit Hilfe des PrimerBLAST® Programms von NCBI (National Center for Biotechnology Information) wurden geeignete Primer nach dem Protokoll von Ye et al. (2012) entworfen (vgl. Tabelle 11 und Tabelle 12). Ziel war es, dabei möglichst kleine PCR-Produkte zu erzielen und in dem gewählten Primer Paar ein sogenanntes Exon-Exon-spanning zu erreichen. Existiert ein solches in dem gewählten Primer-Paar kann dieses nur an cDNA, nicht an genomische DNA binden und somit wird auch nur die cDNA amplifiziert. Es wurde ein Primer in 5'-3' Richtung (Forward Primer, For) und einer in 3'-5' Richtung (Reverse Primer, Rev) designt. Als Referenzgen diente wiederum die GAPDH. Als Differenzierungsmarker wurde nach Literaturrecherche für die L6 Myozyten die Creatinkinase-muscle (CK-M) (Caravatti et al., 1979) und für die 3T3-L1 Zellen das Fatty Acid Binding Protein (FABP4) verwendet (Sadowski et al., 1992). Diese Marker sind spezifisch für den Zelltyp und werden erst nach erfolgter Differenzierung exprimiert.

Tabelle 11: Designte Primer für die PCR-Analyse der Insulinsignaltransduktionskaskade in den L6 Zellen (rattus norvegicus)

Primer (rattus norvegicus)		Sequenz (5' → 3')	Referenz (NCBI)	PCR-Produkt-Größe [bp]
Akt	For	ATT GTG AAG GAG GGC TGG CTG CA	NM_033230.1	170
	Rev	CTG ACA TTG TGC CAC TGA GAA GTT GT		
CK-M	For	CCG CAG CAT CAA GGG CTA CAC TCT	NM_012530.1	153
	Rev	TGC TGC TCC TGC TCT GTC ATG CT		
GAPDH	For	GGG CTC TCT GCT CCT CCC TGT T	NM_017008.3	94
	Rev	TTC ACA CCG ACC TTC ACC ATC TTG T		
GLUT1	For	GAT TGG CCT AGT GCC TGA GGG T	NM_138827.1	90
	Rev	GGC CAA AGG TCC AGC CCT ACA GA		
GLUT4	For	TCG GGT TTC CAG CAG ATC GGC T	NM_012751.1	141
	Rev	CTG TGG GGCGTTGATGACTCCA		
IRS-1	For	GGA GCC AGA GGA GGG TGC CA	NM_012969.1	191
	Rev	GCA GAT GGG GCT GCA AGG CA		
IRS-2	For	CAG CTG TCT TCC TGC TTC CAT TGC T	NM_001168633 .1	91
	Rev	TCT CGC AGG GTG GGG GTC AAT T		

Fa. Eurofins MWG Operon, Ebersberg

Tabelle 12: Designte Primer für die PCR-Analyse der Insulinsignaltransduktionskaskade in den 3T3-L1-Zellen (Mus musculus)

Primer (Mus musculus)		Sequenz (5' → 3')	Referenz (NCBI)	PCR-Produkt-Größe [bp]
Akt	For	TCG TCG CCA AGG ATG AGG TTG C	NM_0011658 94.1	168
	Rev	GCT CGC CCC CGT TGG CAT AC		
ABP4	For	AGA AGT GGG AGT GGG CTT TGC CA	NM_024406.2	178
	Rev	CAC CTT CCT GTC GTC TGC GGT G		
GAPDH	For	CCG GGG CTG GCA TTG CTC TC	NM_008084.2	141
	Rev	GGG GTG GGT GGT CCA GGG TT		
GLUT1	For	ACT GGT GTC ATC AAC GCC CCC	NM_011400.3	197
	Rev	GAG TTC CGC CTG CCA AAG CGA T		
GLUT4	For	TCC GGT TCC GTG GGT TGT GG	NM_009204.2	197
	Rev	TCC CCA TCG TCA GAG CCG ATC TG		
IRS-1	For	CTT CTT CAT CGA GGT GGG GCG TTC	NM_010570.4	147
	Rev	TTG CTG CGA GGG CGA AAC TCA T		
IRS-2	For	CAT CAA CAA GCG CGC GGA CG	NM_0010812 12.1	127
	Rev	CAA GTC GGT GAG TGC GCG GT		

Fa. Eurofins MWG Operon, Ebersberg

Qualitative PCR

Zur Austestung der verschiedenen Primer, die für spätere quantitative Analysen designt wurden, wurde zunächst eine klassische, qualitative PCR durchgeführt. Es wurde eine *Taq DNA Polymerase*® mit dem mitgelieferten Standard *Taq Reaction Puffer*® (Fa. New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.) verwendet und folgender Master Mix zusammengefügt (vgl. Tabelle 13).

Tabelle 13: Master Mix für eine qualitative PCR

10X Standard Taq Reaction Puffer®	2 µl
Magnesiumchlorid (25 mM MgCl ₂)	2 µl
Aqua ad iniectibilia	9,8 µl
Forward Primer	200 nM
Reverse Primer	200 nM
dNTP (10 mM)	1 µl
Taq DNA Polymerase® (5000 U/ml)	0,2 µl

Zu diesem Ansatz wurde je 1 µl der cDNA hinzugefügt, kurz gevortext und dann in ein PCR Gerät Mastercycler epgradient® (Fa. Eppendorf) gegeben. Mit diesem Gerät war es möglich, Temperaturgradienten auszutesten, um optimale Bedingungen für das Primerannealing zu erzielen (vgl. Tabelle 14). Die PCR-Produkte wurden dann auf 2%ige TBE-Gele (Tris-Borat-EDTA) aufgetragen und mit Hilfe es ChemiGenius² Bioimaging Systems (Fa. Syngene, USA) fotografiert. Dieser Schritt diente zur Kontrolle, ob die errechneten PCR-Produkte entstehen.

Tabelle 14: Temperaturprogramm einer qualitativen PCR

	Temperatur	Dauer	
Initiale Denaturierung	94 °C	4 min	
Denaturierung	94 °C	15 sec	35 Zyklen
Annealing	60 – 66 °C	15 sec	
Elongation	72 °C	30 sec	
Terminale Elongation	72 °C	4 min	
Cooling Down	4 °C		

3.5.2 Quantitative PCR-Methoden (qPCR)

SYBR Green Real-Time-qPCR

Die SYBR Green Real-Time-qPCR ist eine einfache Methode zur Quantifizierung der spezifischen, zuvor in cDNA umgeschriebenen Targets der Zellen. Dies wird durch die Verwendung von fluoreszierenden Farbstoffen ermöglicht, die in doppelsträngige DNA interkalieren. Das Prinzip beruht darauf, dass die Fluoreszenz dieser Stoffe mit der Amplifikation der Target-DNA exponentiell ansteigt. Insgesamt wurden 40 PCR-Zyklen durchgeführt. Der C_T-Wert oder Threshold Cycle beschreibt dabei den Zyklus, bei dem die Fluoreszenz exponentiell ansteigt und erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Für die Analyse wurde ein Mastermix hergestellt, der in eine 384-Well-Platte vorgelegt wurde (vgl. Tabelle 15). Anschließend wurden je 200 nM der

verdünnten cDNA hinzugegeben. Eine Wasserprobe wurde, um eventuelle Verunreinigungen auszuschließen, fortlaufend parallel durchgeführt. Zudem wurden immer Doppelbestimmungen jeder Probe gemacht.

Tabelle 15: Mastermix für die Sybr® Green qPCR

Maxima™ SYBR Green/ROX Master Mix	5 µl
Forward Primer	50 nM
Reverse Primer	50 nM
Aqua ad iniectabilia	2 µl

Die Messung und Quantifizierung der PCR wurde in einem Thermocycler Abi Prism® 7900HT Sequence Detection System (Fa. Applied Biosystems Inc, Foster City) nach dem vom Hersteller empfohlenen Programm (vgl. Tabelle 16) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der dazugehörigen ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System Software, Version 2.2.

Tabelle 16: Temperaturprogramm einer SYBR Green Real-Time-qPCR

	Temperatur	Dauer	
	50 °C	2 min.	
	95 °C	10 min.	
Denaturierung	95 °C	15 sek.	40 Zyklen
Annealing / Elongation	60 °C	1 min.	
Schmelzkurvenanalyse	50 → 95 °C		

Ausgewertet wurden die Ergebnisse mit Hilfe der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode. Als Housekeeping Gen diente wiederum die GAPDH. Durch Subtraktion der C_T -Werte des Zielgens vom Referenzgen wurde die relative Expression, also das ΔC_T bestimmt. Für jeden Versuch wurden immer drei Proben unstimulierter Zellen als Kontrolle angefertigt. Nach Subtraktion der ΔC_T -Werte der stimulierten Zellen von denen der Kontrolle konnten die $\Delta\Delta C_T$ -Werte und damit die veränderte Expression der Zielgene, durch Stimulation mit der Testsubstanz bestimmt werden.

Um Primerdimere auszuschließen, die ebenfalls ein Signal geben würden, wurde im Anschluss an die RT-qPCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Dafür wird die Temperatur langsam von 50 auf 95 °C erhöht, sodass sich die gebildeten Hybride wieder auftrennen. Dabei wird kontinuierlich die Fluoreszenz gemessen und eine Abnahme der Fluoreszenz registriert. Die PCR-Produkte haben einen

spezifischen und höheren Schmelzpunkt als Dimere, sodass man diese unterscheiden kann (vgl. Abbildung 6).

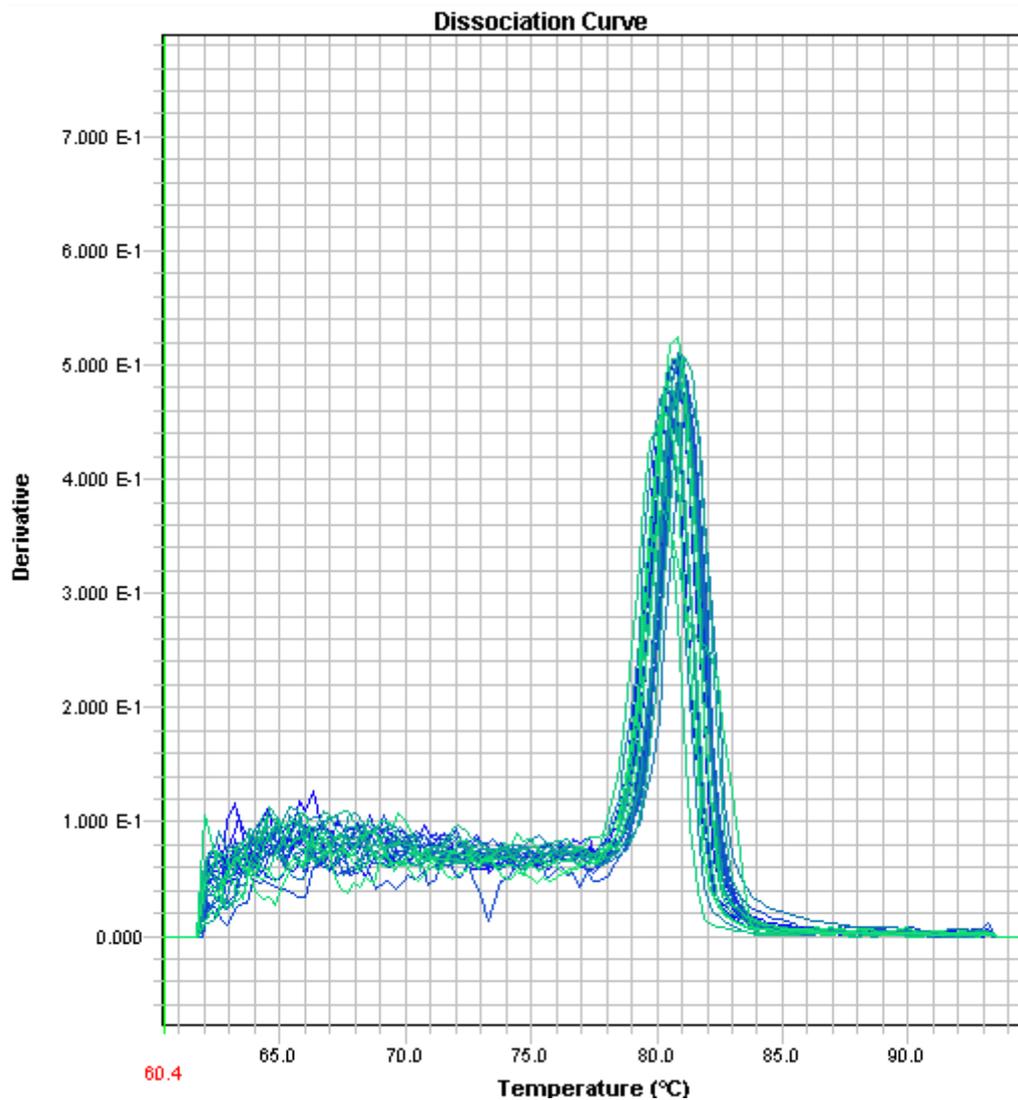


Abbildung 6: Grafische Auswertung einer Schmelzkurvenanalyse des FABP: Darstellung als Peakkurve: negative erste Ableitung der Schmelzkurven nach der Temperatur. In 24 Proben lag die mittlere Schmelztemperatur bei $80,69 \pm 0,33$ °C (MW \pm SD).

TaqMan® qPCR

Bei der TaqMan® Technik erfolgt ebenfalls eine quantitative Auswertung der Amplifikation über ein Fluoreszenzsignal. Eine TaqMan®-Sonde hat auf der einen Seite einen sogenannten Reporter (6-Carboxyfluorescein; FAM), der ein Fluoreszenzsignal aussendet und auf der anderen Seite einen Quencher, der dieses abfängt. Die TaqMan®-Polymerase besitzt neben Ihrer Polymerase-Aktivität auch eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität, sodass sie nach der Hybridisierung und Elongation das 5'-Ende der Sonde abbaut. Dadurch entfernen sich Quencher und Reporter voneinander und ein messbares Fluoreszenzsignal wird freigesetzt. Der Moment, in dem die Hintergrundfluoreszenz signifikant überschritten wird, wird ebenfalls als Threshold Cycle gemessen. Verwendet wurde das *TaqMan® One-Step RT-PCR Master Mix Reagents Kit* (Fa. Applied Biosystems Inc, Foster City). Die hergestellte cDNA wurde zunächst im Verhältnis 1:8 verdünnt. Dann wurde ein Mastermix aus:

- Taq Man® Master Mix 8 µl
- Aqua ad iniectibilia 8 µl
- TaqMan® Sonde 1 µl (vgl. Tabelle 17)

hergestellt. In eine 384-Well-Platte wurden je 8 µL des Mastermix pro Well pipettiert. Anschließend wurden je 2 µL der zuvor verdünnten cDNA hinzugegeben. Alle Messungen erfolgten ebenfalls in Doppelbestimmung und mit einer Wasserprobe, um Verunreinigungen auszuschließen. Die Messung und Quantifizierung der PCR wurde auch im Thermocycler ABI PRISM 7900HT mit dem gleichen Temperaturprogramm, jedoch ohne Schmelzkurvenanalyse durchgeführt (vgl. Tabelle 16). Die Auswertung erfolgte wiederum mit Hilfe der ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System Software, Version 2.2. (Fa. Applied Biosystems Inc, Foster City) und nach der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode.

Tabelle 17: Verwendete TaqMan® Sonden für die TaqMan®-Real-Time-qPCR

Spezies	Sonde	Referenzsequenz	Bestellnummer	Firma
Homo sapiens	GAPDH	NM_002046.3	Hs00266705_g1	Applied Biosystems Inc, Foster City, USA
	NOS2	NM_00625.4	Hs00167257_m1	
Rattus norvegicus	GAPDH	NM_017008.3	Rn01462662_g1	
	GLUT1	NM_138827.1	Rn00593670_m1	
	GLUT4	NM_012751.1	Rn00562597_m1	

3.6 Fluorimetrische Nitrit-Messung: Griess Assay

Um NO-Bildung im Zellkultursystem quantifizieren zu können, wurde eine einfache fluorimetrische Nitritmessung aus dem Überstand des Kulturmediums durchgeführt. Nitrit (NO_2^-) ist eines der stabilen, oxidativen Hauptprodukte des reaktiven NO und dient somit als Indikator für die NOS-Aktivität (Giustarini et al., 2008). Das Prinzip der Messung beruht darauf, dass Nitrit unter sauren Bedingungen mit dem Griess-Reagenz reagiert und einen Azo-Farbstoff bildet, welcher dann fluorimetrisch gemessen werden kann (Hensley et al., 2003). Zur Quantifizierung des entstandenen Nitrits wurde eine Standardreihe aus in Kulturmedium gelöstem Natriumnitrit (NaNO_2) hergestellt. Dafür wurde zunächst eine 10 mM Stocklösung Natriumnitrit in Aqua dest. hergestellt, die dann im Verhältnis 1:100 in unverwendetem Kulturmedium verdünnt wurde. Serielle 1:2-Verdünnungen wurden hergestellt, um Nitritkonzentrationen von 100 μM bis 1,57 μM zu erreichen. Als Leerwert dienten 100 μl Zellkulturmedium. Das Griess Reagenz Diaminonaphthalin (DAN) wurde zunächst in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und eine 100 mM Stammlösung hergestellt, welche bis zum Gebrauch dunkel gelagert wurde. Diese Lösung wurde am Tag des Assays im Verhältnis 1:10 mit Aqua dest. verdünnt und 1% Salzsäure (HCl) zugesetzt, um eine Arbeitslösung zu erhalten. 100 μl Probe oder Standard wurden in je ein Well einer 96- Well Mikroplatte gegeben und 100 μl der DAN-Arbeitslösung hinzugegeben. Nach 10 Minuten Inkubationszeit wurden 100 μl 2 N Natriumhydroxid (Na(OH)) hinzugefügt und dann in dem Spektrophotometer Safire² Microplate reader® (Fa. Tecan) bei 355 nm Exzitation und 460 nm Emission gemessen. Die Ergebnisse wurden mit der dazugehörigen MagellanTM Data Analysis Software ausgewertet.

3.7 Radioaktiver 2-Deoxyglucosetransport

Das Prinzip dieses Assays beruht darauf, dass 2-Desoxy-D-glucose (2-DOG) wie D-Glucose in die Zellen aufgenommen wird, aber auf Grund der fehlenden Hydroxylgruppe intrazellulär nicht verstoffwechselt werden kann. Die 2-Desoxy-D-glucose wurde radioaktiv markiert, sodass die aufgenommene Menge mittels eines Szintillationszählers bestimmt werden konnte.

Die Zellen wurden in 12-Well-Platten gemäß des zuvor beschriebenen Protokolls differenziert, für 24 Stunden mit der zu untersuchenden Substanz inkubiert und dann für drei Stunden mit Hungermedium (DMEM+GlutaMAXTM-I, 1 g/l Glucose ohne Zusätze) versetzt. Für den Transportversuch wurde ein spezielles Inkubationsmedium (Tabelle 18 und Tabelle 19) hergestellt und auf 37 °C erwärmt. Das Hungermedium wurde zunächst sorgfältig abgesaugt. Die Zellen wurden anschließend mit einem Gemisch aus dem Inkubationsmedium, inklusive der zu untersuchenden Stimulatoren mit bzw. ohne Insulin erst gespült und dann für 20 Minuten inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Wells sorgfältig abgesaugt und dann mit einem vorher hergestellten 37 °C warmen Master Mix aus Inkubationsmedium mit 10 µM 2-Desoxy-D-glucose (2-DOG) und etwa 0,5 MBq ³H-2-Desoxy-D-glucose (³H-2-DOG)² für weitere zehn Minuten benetzt. Der Überstand wurde danach wiederum sorgfältig abgesaugt und die Zellen dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden 600 µl Lysispuffer (0,1% SDS in PBS) hinzugegeben und die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers gelöst. Das Lysat wurde dann gut gevortext und für 3 Minuten bei 12.000 g zentrifugiert. 500 µl des Überstands wurden zu 5 ml Szintillationsflüssigkeit *Analytic Quick Safe A*© (Fa. Zinsser) gegeben und wiederum gut gemischt. Dieses Gemisch wurde anschließend in einem Scintillation Counter (Fa. PerkinElmer Wallac) gemessen. Anhand der Zerfallsrate [Counts per minute cpm], die gemessen wurde, konnte die aufgenommene 2-DOG-Menge semiquantitativ in counts pro Minute gemessen werden.

²Die Mischung aus 2-Desoxy-D-glucose (2-DOG) und radioaktiver ³H-2-Desoxy-D-glucose wird im Folgenden zur Vereinfachung als 2-Deoxyglucose oder 2-DOG bezeichnet.

Tabelle 18: Zusammensetzung des 10X Krebs-Ringer-Puffers für die Herstellung des Inkubationsmediums der Radioaktivversuche

Substanz	Menge
1 M NaCl	35,06 g
1 M KCl	1,79 g
1 M KH ₂ PO ₄	0,82 g
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,72 g
CaCl*6H ₂ O	0,96 g

→ ad 500 ml Aqua dest.

Tabelle 19: Zusammensetzung des Inkubationsmediums (pH 7,0 – 7,4) für die Radioaktivversuche

Substanz	Menge
BSA	500 mg
10X KRP	10 ml
HEPES	2 ml
Aqua dest.	88 ml

3.8 Statistische Auswertung der experimentellen Arbeit

Die Analysen wurden mit der Prism Software Version 5 (Fa. GraphPad) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als arithmetischer Mittelwert ± SE (Standard error, Standardfehler), sofern nicht anders vermerkt, dargestellt. Die statistische Auswertung zwischen zwei Gruppen erfolgte mittels zweiseitigen T-Tests. Für Experimente mit mehr als zwei Gruppen wurde eine One-Way ANOVA (analysis of variance) und anschließende Bonferroni-Testung der einzelnen Gruppen durchgeführt. Statistisch signifikant galt für alle Analysen ein p-Wert <0,05.

3.9 Materialien

3.9.1 Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Agarose Gel Electrophoresis Systems Sub-Cell [®] GT	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Analysenwaage, CP 225 D	Sartorius AG, Göttingen
Autoklav	Wesarg, Medizintechnik, Deutschland
Bio Rad Mini Transblot Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Bio Rad Power Pack Basic	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Brutschrank, Heraeus B 5050 E	Heraeus Holding GmbH, Hanau
ChemiGenius ² <i>Bio Imaging System</i>	Syngene, USA
Gel-Elektrophorese-System Horizon	Gibco/BRL, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Heidolph MR3002 Magnetrührer	Heidolph Instrumeta GmbH & Co KG
Ika- Combimag reo Magnetrührer	IKA [®] -Werke GmbH & CO. KG, Staufen
Isopropanol-Einfrierbox	Nalgene, USA
Laborwaage CP 225D	Sartorius AG, Göttingen
Laborwaage BP 3100S	Sartorius AG, Göttingen
Lichtmikroskop	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Magnetrührer, Heidolph MR 3002	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
PCR-Gerät, Mastercycler ep gradient [®]	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe accu-jet	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Phosphor-Imaging-System	Fujifilm Photo Film Europe GmbH, Düsseldorf
Photometer SmartSpec [™] 3000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
qRT-PCR-Gerät, ABI Prism [®] 7900 HAT Sequence Detection System	Applied Biosystems Inc, Foster City, USA
Radioaktivitätscounter 1409 Liquid Scintillation Counter [®]	PerkinElmer, Massachusetts, USA
Sicherheitswerkbank, HERAsafe HS 12	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold
Spektrophotometer, NanoDrop [™] ND-1000	Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA
Spektrophotometer Safire ² microplate reader	TECAN, Männedorf, Schweiz
Thermomixer Compact	Eppendorf AG, Hamburg
Tischzentrifuge, MC6	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Ultrazentrifuge, Optima [™] MAX-XP	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Vortex, Heidolph Reax top	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Wasseraufbereitungssystem, Milli-Q plus	Millipore GmbH, Schwalbach
Zählkammer, Neubauer	Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim
Zellkultur CO ₂ - Inkubator	Binder GmbH, Tuttlingen
Zentrifuge, Rotina 35 R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Zentrifugen, Centrifuge 5415 D, 5415 R	Eppendorf AG, Hamburg

3.9.2 Substanzen

Substanz	R und S Sätze	Hersteller
3-Morpholinosydnonimin-Hydrochlorid (SIN-1 Chlorid)	R: 22 S: 36	Calbiochem® Merck KGaA, Darmstadt
40% Bis-Acrylamid Lösung	R:23/24/25-45-46-48 S:36/37/39-45-60	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
5% Trypsin-EDTA 10x	S: 23-24-26-36/37	GIBCO Invitrogen, Darmstadt
ADMA		Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, München
Agarosepulver		Invitrogen, Darmstadt
Ammoniumpersulfat	R: 8-22-36/37/38-42/43 S: (2)-22-24-26-37	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Bradford Reagenz Biorad Protein-Assay	R: 10-20/21/22-34-23/24/25-39; S: 26-36/37/39-45-60	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
BSA		Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, München
DEPC Wasser		Roth, Karlsruhe
Dexamethason		Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Desoxy-D-glucose, 2-[1,2-3H (N)] 0,296 TBq/mmol	R: 11 S: 16	PerkinElmer, USA
Diaminonaphthalin	R: 22-36-37/38-34 S: 26-45-36/37/39	GIBCO Invitrogen, Darmstadt
Diethylentriamin NONOate	R: 21/22-34-43 S: (1/2)-26-36/37/39-45	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)		GIBCO Invitrogen, Darmstadt
DNase I, RNase free (1 U/µl)		Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
dNTPs		Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Ethylendiamintetraacetat (EDTA), 25 mM	R: 36 S: (2)-26	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Ethanol	R: 23-68 S: 7-16	Apotheke Roth, Deutschland
Ethidiumbromidlösung 1%	R: 23-68 S: 36/37	Fluka, Deutschland
Gelatine		Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, München
Geneticin (50mg/ml)	R: 42/43-61 S: 24/25	GIBCO, Invitrogen, Darmstadt
Glycerol		Merck KGaA, Darmstadt
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure		GIBCO Invitrogen, Darmstadt

HEPES, 1 M		
Insulin solution human 10mg/ml		Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
3-Isobutyl-2-methylxanthin (IBMX),		Invitrogen, Darmstadt
Isopropanol	R: 11-36-67 S: (2)-7-16-24/25-26	J.T. Baker, Griesheim
Kaliumchlorid		Caeb (Hilden)
Laemmli Sample Buffer		Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Magnesiumchlorid (25 mM MgCl ₂)		New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.
Methanol	R: 11-23/24/25- 39/23/24/25 S: (1/2)-7-16-36/37-45	Merck KGaA, Darmstadt
Milchpulver		Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
Natriumchlorid		Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydroxid 2N	R: 35 S: 26-36/37/39-45	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumnitrit	R: 8-25-50 S: (1/2)-45-61	Merck KGaA, Darmstadt
Nonidet P 40		SIGMA GmbH, Steinheim
Pen/Strep-Lösung	R: 43-36/37/38 S: 26- 36/37-24/25	GIBCO Invitrogen, Darmstadt
Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets (PhosSTOP)		Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Ponceau S	R: 36/37/38-51/53 S: 26-36	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Precision Plus Protein Standard		Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Protease Inhibitor Cocktail		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Protein Standard I (<i>bovine gamma-globulin</i>)	S: 60	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
RNAzol [®] B	R: 24/25-34 S: 28	WAK-Chemie Medical, Steinbach/Ts.
Salzsäure, Rauchend, 37 %	R: 34-37 S: (1/2)-26-45	Roth, Deutschland
SDMA		Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, München
SDS, 20% (Natriumdodecylsulfat)	R: 11-21/22-36/37/38 S: 26-36/37	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Szintillationsflüssigkeit		Zinsser Analytic

Analytic Quick Safe A© Taq Reaction Buffer®		GmbH, Frankfurt a.M. New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M
Taq DNA Polymerase® (5000 U/ml)		New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M
TEMED	R:11-20/22-34 S:16-26-36/37/39-45-60	Merck KgaA, Darmstadt
Tris/Trizma® Base	R: 36/37/38 S: 26, 36	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Tris-HCl		Promega, Madison, USA
TurboFect™ in vitro transfection reagent		Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Tween 20		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
UltraPure™ Agarose		Invitrogen GmbH, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	R: 23/24/25-38-41- 50/53 S: 26-36/37/39-45-61	Merck KGaA, Darmstadt

3.9.3 Zellen und Zellkulturmedien

Produktbezeichnung	Hersteller / zur Verfügung gestellt von
3T3-L1-Adipozyten	PD Dr. Karim Sultan, Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie Universitätsklinikum Eppendorf
DMEM+GlutaMAX™-I (1 g/l D-Glucose)	GIBCO Invitrogen, Darmstadt
DMEM+GlutaMAX™-I (4,5 g/l D- Glucose)	GIBCO Invitrogen, Darmstadt
Calf Serum	GIBCO Invitrogen, Darmstadt
Fetal bovine serum (FBS), heat- inactivated	GIBCO Invitrogen, Darmstadt
HEK-293	ATCC Global Bioresource Center™
Horse Serum	GIBCO Invitrogen, Darmstadt
L6 Myozyten	Dr. Ludger Scheja, Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie, Universitätsklinikum Eppendorf

3.9.4 Verbrauchsmaterialien und Kits

Produktbezeichnung	Hersteller
2x TaqMan® Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems Inc, Foster City, USA
384 Well Multiply® PCR Platte	Sarstedt Nümbrecht
Einfrierröhrchen, Cryo.s™ 2 ml	Greiner-Bio One GmbH, Frickenhausen
Falcon/Zentrifugenröhrchen, 15, 50 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Küvetten, Halb-Mikro-Küvette	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)	Fermentas GmbH, St.Leon-Rot
Nitrocellulose-Membran, 0,45 µm Pore	Whatman GmbH, Dassel
Pasteur Pipetten	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
PCR-Klebefolien optisch klar	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipetten 10, 100, 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Polycarbonatfilter, 8 µm Pore	Neuro Probe, Gaithersburg, USA
PolyFect® Transfection Reagent	Qiagen, Hilden
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Reaktionsgefäße, Eppendorf Safe Lock, 0,5, 1,5 und 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Reaktionsgefäße, Multiply®.µStripPro 0,1 ml PCR 8er-Kette	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas GmbH, St.Leon-Rot
Serologische Pipetten 1, 2, 5, 10, 25 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
<i>Super Signal West Dura Extended Duration Substrate</i>	Thermo Scientific, Rockford, USA
Zellkulturflaschen, 25 cm ² , 75 cm ²	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zellkulturplatten, 6-,12-, 24-Well	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zellschaber	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen für Ultrazentrifuge, Polycarbonat, TL-100 (11x34 mm)	Beckman Coulter GmbH, Krefeld

3.9.5 Antikörper und Vektoren

Antikörper	Katalognummer	Hersteller
Akt (5G3) mouse monoclonal antibody	#29209	Cell Signaling Technology, New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.
anti-mouse IgG HRP, donkey	#715-035-150	Jackson ImmunoResearch Laboratories West Grove, USA
anti-rabbit IgG HRP, goat	#111-035-045	Jackson ImmunoResearch Laboratories West Grove, USA
GAPDH (FL-335)	#sc-25778	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
GLUT4 (H61) rabbit polyclonal Antibody	# sc-7938	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
GLUT4 (IF8) mouse mAb	#sc-53566	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
IRS-1 (D23G12) rabbit mAb	#3407	Cell Signaling Technology, New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.
IRS-2 rabbit Antibody	#4502	Cell Signaling Technology, New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.
NOS-2 mouse mAb	#sc-7271	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
PathScan Multiplex Western Cocktail	#7100	Cell Signaling Technology, New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.

Vektor	Zur Verfügung gestellt von
pcDNA3.1 iNOS	Dr. Richard Shapiro, University of Pittsburgh

3.9.6 Software

Magellan™ Data Analysis Software, Tecan, Männedorf, Schweiz
 PrimerBLAST, NCBI, Bethesda, USA
 Prism5, GraphPad Software, Inc, LaJolla, USA
 Sequence Detection System, Version 2.2, Applied Biosystems, Foster City, USA
 Vector NTI® Software, Invitrogen GmbH, Karlsruhe

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der verwendeten Zellkultursysteme

4.1.1 L6 Myozyten

4.1.1.1 mRNA-Expression

Zunächst sollte die Expression der verschiedenen Glucosetransporter in dem Zellmodell der L6 Myozyten dargestellt werden. Im Wesentlichen waren zwei Arten für die folgenden Untersuchungen von Bedeutung: GLUT1 als Vertreter der Insulin unabhängigen und GLUT4 für die Insulin abhängige Glucoseaufnahme (vgl. Abschnitt 2.2).

Eine stabile Differenzierung und damit GLUT4 Expression war Voraussetzung, die die Insulin stimulierte Glucoseaufnahme zu untersuchen. Diese wurde durch mikroskopische Kontrollen (vgl. Abbildung 7) und Analyse des Differenzierungsmarkers CK-M überprüft.

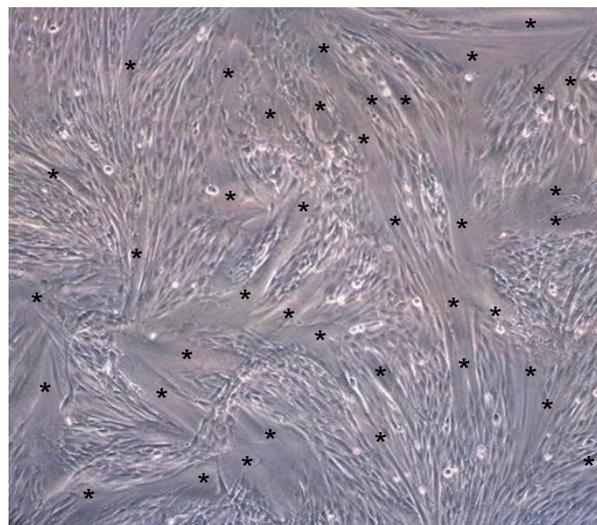


Abbildung 7: Differenzierte L6 Myozyten (*Myotuben), 100-fache Vergrößerung, eigene Abbildung.

Durch Nachweis der GLUT1- und GLUT4-Transporter auf mRNA-Ebene mittels Real-Time-PCR gelang es, einen Wechsel der Transporter mit Differenzierung von Myoblasten zu Myotuben darzustellen. Im undifferenzierten Zustand zeigten die Zellen eine signifikant stärkere Expression des GLUT1-Transporters. Nach der Differenzierung kehrte sich das Bild um und die Zellen wiesen eine signifikant höhere Expressionsrate des GLUT4-Transporters auf (vgl. Abbildung 8).

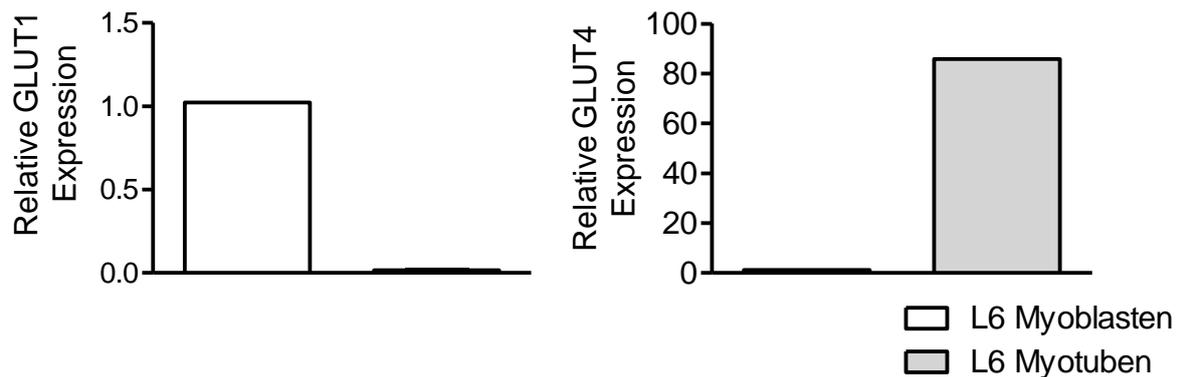


Abbildung 8: Vom Differenzierungszustand abhängige Expression der wichtigsten Glucosetransporter in L6 Zellen. Bestimmung der relativen mRNA-Expression im Bezug zu den Myoblasten, n=2 .

Durch Literaturrecherche wurden wichtige, der GLUT4 Translokation in die Zellmembran vorgeschaltete Moleküle ermittelt: IRS-1, IRS-2, Akt (vgl. Abschnitt 2.2), welche es in den in den L6 Myozyten nachzuweisen galt. Dafür wurden, wie in Abschnitt 3.5.1 beschrieben, spezielle Primer designt und zunächst eine qualitative PCR mit den gewonnenen Proben durchgeführt. Der Primer GAPDH wurde designt, um eine interne Kontrolle für den RNA-Gehalt der verwendeten Proben zu haben. Die CK-M diente als unabhängiger Differenzierungsmarker. Zu sehen sind im Folgenden 1-2%ige Gele, bei denen jeweils die PCR-Produkte aus der umgeschriebenen cDNA (A) und nicht umgeschriebene Proben (B), als Kontrolle für Kontamination mit genomischer DNA, aufgetragen wurden. Es gelang, alle zuvor beschriebenen Moleküle der Insulinsignalkaskade in dem Zellkultursystem der L6-Myozyten nachzuweisen (vgl. Abbildung 9).

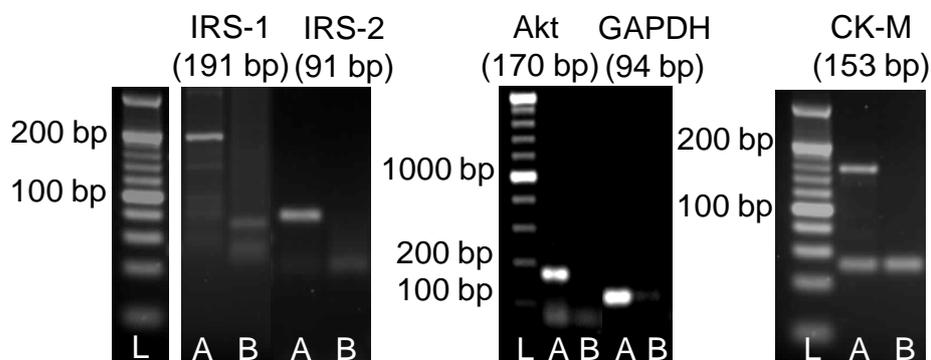


Abbildung 9: Qualitative PCR der vorgeschalteten Signalmoleküle IRS-1, IRS-2 und Akt, sowie GAPDH und CK-M als Ladungs- bzw. Differenzierungskontrolle in L6 Zellen. Es wurden PCR-Produkte der cDNA (A) und RNA als Negativkontrolle (B), sowie ein Ladder (L) auf 1-2%ige Agarosegele aufgetragen.

4.1.1.2 Proteinexpression

Diese Ergebnisse galt es nun, auf Proteinebene im Western Blot zu zeigen. Als zusätzliche Targets wurden hierbei die MAPK und pAkt, als aktiver Akt-Anteil, untersucht. Es gelang der Nachweis von IRS-1 und IRS-2. Dabei hatte Insulin keinen signifikanten Einfluss auf die Stärke der Expression (vgl. Abbildung 10 A). Des Weiteren konnte das Protein Akt in den L6-Myozyten, sowie dessen phosphorylierte Form pAkt nach Insulinstimulation nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 10 B). Auch der zweite Signalweg über MAPK mit ihren beiden Phosphorylierungsstellen Erk-1 und Erk-2 konnte in den L6 Zellen dargestellt werden. Dieser Signalweg hat vor allem proliferative Effekte auf die Zellen (vgl. Abschnitt 2.2). Hier ist eine deutliche Zunahme der Phosphorylierung durch Insulinstimulation zu erkennen (vgl. Abbildung 10 C).

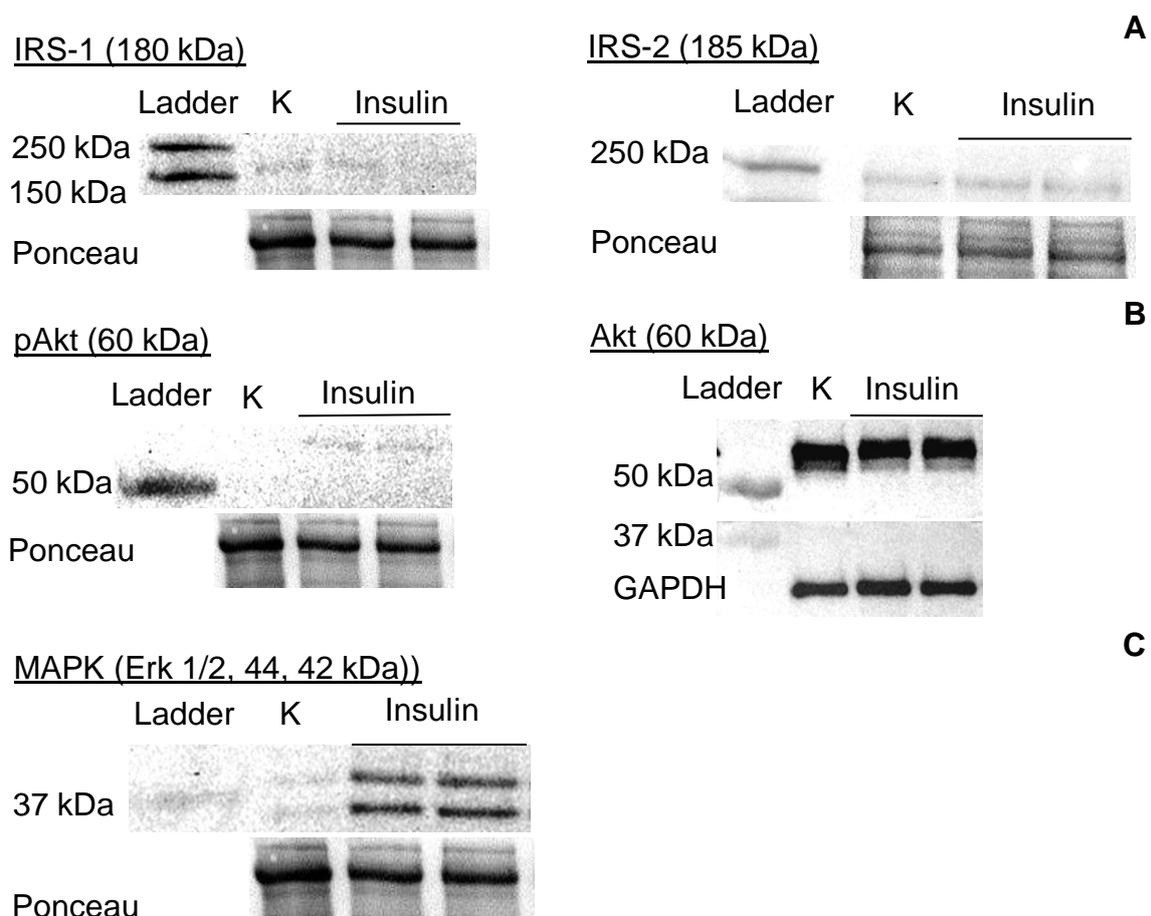


Abbildung 10: Darstellung der Insulinsignalkaskade in der Western Blot Analyse in L6 Zellen. IRS-1, IRS-2, Akt und pAkt, sowie Erk-1/2. Als Ladungskontrolle diente die Ponceaufärbung, sowie GAPDH (37 kDa). Es wurden je 50 µg Proteinlysate eingesetzt. (K) unstimulierte Zellen, (Insulin) 30-minütige Insulinstimulation.

Der schon in der PCR dargestellte Wechsel des Expressionsmusters der Glucosetransporter von L6 Myoblasten zu Myotuben konnte in der Western Blot Analyse bestätigt werden. Im undifferenzierten Zustand als Myoblasten konnte kein GLUT4-Transporter nachgewiesen werden. Nach der Umwandlung in Myotuben konnte man eine deutliche Bande erkennen. Als Positivkontrolle diente hierbei aus Ratten gewonnenes Muskelzelllysate (RM) (vgl. Abbildung 11).

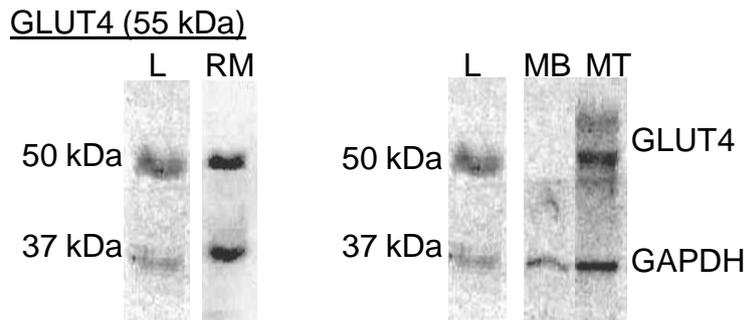


Abbildung 11: Expressionsmuster des Glucosetransporters GLUT4 (55 kDa) in L6 Myozyten. Es wurden 30 µg Protein eingesetzt. (L) Ladder, (MB) Myoblasten, (MT) Myotuben, (RM) Rattenmuskellysat. Als Ladungskontrolle diente GAPDH (37 kDa).

4.1.1.3 Radioaktive 2-Deoxyglucoseaufnahme

Um die Funktionalität des gewählten Zellkultursystems zu evaluieren, wurden in 12-Well-Platten radioaktive 2-Deoxyglucoseaufnahme Versuche durchgeführt. Gemessen wurde dabei zunächst die basale und dann die Insulin stimulierte 2-DOG-Aufnahme. Durch Insulinstimulation konnte eine leichte, aber signifikante Steigerung der 2-DOG-Aufnahme von durchschnittlich $16,7 \pm 4,6\%$ (MW \pm Standardabweichung, SD) erreicht werden (vgl. Abbildung 12).

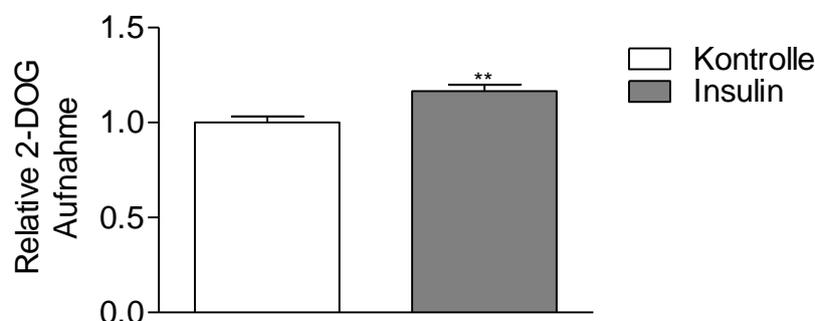


Abbildung 12: Darstellung der Insulin stimulierten 2-Deoxyglucoseaufnahme von L6 Myozyten. Abgebildet wurde jeweils die relative 2-DOG-Aufnahme zur Kontrolle ohne Insulinstimulation. n=12, **p < 0,01 vs. Kontrolle.

4.1.1.4 Transfektion

Zur Erzeugung von nitrosativem Stress innerhalb dieses Zellkultursystems wurde der humane Vektor der induzierbaren NO-Synthase pcDNA3.1iNOS mittels lysosomalem Transfektionsreagenz *Turbofect*® in die undifferenzierten Myoblasten eingebracht (vgl. Abschnitt 3.2). Dieser Vektor wurde freundlicherweise von Dr. R. Shapiro, Universität Pittsburgh zur Verfügung gestellt. Der Vektor enthält eine Neomycin-Resistenz-Kassette zur Selektionierung mit Geneticin (vgl. Abbildung 13).

pcDNA3.1iNOS (9652bp)

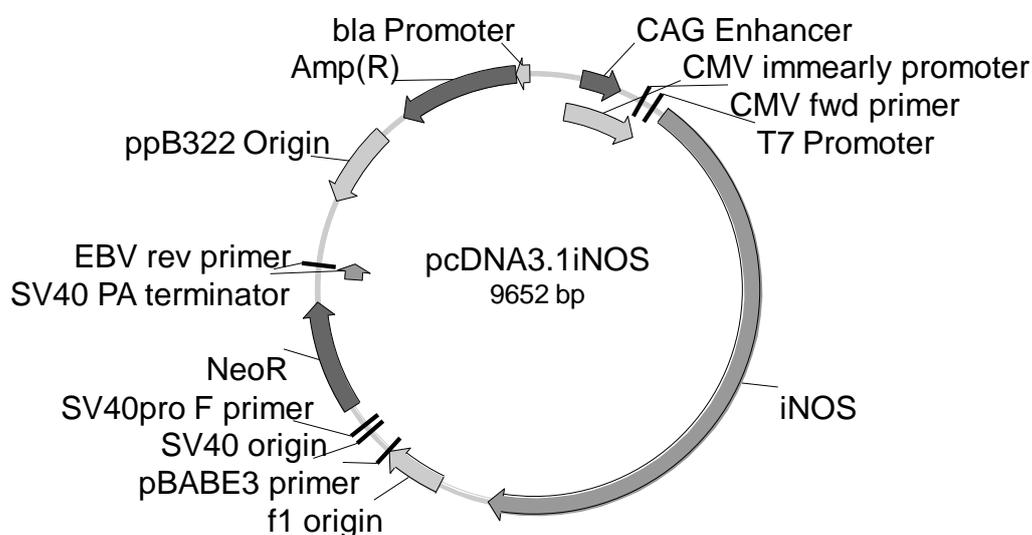


Abbildung 13: Vektorkarte des transfizierten pcDNA3.1iNOS-Vektors mit integrierter Neomycin/Geneticin-Resistenz-Kassette. (NeoR) Neomycin Resistenz, (Amp(R)) Ampicillin Resistenz, (CMV) Cytomegalievirus. Abbildung mit Vector NTI® Software (Fa. Invitrogen)

Nach zwei Passagierungen in Geneticin-haltigem Medium wurden die Zellen ausgesät und mit dem Differenzierungsmedium ohne Zusatz von Geneticin inkubiert. Anschließend wurden die differenzierten Myotuben lysiert und RNA bzw. Protein gewonnen. Als Positivkontrolle wurden HEK-293-Zellen, eine humane, leicht zu transfizierende Zelllinie, mit dem gleichen Vektor inkubiert und kultiviert. Zur Überprüfung der Transfektion wurden zunächst RNA Proben gewonnen, umgeschrieben und eine Real-Time-qPCR durchgeführt. Da in den Wildtyp L6 Myozyten keine iNOS-mRNA nachweisbar und damit keine relative Quantifizierung möglich war, wurden die PCR-Produkte auf ein 2%iges TBE-Gel aufgetragen (vgl. Abbildung 14 A). Zu erkennen ist sowohl eine Bande bei der Positivkontrolle (HEK-

iNOS), als auch bei den transfizierten L6 Zellen (L6-iNOS), was auf ein erfolgreiches Einbringen der Fremd-DNA schließen ließ.

Zur Bestätigung dieses Ergebnisses schlossen sich Proteinanalysen an. Im Western Blot zeigte sich jedoch nur eine Bande bei der Positivkontrolle (vgl. Abbildung 14 B).

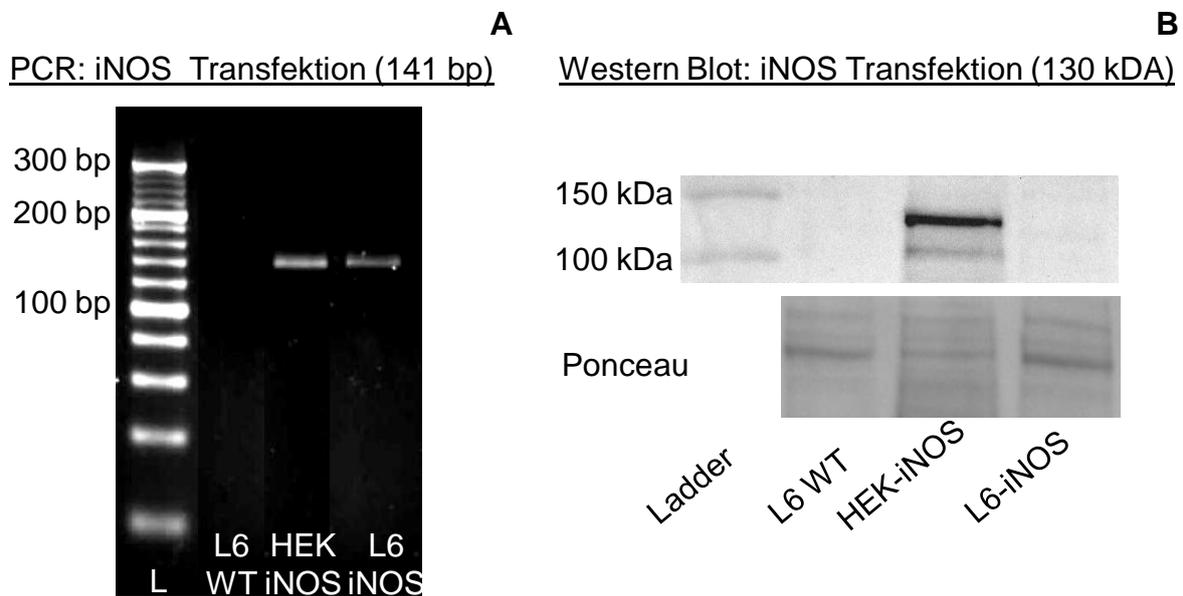


Abbildung 14: Expressionsanalyse der Transfektion auf RNA- (A) und Proteinebene (B): (A) Qualitative Darstellung der PCR-Produkte auf einem 2%igem TBE Gel, Größe des iNOS-PCR-Produktes 141 bp, (L) Ladder. (B) Western Blot Analyse von iNOS (130 kDa): aufgetragen wurden 50 µg Proteinlysate, als Ladungskontrolle diente die Ponceaufärbung.

4.1.1.5 Messung von Natriumnitrit

Die Funktionalität des transfizierten Proteins in den HEK-293-Zellen sollte mit Hilfe eines einfachen fluorimetrischen Assays, überprüft werden. Es wurde in definierten Zeitabständen etwa 300 µl des Überstandes der Zellen gewonnen und sofort bei -80° C für spätere Analysen eingefroren.

Als Negativkontrolle wurde 48 Stunden altes Zellkulturmedium aus dem Überstand von untransfizierten HEK-293-Zellen verwendet. Mikroskopisch bestand bei allen Zellen zum Zeitpunkt der Probenentnahme eine etwa 80%ige Konfluenz. Zur Quantifizierung wurde eine Standardkurve im gleichen, aber nicht mit Zellen in Kontakt gekommenem Medium, aus gelöstem Natriumnitrit (NaNO₂) hergestellt (vgl. Abschnitt 3.6). Es gelang ein Nachweis einer signifikanten Produktion von Nitrit in dem Überstand von transfizierten HEK-Zellen (HEK-293-iNOS) nach 48 Stunden

(vgl. Abbildung 15). Eine Nitritproduktion und somit ein funktionelles iNOS-Enzym konnte in den transfizierten L6 Myozyten nicht gezeigt werden (Daten nicht gezeigt).

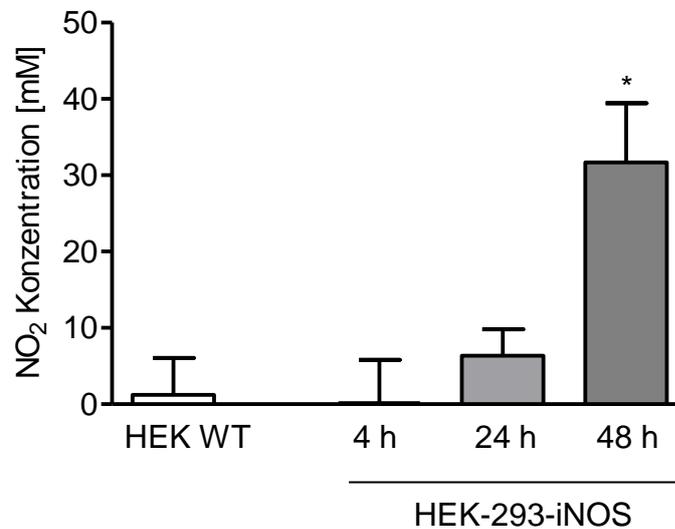


Abbildung 15: Funktionalität der transfizierten iNOS in HEK-293-iNOS Zellen, Griess Assay. Es wurden je 100 µl Überstand in Doppelbestimmung von je drei (HEK-293-iNOS) bzw. zwei (HEK-Wildtyp) Proben eingesetzt. Darstellung als absolute Nitritkonzentration [mM], *p < 0,05 vs. 48 h.

4.1.2 3T3-L1-Adipozyten

Durch die geringe Insulin-stimulierte DOG-Aufnahme und die Schwierigkeiten bei der Transfektion erwies sich das L6 Zellkultursystem als nicht geeignet für die weiteren Untersuchungen. Demzufolge wurde ein zweites Insulin sensibles Zellkultursystem - die 3T3-L1-Adipozyten - ausgetestet.

4.1.2.1 mRNA-Expression

Zunächst wurde die Expression der GLUT1- und GLUT4-Transporter in unreifen Fibroblasten und in gereiften 3T3-L1-Adipozyten nachgewiesen. Die Differenzierung wurde durch mikroskopische Kontrollen (vgl. Abbildung 16) und den Differenzierungsmarker FABP4 überprüft.

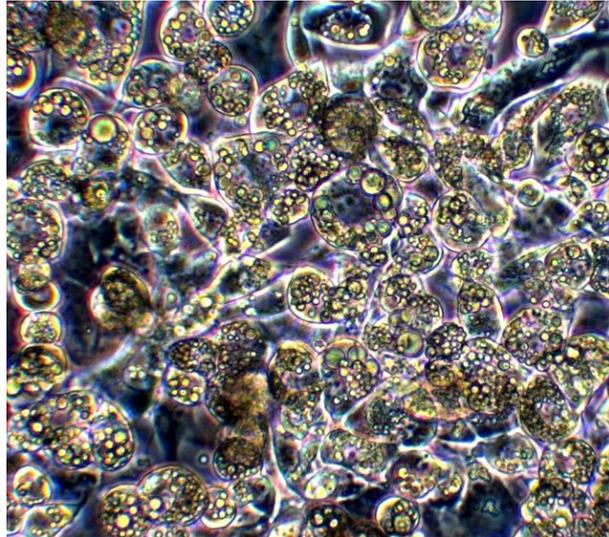


Abbildung 16: Differenzierte 3T3-L1-Adipozyten mit intrazellulären Fettvesikeln (20-fache Vergrößerung), eigene Abbildung.

Mit Hilfe der Real-Time-PCR ist eine Änderung der Expression vom undifferenzierten zum differenzierten Zustand erkennbar. Im Fibroblasten- (FB) und Adipozytenstadium (AZ) ist kein signifikanter Unterschied in der GLUT1 Expression darstellbar (vgl. Abbildung 17A). Der Insulin abhängige Glucosetransporter GLUT4 ist dagegen erst nach der Differenzierung zu Adipozyten nachweisbar. Ein quantitativer Vergleich der GLUT4 Expression war daher nicht möglich, sodass die PCR-Produkte deshalb auf ein TBE-Gel aufgetragen wurden (vgl. Abbildung 17B).

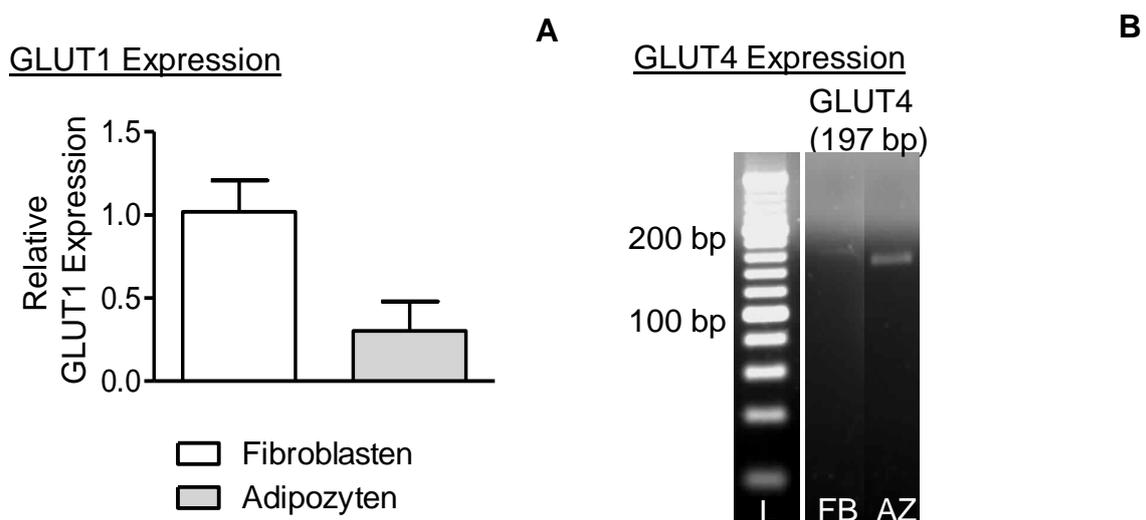


Abbildung 17: PCR Analyse der GLUT-Transporter in 3T3-L1. (A) quantitative Auswertung der GLUT1 mRNA-Expression in Relation zu den Fibroblasten, n=2. (B) Darstellung der PCR-Produkte von Adipozyten (AZ) und Fibroblasten (FB) auf einem 2%-gen TBE-Gel, (L) Ladder.

Im Folgenden sollen sich die Untersuchungen auf den GLUT4-Transporter beschränken, da dieser das Effektormolekül für die Insulinstimulation ist. GLUT1 fördert dagegen, die unspezifische Insulin unabhängige Glucoseaufnahme (vgl. Abschnitt 2.2). Die Expressionsmuster der Glucosetransporter zeigten, dass auch in diesem Zellsystem eine ausreichende Differenzierung die Grundlage für weitere Untersuchungen ist.

Als nächstes wurden die verschiedenen Targets der Insulinrezeptorsignalkaskade auf mRNA- Ebene dargestellt. Dafür wurden Real-Time-qPCR-Untersuchungen durchgeführt und die Produkte auf 2%ige TBE-Gele aufgetragen. Es gelang der Nachweis von IRS-1 und IRS-2, sowie Akt und GLUT4 (vgl. Abbildung 18). Die Gleichmäßigkeit der Differenzierung wurde mittels FABP4-Expressionsanalyse überprüft.

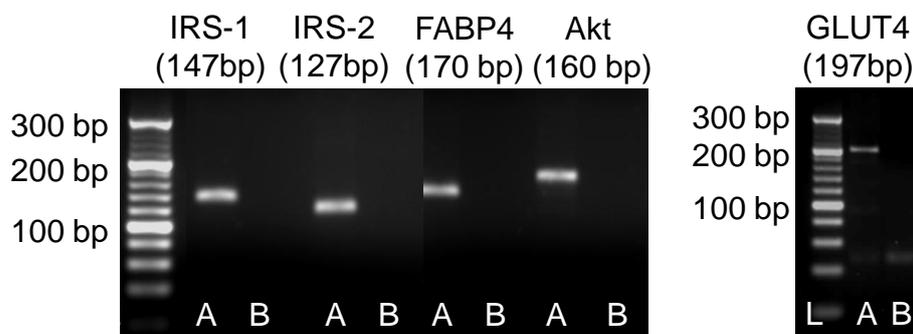


Abbildung 18: Expression der Targets der Insulinrezeptorsignalkaskade (IRS-1, IRS-2, Akt, sowie GLUT4) und FABP4 als Differenzierungsmarker in 3T3-L1-Zellen auf mRNA-Ebene. Die berechneten Größen der PCR-Produkte stehen in Klammern. Es wurden PCR-Produkte der cDNA (A) und RNA als Negativkontrolle (B), sowie ein Ladder (L) aufgetragen.

4.1.2.2 Proteinexpression

Zur Darstellung der verschiedenen Targets auf Proteinebene diente die Western Blot Analyse. Es konnte die Expression von IRS-1 und IRS-2, sowie GLUT4 und Akt gezeigt werden. Die Phosphorylierung von Akt (pAkt) nahm unter Insulinstimulation zu. Es konnte ebenfalls der proliferative Signalweg über die Insulin stimulierte Phosphorylierung der MAPK-Signalkaskade dargestellt werden (vgl. Abbildung 19).

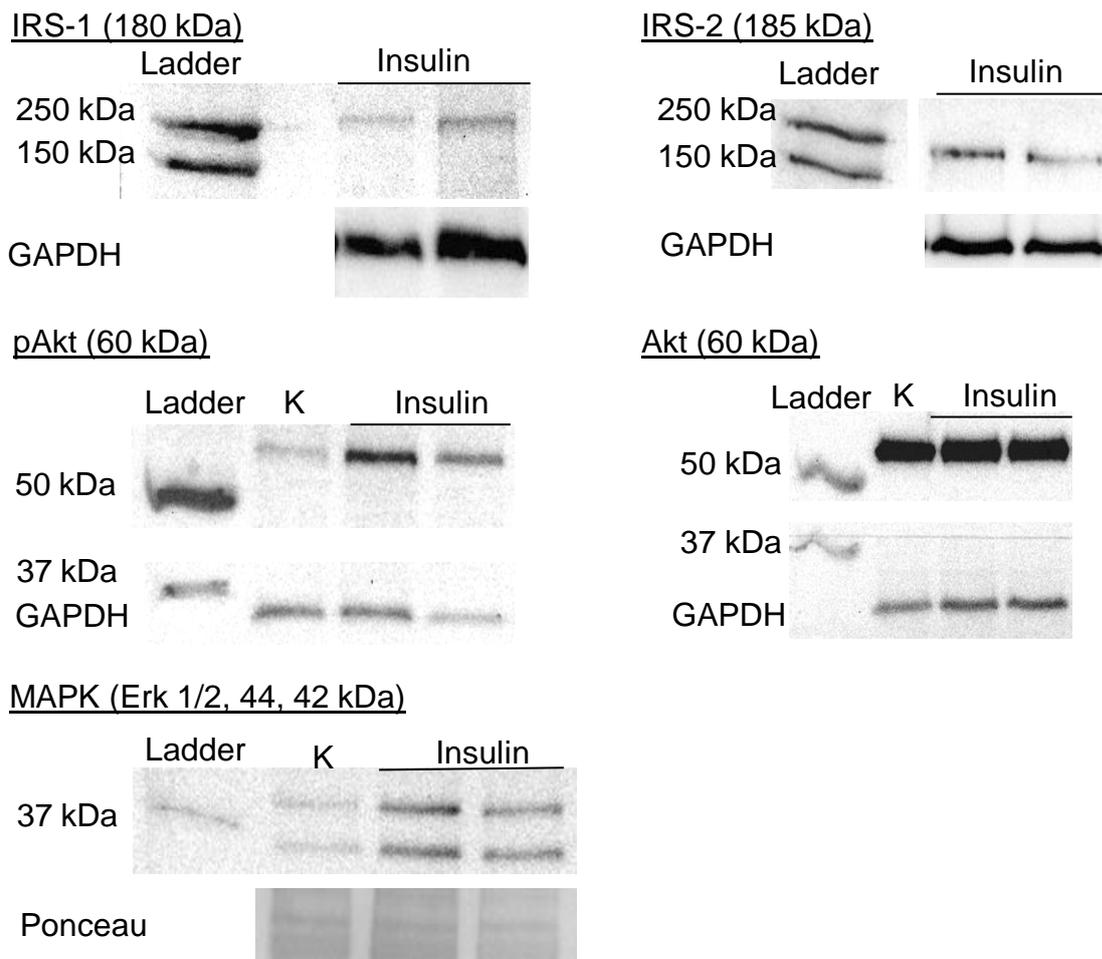


Abbildung 19: Darstellung der Insulinsignalkaskade der 3T3-L1 im Western Blot. Es wurden jeweils 50 µg Proteinlysate eingesetzt. Nachweis von IRS-1, IRS-2 und Akt, sowie eine Zunahme der Phosphorylierung von Akt und von MAPK durch Insulinstimulation, (K) Kontrolle, (Insulin) 30-minütige Insulinstimulation.

Bei Untersuchung der Expression von GLUT4 in den 3T3-L1-Adipozyten sah man in der Western Blot Analyse eine Doppelbande bei etwa 55 kDa in den Adipozyten (vgl. Abbildung 20). Im undifferenzierten Zustand (Fibroblasten) erkennt man zwei etwas höher bei etwa 70 kDa gelegene, wahrscheinlich unspezifische Banden.

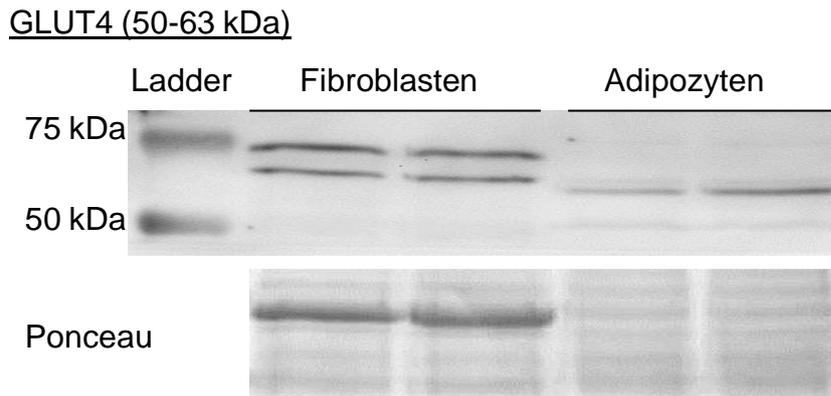


Abbildung 20: GLUT-4 Western Blot der 3T3-L1 Zellen: Fibroblasten und Adipozyten. Es wurden jeweils 30 µg Protein eingesetzt. Als Referenz diente die unspezifische Ponceau-Färbung.

4.1.2.3 Radioaktive 2-Deoxyglucoseaufnahme

Die Funktion der 3T3-L1-Adipozyten wurde ebenfalls mit radioaktiven 2-Deoxyglucoseaufnahme-Versuchen evaluiert. In diesem Zellkultursystem wurde ein relativer Insulineffekt von $55,9 \pm 5,1\%$ erreicht (vgl. Abbildung 21). Auf Grund der höheren und stabil zu reproduzierenden Insulineffekte in den 3T3-L1-Adipozyten schien dieses Zellsystem das geeignetere für unsere Untersuchungen zu sein.

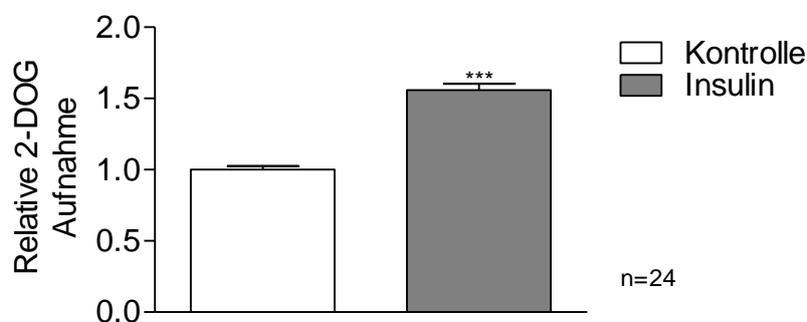


Abbildung 21: Radioaktive 2-Deoxyglucoseaufnahme in 3T3-L1-Zellen. Abgebildet wurde jeweils die relative 2-Deoxyglucoseaufnahme zur Kontrolle. Es wurden 24 unabhängige Wells gemessen. *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle.

4.1.2.4 Transfektion

Die Transfektion stellte sich in den 3T3-L1 als sehr schwierig dar. Eine große Anzahl der Zellen starb durch das Transfektionsreagenz oder die Selektionierung. Die anderen konnten nicht weiter differenziert werden, sodass wahrscheinlich eine Transfektion mittels viralen Vektors nötig ist.

4.2 Einfluss von NO-Donatoren auf den Glucosetransport

Zunächst galt es zu zeigen, welchen Einfluss verschiedene NO-Donatoren auf die Glucoseaufnahme unserer Zellen hatten. Zum Einen wurde Linsidominchlorhydrat-1 (SIN-1), was äquimolar NO und Superoxidanionen freisetzt und zum Anderen Diethyltriamin (DETA), was einen reinen NO-Donator darstellt, verwendet. Die Inkubationszeit betrug jeweils 24 Stunden.

Es konnte erneut ein signifikanter Anstieg der radioaktiven 2-Deoxyglucoseaufnahme unter Insulinstimulation der Kontroll-Adipozyten ohne NO-Donator erreicht werden. Der relative Insulineffekt betrug ca. $53\% \pm 12,4\%$ (MW \pm SD). Es stellte sich sowohl unter DETA-, als auch unter SIN-1- Stimulation ein signifikanter Anstieg der basalen 2-Deoxyglucoseaufnahme von $99,9\% \pm 8\%$ bzw. $32,2\% \pm 7,8\%$ dar. Der relative Insulineffekt unter DETA-Stimulation betrug im Mittel nur noch $29,7\%$ und unter SIN-1 $32,4\%$. Dies stellte keine weitere signifikante Steigerung der 2-DOG-Aufnahme dar. Es konnte demzufolge eine signifikante Zunahme der basalen 2-DOG-Aufnahme unter Stimulation der NO-Donatoren, aber gleichzeitig eine Hemmung des Insulin vermittelten Effektes beobachtet werden.

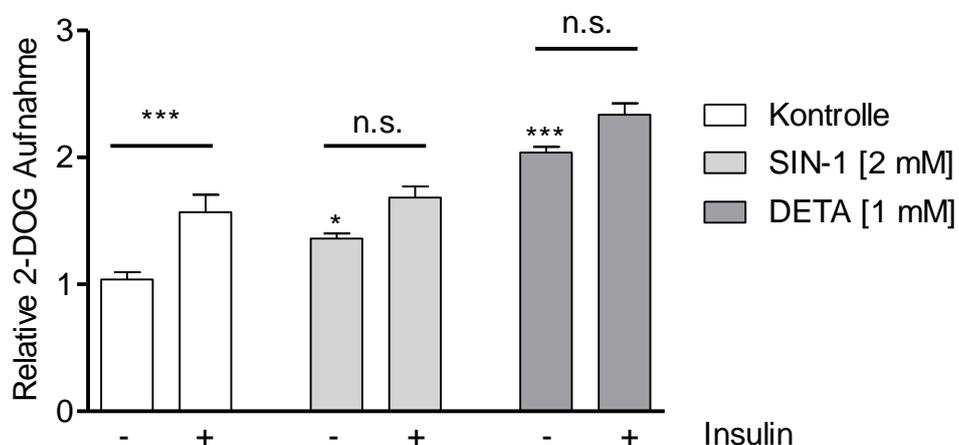


Abbildung 22: 2-Deoxyglucoseaufnahme unter 24-stündiger Stimulation mit den NO-Donatoren SIN-1 und DETA in 3T3-L1. Abgebildet wurde jeweils die relative 2-DOG-Aufnahme zur Kontrolle. $n = 6$, *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle, * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, n.s. nicht signifikante Insulinstimulation.

Demzufolge sollte anschließend untersucht werden, welchen Einfluss die wichtigsten Dimethylarginine ADMA und SDMA auf die Glucoseaufnahme bzw. auf die Expression von Molekülen der Insulinsignaltransduktionskaskade haben.

4.3 Einfluss von ADMA auf die 3T3-L1-Adipozyten

4.3.1 mRNA-Expression

Zunächst wurde der Einfluss von ADMA auf die mRNA-Expression von IRS-1, IRS-2, GLUT4 und Akt bestimmt. Die Zellen wurden dafür nach Abschluss der Differenzierung für 24 Stunden mit ADMA in den Konzentration 5, 25 und 100 μM inkubiert und danach für drei Stunden gehungert (vgl. Abschnitt 3.1.2). Anschließend wurde, wie zuvor beschrieben, die RNA aus den Zellen gewonnen und zur weiteren Analyse vorbereitet. Die PCR Analyse wurde im 324-Well-Format in Doppelbestimmung der einzelnen Proben durchgeführt und jeweils die Expression zur Kontrolle, ohne ADMA Inkubation, berechnet. Die Differenzierung wurde mikroskopisch und über Expression von FABP4 kontrolliert. Diese blieb in den verschiedenen Wells konstant (Daten nicht gezeigt).

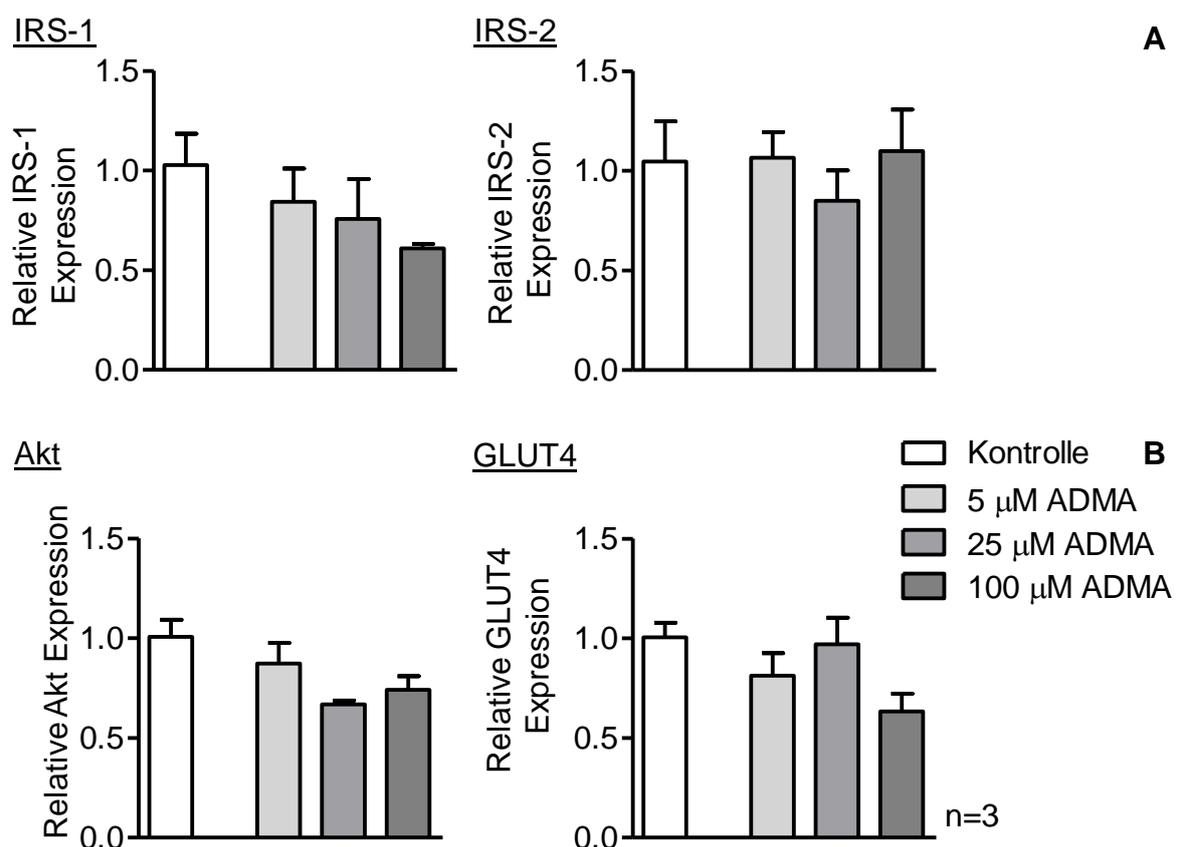


Abbildung 23: Einfluss von ADMA auf die mRNA-Expression in 3T3-L1. Darstellung als relative Expression zur Kontrolle. 24-stündige Inkubation mit 5 μM , 25 μM und 100 μM ADMA, n=3, Auftragung der Proben in Doppelbestimmung.

Es zeigte sich keine signifikante Änderung der mRNA-Expression von IRS-1, IRS-2 (vgl. Abbildung 23 A). Der mRNA-Gehalt des Glucosetransporters GLUT4, sowie von

Akt blieb unter 24-stündiger ADMA Inkubation konstant (vgl. Abbildung 23 B). Auch die Expression des Insulin unabhängigen Glucosetransporters GLUT1 blieb unverändert (Daten nicht gezeigt).

4.3.2 Proteinexpression

Vorherige Daten zeigten, dass NO-Spezies teilweise direkt die Proteinexpression reduzieren bzw. über Nitrierung oder Nitrosylierung eine Inaktivierung bewirken. Daher galt es, den Einfluss von Dimethylargininen auf die Proteinexpression der Insulinsignalkaskade der 3T3-L1-Adipozyten zu untersuchen. Zunächst soll der Einfluss von ADMA dargestellt werden. Dafür wurden die Targets der Insulinsignalkaskade mittels Western Blot analysiert.

Die Zellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät, differenziert und für 24 Stunden mit 5, 25 oder 100 μM ADMA inkubiert. Anschließend wurden sie für drei Stunden mit Hungermedium versetzt und gegebenenfalls eine weitere halbe Stunde mit Insulin stimuliert. Danach wurde, wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben, das Protein gewonnen, aliquotiert und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren. In den Western Blot Analysen wurden jeweils 50 μg Protein pro Tasche und je zwei Wells der jeweiligen Inkubation (Insulin, Insulin + 5 μM , + 25 μM , + 100 μM ADMA), aufgetragen. Bei den durch Insulin hochregulierten Targets (pAkt, Erk-1/Erk-2) wurde zusätzlich eine Kontrolle aus nicht mit Insulin stimulierten Zellen desselben Versuchsaufbaus aufgetragen, um den Insulineffekt zu überprüfen.

IRS-1 / IRS-2

Die IRS-1 und IRS-2 Expression wurde durch 24-stündige ADMA Inkubation nicht signifikant verändert (vgl. Abbildung 24).

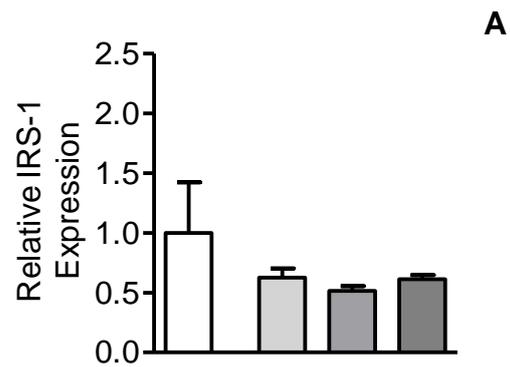
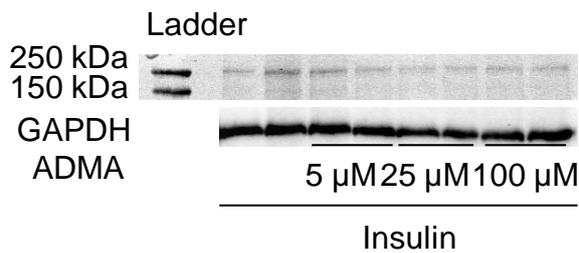
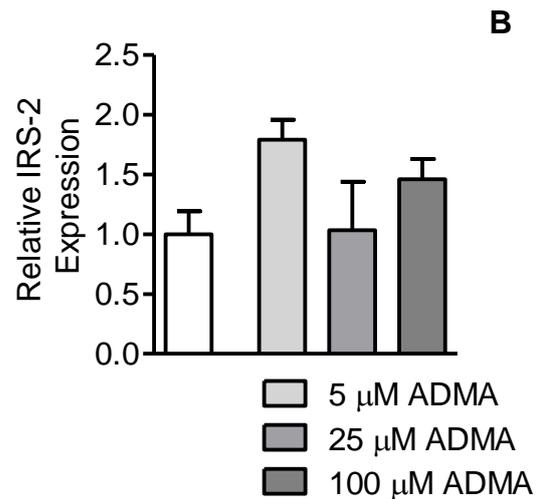
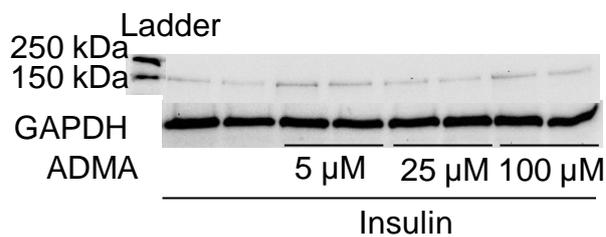
IRS-1 (180 kDa) ProteinexpressionIRS-2 (185 kDa) Proteinexpression

Abbildung 24: Western Blot Analyse der IRS-1 und IRS-2 Proteinexpression in 3T3-L1. Es wurde jeweils 50 μg Protein aus zwei Wells aufgetragen. Die Grafen zeigen die densitometrische Auswertung der Banden in Relation zur Ladungskontrolle und zu den nur mit Insulin stimulierten Zellen.

pAkt / Akt

Der Phosphorylierungsstatus der Proteinkinase B (Akt) diente als wichtiger Indikator für die akuten Effekte von Insulin auf die Zellen. Durch halbstündige Insulinstimulation sah man bei konstantem Gehalt des Gesamtproteins Akt eine Zunahme der phosphorylierten und damit aktiven Form pAkt. Die zusätzliche Inkubation mit ADMA zeigte keine Veränderung des Gesamt- bzw. des phosphorylierten Akt (vgl. Abbildung 25 A und B).

GLUT4

Die Proteinanalyse von dem Insulin abhängigen Glucosetransporter (GLUT4) zeigte ebenfalls keine Veränderung der Expression in Abhängigkeit von der ADMA-Inkubation (vgl. Abbildung 26).

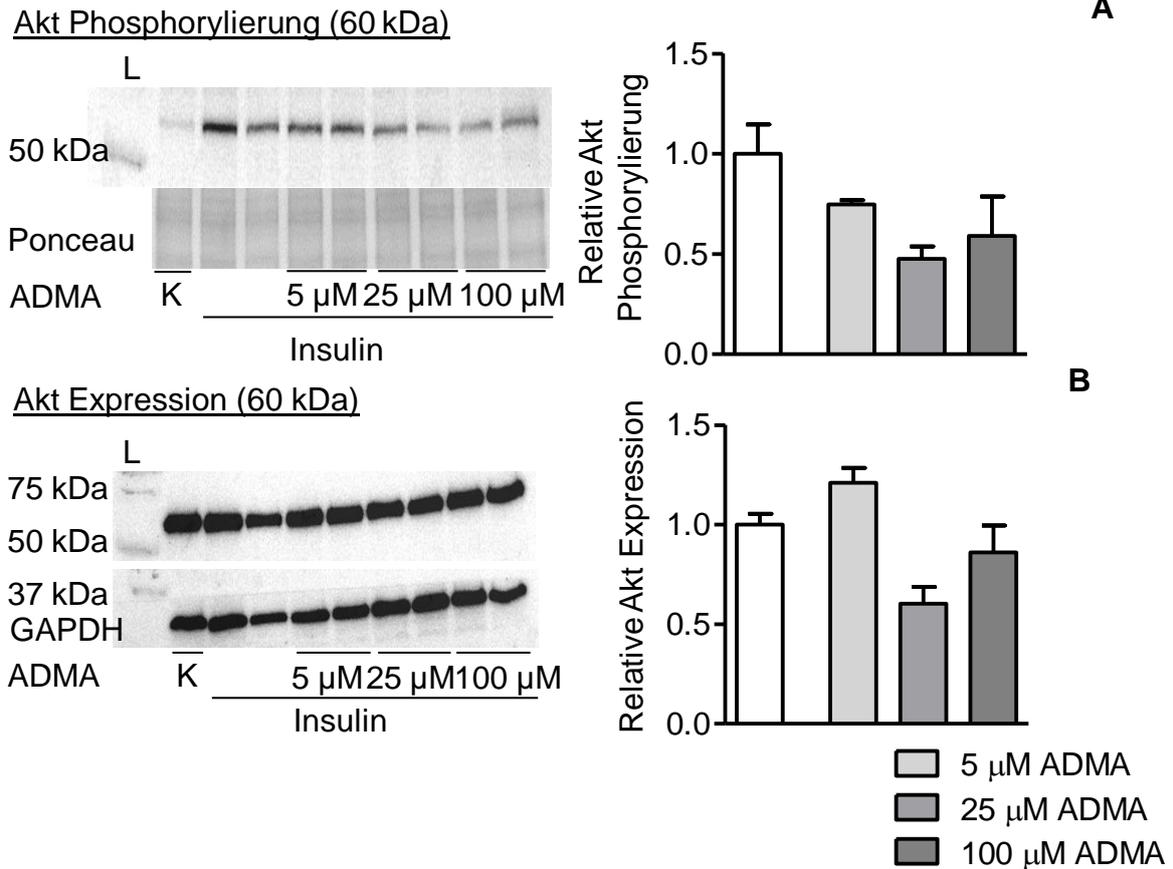


Abbildung 25: Western Blot des Akt bzw. pAkt in 3T3-L1: Es wurde jeweils 50 μg Protein aufgetragen. Die Grafen zeigen die densitometrische Auswertung der Banden in Relation zur Ladungskontrolle und zu den nur mit Insulin stimulierten Zellen. Zur Kontrolle der Insulinstimulation wurde jeweils eine Kontrollprobe ohne ADMA- und Insulinstimulation aufgetragen (K), (L) Ladder.

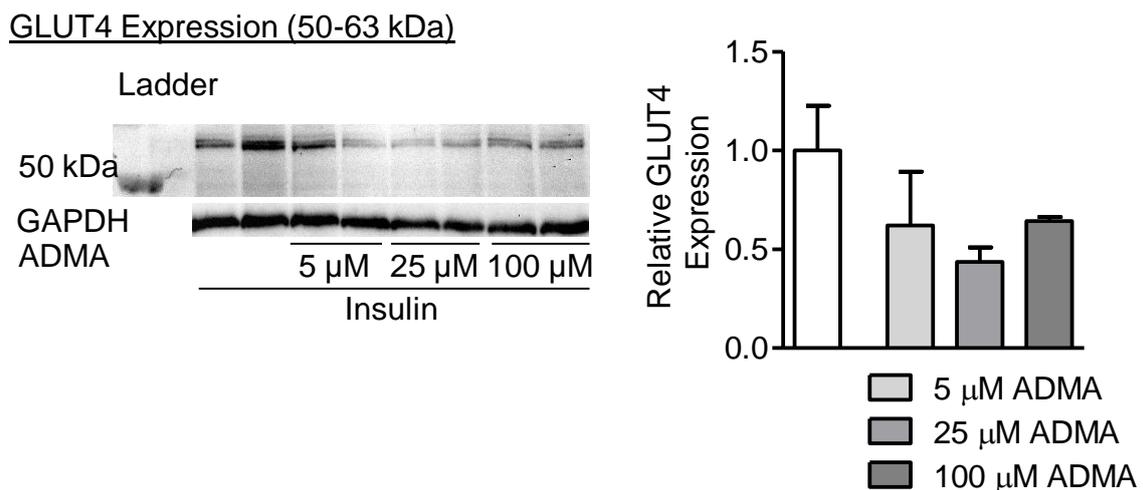


Abbildung 26: Western Blot Analyse der GLUT4 Expression in 3T3-L1. Aufgetragen wurden 50 μg Protein aus je zwei Wells. Grafen als densitometrische Auswertung der Banden in Relation zur Ladungskontrolle und zu den nur mit Insulin stimulierten Zellen.

4.3.3 Radioaktive 2-Deoxyglucoseaufnahme

Um den Einfluss von ADMA auf die Funktion der 3T3-L1-Adipozyten zu ermitteln, wurden radioaktive 2-DOG-Aufnahme Versuche durchgeführt. Die relative Zunahme der 2-DOG-Aufnahme durch Insulinstimulation betrug 64,3% bei der Kontrolle, 68,3% unter 5 μM ADMA, 60,6% unter 25 μM ADMA und 62,9% unter 100 μM ADMA (vgl. Abbildung 27). Dies sind konstante, hoch signifikante Insulineffekte. ADMA zeigte in den Experimenten keinen Einfluss auf den Insulineffekt. Die basale 2-Deoxyglucoseaufnahme blieb ebenfalls unabhängig von der ADMA Inkubation.

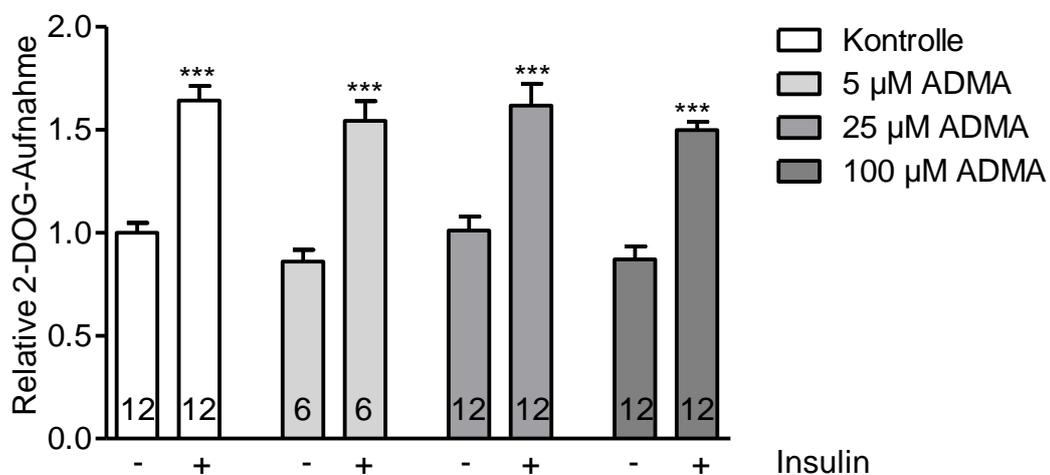


Abbildung 27: Relative 2-DOG von 3T3-L1-Adipozyten unter 24-stündiger ADMA Inkubation: Darstellung als relative 2-DOG im Bezug zu den Kontroll-Wellen ohne ADMA- und Insulin-Stimulation. In den Balken stehen jeweils die verwendeten Anzahlen an Wells, *** $p < 0,001$ ohne vs. mit Insulin.

4.4 Einfluss von SDMA auf die 3T3-L1-Adipozyten

Als zweites wichtiges Dimethylarginin wurde der Einfluss von SDMA untersucht. Es wurden wiederum mRNA-, Protein- und Funktionsanalysen durchgeführt.

4.4.1 mRNA-Expression

Zunächst wird der Einfluss von SDMA auf die mRNA-Expression der wichtigsten Moleküle der Insulinsignalkaskade dargestellt. Die 3T3-L1 Zellen wurden wiederum zu Adipozyten differenziert, für 24 Stunden mit 5 μ M, 25 μ M und 100 μ M SDMA und dann mit Hungermedium inkubiert. Anschließend wurde RNA gewonnen und für die weiteren Untersuchungen verarbeitet. Im Folgenden ist die mRNA-Expression in Relation zu den Kontrollwerten dargestellt. Die gleichmäßige Differenzierung wurde mittels PCR Analyse des FABP4 kontrolliert (Daten nicht gezeigt). Die Targets IRS-1, IRS-2, Akt und GLUT4 zeigten keine signifikanten Expressionsveränderungen unter SDMA-Inkubation.

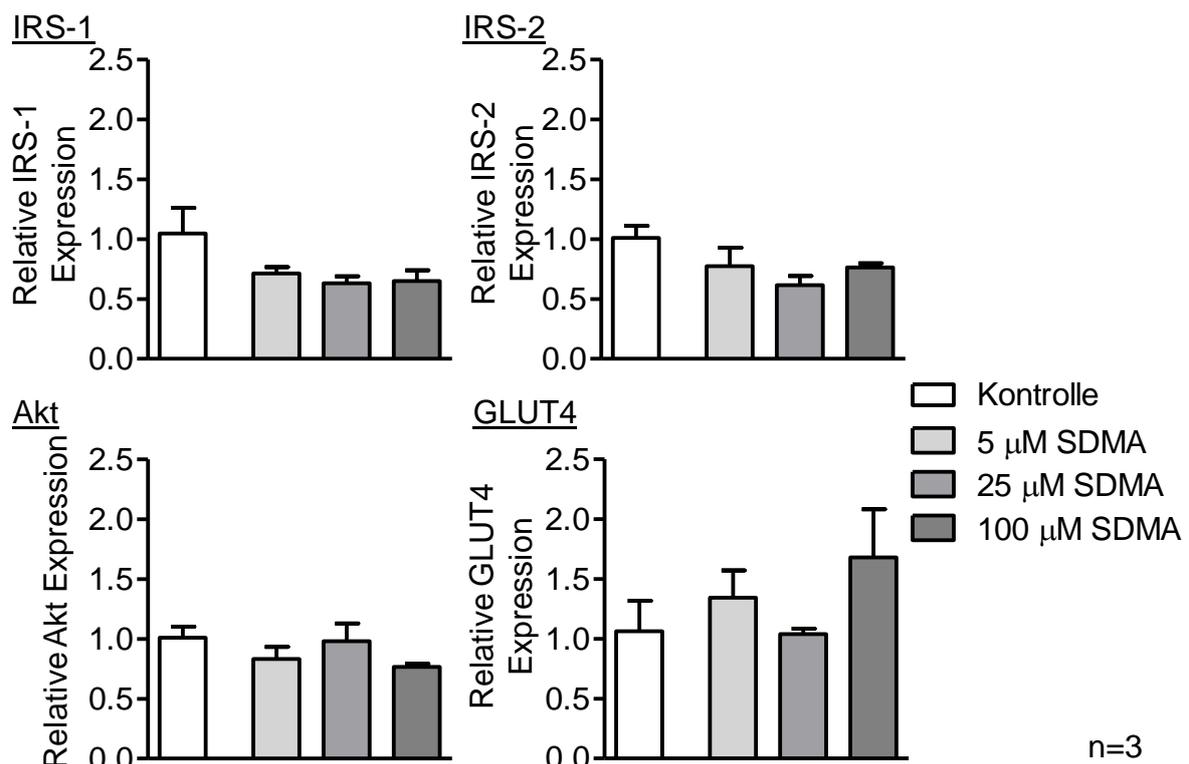


Abbildung 28: Einfluss von SDMA auf die mRNA-Expression in 3T3-L1. Darstellung als relative Expression zur Kontrolle. 24-stündige Inkubation mit 5 μ M, 25 μ M und 100 μ M SDMA, n=3, Auftragung der Proben in Doppelbestimmung.

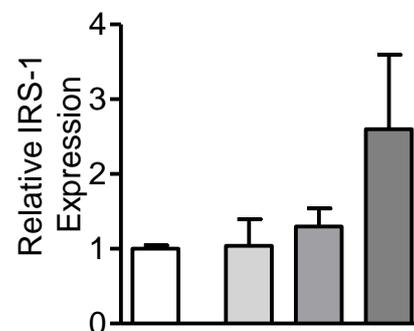
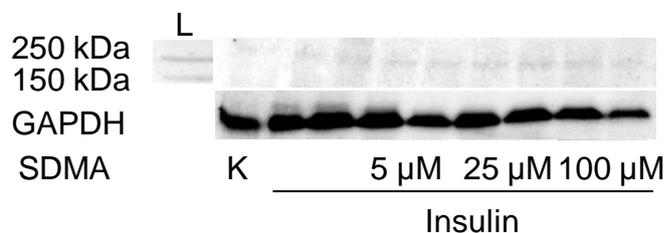
4.4.2 Proteinexpression

Analog zu den bereits durchgeführten Versuchen wurde anschließend der Einfluss von SDMA auf die Proteinexpression von 3T3-L1-Adipozyten untersucht. Es wurden die Targets IRS-1, IRS-2, GLUT4, sowie Akt und MAPK, inklusive deren Phosphorylierungsstatus im Western Blot überprüft.

IRS-1 / IRS-2

Es zeigte sich eine leichte, nicht signifikante Steigerung der IRS-1 Proteinexpression unter SDMA Inkubation (vgl. Abbildung 29 A). Hingegen blieb die IRS-2 Proteinexpression (vgl. Abbildung 29 B) konstant.

IRS-1 Proteinexpression (180 kDa)



IRS-2 Proteinexpression (185 kDa)

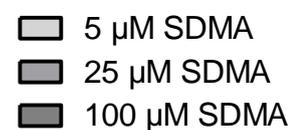
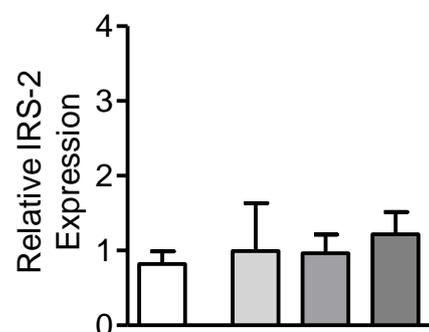
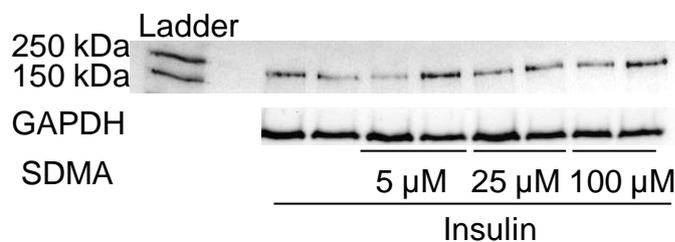


Abbildung 29: Western Blot Analyse IRS-1 und IRS-2 Expression in 3T3-L1. Es wurden jeweils 50 μ g Protein aus zwei Wells aufgetragen. Die Grafen zeigen die densitometrische Auswertung der Banden in Relation zur Ladungskontrolle (GAPDH) und der nur mit Insulin stimulierten Zellen. (L) Ladder, (K) Kontrolle.

pAkt / Akt

Durch halbstündige Insulinstimulation konnte man bei konstantem Gehalt des Gesamtproteins Akt eine Zunahme der phosphorylierten und damit aktiven Form pAkt beobachten. Die zusätzliche Inkubation mit SDMA zeigte keine Veränderung der Gesamtmenge an Akt-Protein (Abbildung 30 B). Es konnte ein leichter, jedoch nicht signifikanter Anstieg der Menge an phosphorylierten Akt ermittelt werden (vgl. Abbildung 30 A).

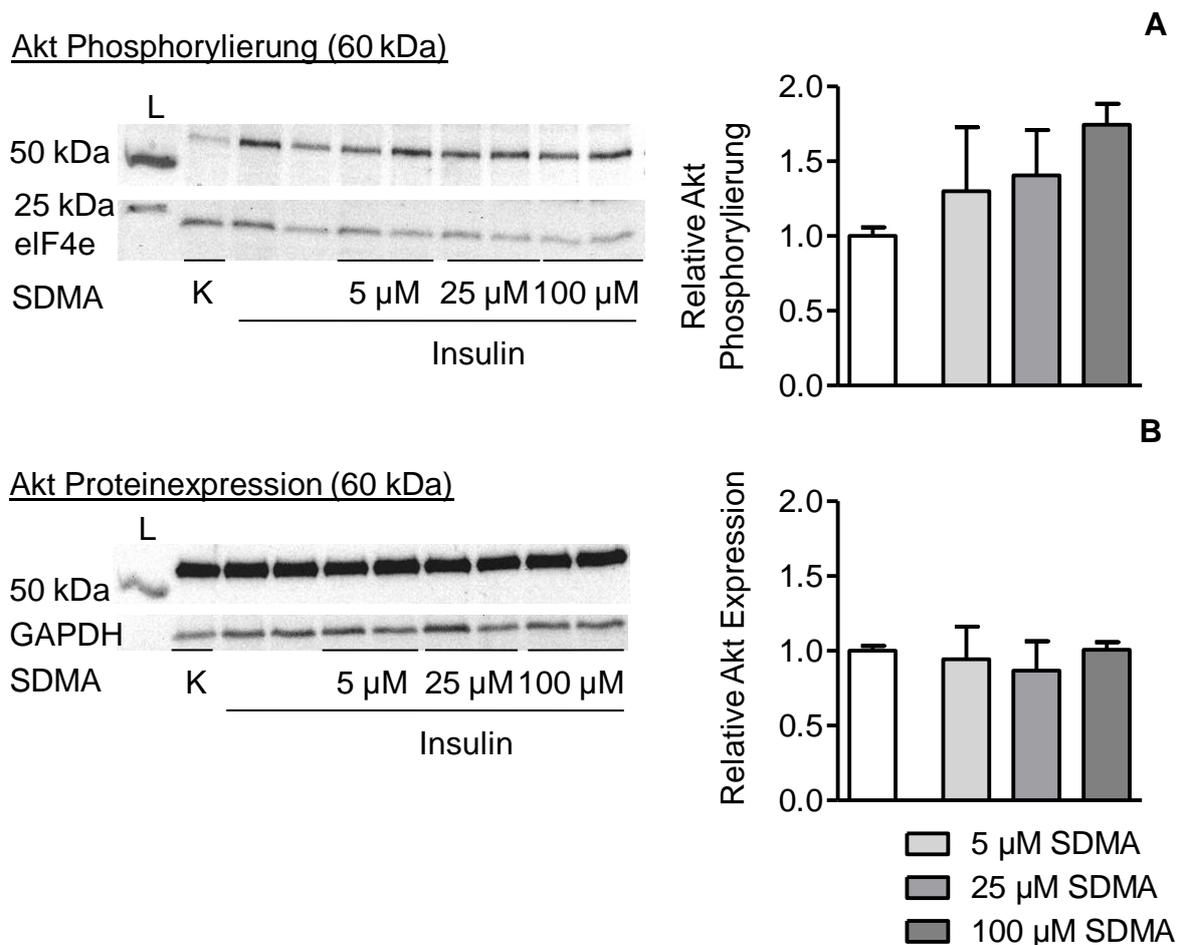


Abbildung 30: Western Blot Analyse der Akt Expression und Phosphorylierung in 3T3-L1. Es wurden jeweils 50 μ g Protein aus zwei Wells aufgetragen. Die Grafen zeigen die densitometrische Auswertung der Banden in Relation zur Ladungskontrolle (GAPDH und eIF4e) und den nur mit Insulin stimulierten Zellen. (L) Ladder, (K) Kontrolle.

GLUT4

Die Proteinexpression von GLUT4 blieb unter 24-stündiger SDMA Stimulation konstant.

GLUT4 Proteinexpression (50-63 kDa)

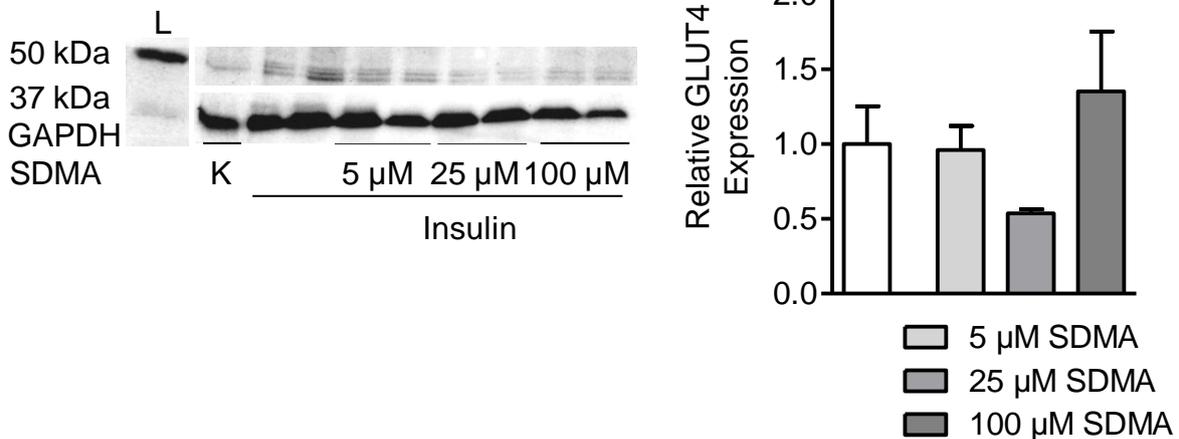


Abbildung 31: Western Blot Analyse der GLUT4 Expression in 3T3-L1. Es wurden jeweils 50 μ g Protein aus zwei Wells aufgetragen. Die Grafen zeigen die densitometrische Auswertung der Banden in Relation zur Ladungskontrolle (GAPDH) und der nur mit Insulin stimulierten Zellen. (L) Ladder, (K) Kontrolle.

4.4.3 Radioaktive 2-Deoxyglucoseaufnahme

Analog zu den ADMA Versuchen wurden 12-Well-Platten mit den jeweiligen SDMA Konzentrationen inkubiert und anschließend radioaktive 2-Deoxyglucoseaufnahme-Versuche durchgeführt. Unter SDMA Stimulation blieb die basale, Insulin unabhängige, 2-DOG-Aufnahme konstant. Es wurden bei allen SDMA Konzentrationen hoch signifikante Steigerungen ($***p < 0,001$) der 2-Deoxyglucoseaufnahme unter Insulinstimulation erzielt. Der relative Insulineffekt schien tendenziell leicht anzusteigen: 47,6% bei der Kontrolle, 66,7% bei 5 μ M SDMA, 79,4% bei 25 μ M SDMA und 63,8% bei 100 μ M SDMA. Dieser unterschied sich statistisch signifikant bei 25 μ M SDMA von der Kontrolle (vgl. Abbildung 32).

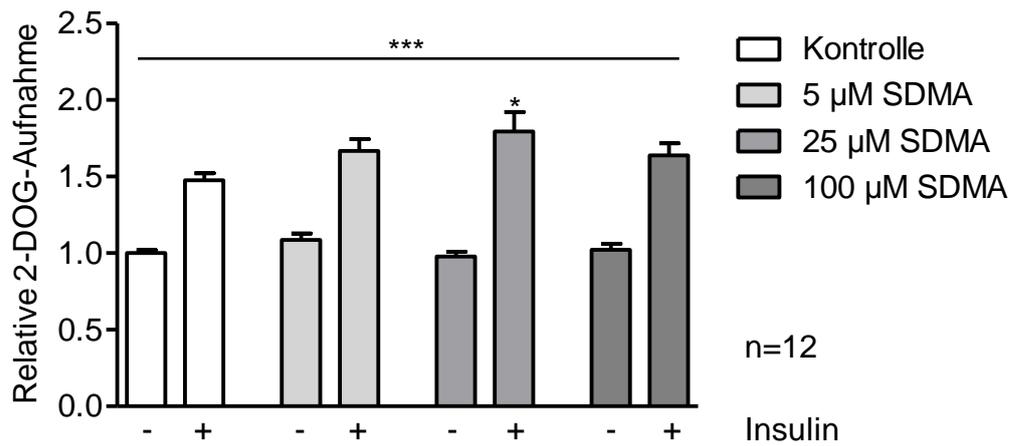


Abbildung 32: Relative 2-DOG-Aufnahme von 3T3-L1-Adipozyten unter 24-stündiger SDMA Inkubation. Gezeigt wird die relative 2-Deoxyglucoseaufnahme im Bezug zu Kontroll-Wells ohne SDMA und Insulinstimulation, * $p < 0,05$ vs. Kontrolle + Insulin, *** $p < 0,001$ Insulin vs. Kein Insulin.

5 Diskussion

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Beeinflussung der Insulinsensitivität durch Argininderivate in einem geeigneten Zellkultursystem. Es wurde der Einfluss von ADMA und SDMA auf die Insulinsignalkaskade auf Transkriptions-, Translations- und funktioneller Ebene untersucht. Zudem sollte ein möglicher Zusammenhang über den NO-Stoffwechsel erforscht werden. Dabei wurde der Effekt von NO-Donatoren auf die Glucoseaufnahme in dem verwendeten Zellkultursystem bestimmt.

5.1 Zellkultursysteme

L6 Myozyten

Die L6 Zellen sind eine etablierte Zellkulturlinie, in denen bereits vielfältige Untersuchungen zur Insulinsignalkaskade durchgeführt wurden. In den Untersuchungen zur Charakterisierung und Etablierung in unserem Labor, stellten wir in unseren Zellen allerdings einige Probleme fest. In den L6 Zellen konnte zwar die Expression von wichtigen Targets der Insulinsignalkaskade: IRS-1, IRS-2 und Akt, sowie dessen Aktivierung zu pAkt durch Insulin, nachgewiesen werden, allerdings war die Expression des GLUT4-Transporters instabil. Als mögliche Ursache für diese Beobachtung vermuteten wir einen mit jeder Passagierung zunehmenden Verlust der Differenzierungsfähigkeit. Aus diesem Grund wurde, zusätzlich zu den mikroskopischen Kontrollen, der Differenzierungsmarker CK-M in der PCR Analyse bestimmt. Diese Untersuchungen deuteten eine gleichmäßige Reifung der Zellen an. Die Transportversuche zeigten hingegen insgesamt nur geringe Insulineffekte von etwa 17% (vgl. Abschnitt 4.1.1.3). In der Literatur wurden bei den L6 Zellen Verdopplungen der Glucoseaufnahme durch Insulinstimulation erreicht (Ueyama et al., 1999). Unregelmäßigkeiten in der Glucoseaufnahme wurden jedoch ebenfalls beobachtet und deswegen Zellkulturen mit GLUT4-Überexpression empfohlen. Die Kopplung an ein myc-Epitop erlaubt dabei sogar die Beobachtung der intrazellulären Verteilung des Transporters in der konfokalen Mikroskopie (Antonescu et al., 2008). Andererseits erschwert die Überexpression die Unterscheidung der physiologischen Signalwege von der pathophysiologischen (Über-)Stimulation des GLUT4

Transporters. Unter Abwägung der verschiedenen Vor- und Nachteile entschieden wir uns schließlich, ein anderes Zellkultursystem zu verwenden.

3T3-L1-Adipozyten

In den 3T3-L1-Adipozyten konnten wir höhere, ca. 50-70%ige Steigerungen der Glucoseaufnahme unter Insulinstimulation erzielen. Diese waren zuverlässig reproduzierbar, aber ebenfalls geringer als in der Literatur beschrieben, wo bis zu 10-fache Erhöhungen erzielt werden konnten (Ueyama et al., 1999). Die Targets in der Insulinsignaltransduktionskaskade (IRS-1/2, Akt, GLUT4) konnten stabil in der mRNA-, sowie Proteinanalyse nachgewiesen werden (vgl. Abschnitt 4.1.2). Der GLUT4-Transporter war dabei ebenfalls erst nach der Differenzierung auf mRNA- Ebene nachweisbar, was die Wichtigkeit der ausreichenden Reifung auch dieser Zelllinie verdeutlichte. Zusätzlich zur mikroskopischen Kontrolle wurden daher Primer für den Differenzierungsmarker FABP4 der Fettzellen zur PCR Analyse designt und in allen Proben bestimmt. Auf diese Art konnte die gleichförmige Differenzierung in den verschiedenen Wells kontrolliert werden.

In der Proteinanalyse des GLUT4 zeigten sich bei den differenzierten Adipozyten zwei Banden auf der erwarteten Höhe zwischen 50-63 kDa (vgl. Abbildung 20, Seite 52). Bei den Fibroblasten waren zwei höher gelegene, wahrscheinlich unspezifische Banden zu erkennen. Möglicherweise war das durch den Antikörper bedingt. Der monoklonale Mouse-Antikörper, der für die L6 Blots verwendet wurde, hatte auf Grund der Spezieshomologie zwischen Blot und Antikörper (beides Mouse) nicht gebunden. Daraufhin wurde der polyklonale GLUT4 Rabbit-Antikörper verwendet, der etwas unspezifischer sein könnte. Es wäre auch denkbar, dass der GLUT4-Transporter in den Fibroblasten noch in einer anderen Konfiguration vorlag. Dies war aber auf Grund der Tatsache, dass er noch nicht auf mRNA-Ebene nachweisbar war, eher unwahrscheinlich. Insgesamt konnte in den differenzierten 3T3-L1-Adipozyten eine konstante GLUT4 Expression festgestellt werden. Die Zellen zeigten zudem im Transportversuch eine gute Insulinsensitivität (vgl. Abschnitt 4.1.2.3), sodass die weiteren Analysen in diesem Zellkultursystem fortgeführt wurden.

5.2 Einfluss von ADMA

In unseren Versuchen konnte keine Beeinflussung von ADMA auf die mRNA- oder Proteinexpression der Insulinsignaltransduktionskaskade festgestellt werden. Auch auf die Glucoseaufnahme nahm die vorherige ADMA Inkubation keinen Einfluss (vgl. Abschnitt 4.3).

Diese Daten sind konträr zu denen von Yang et al. (2009), die nach ADMA Inkubation sowohl eine Verringerung der GLUT4-mRNA, als auch des IRS-1-Proteins und des membranständigen GLUT4-Transporters sahen. Mit steigenden ADMA-Konzentrationen zeigte sich bei ihnen daher eine verschlechterte Glucoseaufnahme. Diese Effekte konnten nach Zugabe von Vitamin E rückgängig gemacht werden, indem es die Aktivität der DDAH, als ADMA abbauendes Enzym, hochregulierte (Saran et al., 2003).

Möglicherweise waren diese zu unseren Ergebnissen widersprüchlichen Daten durch die längere Inkubation mit ADMA bedingt, welche 48 Stunden in deren Versuchsaufbau betrug. Jedoch sollten sich auch nach weniger als 24 Stunden auf mRNA Ebene sowie in Bezug auf Phosphorylierungsreaktionen bereits mögliche Einflüsse zeigen. Im Unterschied zu unseren Versuchen zeigten Yang et al. den membrangebundenen GLUT4-Anteil. Dies ist mit Hilfe einer Ultrazentrifugation des Proteinlysats möglich. Die konstanten 2-Deoxyglucoseaufnahmeraten in unseren Radioaktivversuchen machten eine funktionell relevante Veränderung dieses Anteils des GLUT4-Transporters aber ebenfalls unwahrscheinlich.

5.3 Einfluss von SDMA

SDMA zeigte keinen Effekt auf die mRNA-Expression der Targets in der Insulinsignaltransduktionskaskade (vgl. Abschnitt 4.4.1). Auf Proteinebene sah man eine leichte jedoch nicht signifikante Steigerung der IRS-1-Expression und der Akt-Phosphorylierung (vgl. Abschnitt 4.4.2). Es konnten zudem wiederholt leichte Steigerungen der 2-DOG-Aufnahme unter Insulin bei vorheriger Inkubation mit SDMA gegenüber den nur mit Insulin stimulierten Kontrollen beobachtet werden. Die basale 2-DOG-Aufnahme blieb hingegen unter allen SDMA-Konzentrationen konstant. In dem dargestellten Versuch betrug der Insulineffekt bei der Kontrolle jedoch nur 47,6%, sodass sich die signifikante Steigerung der

Glucoseaufnahme mit 25 μM SDMA wahrscheinlich durch die vergleichsweise schwache Insulinwirkung bei der Kontrolle bedingt ist. Dies scheint wiederum durch unterschiedliche Differenzierung der Wells bedingt zu sein. Aus Gründen des Strahlenschutzes konnten in den Radioaktivproben keine Differenzierungsmarker bestimmt werden. Es zeigten sich jedoch wiederholt leicht fördernde Einflüsse von SDMA auf die Insulin stimulierte Glucoseaufnahme.

Diese Effekte waren möglicherweise durch die Hemmung der Arginin-Aufnahme und damit einer verminderten NO-Produktion in der Zelle bedingt. Daraufhin könnte es zu einer geringeren Modulation der Insulinsignalkaskade durch NO-Spezies gekommen sein. Der grundlegende Mechanismus bleibt jedoch unklar. Die SDMA-Konzentrationen sind in vivo weitaus geringer (Abhary et al., 2009, Bode-Böger et al., 2006) und die Effekte waren recht gering. Wir denken daher, dass SDMA keinen bedeutenden Einfluss auf die Insulinsignalkaskade oder den Glucosetransport nimmt.

5.4 Diabetes mellitus und iNOS Transfektion

In vorherigen Arbeiten wurde gezeigt, dass Hyperglycämie zu einer Hochregulation der iNOS und zu einer verminderten Bildung der DDAH und eNOS führt (Sorrenti et al., 2006). Es konnten dabei bereits verschiedene Zusammenhänge der iNOS Expression und des nitrosativen Stresses mit Krankheitszuständen, wie Arteriosklerose (Detmers et al., 2000), neurodegenerativen Erkrankungen (Liberatore et al., 1999) und Insulinresistenz (Sugita et al., 2005, Perreault and Marette, 2001) beobachtet werden. Alle Arbeiten sahen die iNOS als Teil einer chronischen Mikroinflammation, die die Entstehung und Progression dieser Krankheiten zumindest teilweise bedingte. Ein chronisch erhöhter Blutzuckerspiegel scheint somit einen Entzündungsreiz im Organismus darzustellen, der unter anderem über reaktive Nitrogen-Spezies zu einer verminderten Insulinsensitivität führt. Experimentell konnten dies beispielsweise Yasukawa et al. (2005) belegen, indem sie eine durch Nitrosylierung bedingte Inaktivierung von Akt mit anschließender Insulinresistenz nachwiesen. In anderen Arbeiten wurde nach Zugabe von NO-Donatoren eine Nitrierung der Tyrosinreste des IRS-1 gesehen (Nomiyama et al., 2004). Durch empfindliche Störung der Signalkaskade wurde dadurch eine Abnahme der Insulinsensitivität erzeugt (vgl. Abbildung 33).

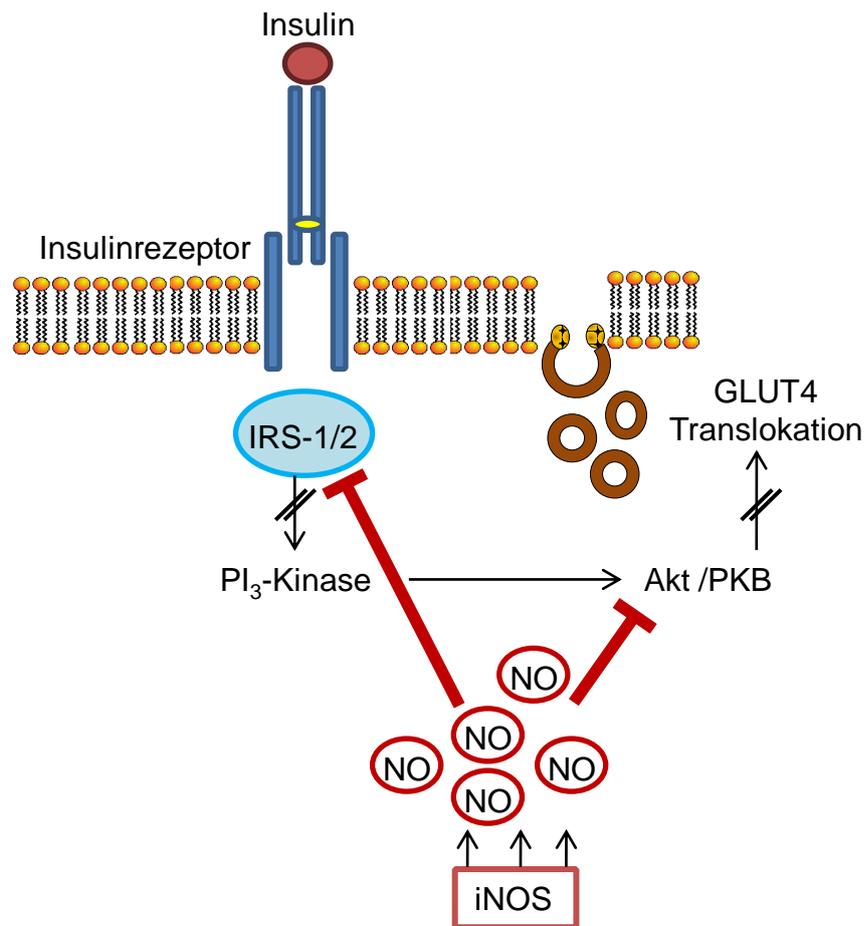


Abbildung 33: Durch iNOS vermittelte Hemmung der Insulinsignalkaskade, eigene Darstellung.

In anderen Arbeiten konnten diese Effekte durch Gabe eines NOS-Inhibitors (Tsuchiya et al., 2007) oder durch sportliche Betätigung wieder umgekehrt werden (Pauli et al., 2008).

Im Tiermodell der *iNOS*^{-/-}-Maus konnte beispielsweise eine verbesserte Insulinsensitivität erreicht werden. Die *iNOS*^{-/-}-Mäuse hatten dabei im Vergleich zu Wildtyp-Tieren trotz diabetogener hochkalorischer Diät geringere Nitrosylierungen am Insulinrezeptor, IRS-1 und Akt (Carvalho-Filho et al., 2006).

Eine Überexpression könnte hingegen ein vielversprechendes Modell zur Induktion chronischer Mikroinflammation sein. Interessant wäre hierbei, inwiefern die *iNOS* Expression die Insulinsensitivität beeinflusst. Bisherige Studien, in denen eine *iNOS* Transfektion versucht wurde, dienten vor allem der Untersuchung von Auswirkungen auf die Gefäße nach Stentimplantation (Tzeng et al., 1996, Shears et al., 1998). In diesen Experimenten konnte eine Hemmung der neointimalen

Hyperplasie bei iNOS transfizierten Zellen nach Ballondilatation erreicht werden, was in dem Fall allerdings für die vasoprotektiven Eigenschaften von NO sprach.

Sugita, et al (2005) gelang die Transfektion der iNOS in C₂C₁₂ Myoblasten, in denen es dadurch zu einer Degradation des IRS-1 und damit zu einer Störung in der Insulinsignaltransduktionskaskade kam. Das Zellkulturmodell, in dem dies gelang, ist allerdings problematisch. Die C₂C₁₂ Zellen werden häufig für Untersuchungen der Insulinsignalkaskade verwendet. Eine Darstellung der Funktion bzw. der GLUT4 Expression ist allerdings nicht möglich (Kotliar and Pilch, 1992), sodass man die Übertragbarkeit in vivo in Frage stellen muss.

In unseren 3T3-L1-Zellen ist eine iNOS Überexpression leider nicht gelungen, da die Zellen unter dem Einfluss des starken Transfektionsreagenz starben, bzw. anschließend nicht mehr differenzierten. Ein Einbringen der Fremd-DNA in die L6 Zellen war zunächst erfolgreich, allerdings konnte das Protein in den Western Blot Analysen nicht nachgewiesen werden (vgl. Abschnitt 4.1.1.4). Dies ist möglicherweise auf eine fehlende Translation des eingebrachten Vektors zurückzuführen. Eine Nitritproduktion konnte daher in den transfizierten L6 Zellen nicht erreicht werden. Wir haben zudem verschiedene andere chemisch-physikalische Transfektionsreagenzien ausgetestet. Es gelang allerdings mit keinem eine erfolgreiche Transfektion auf mRNA und Proteinebene in den L6 oder 3T3-L1 Zellen.

Die Transfektion der HEK-293-Zellen ist gelungen und in ihnen konnte mittels des Griess Assays nach 48 Stunden eine signifikante Nitritproduktion beobachtet werden (vgl. Abbildung 15, Seite 48). Bedauerlicherweise sind diese Zellen nicht für Untersuchungen der Insulinsignalkaskade geeignet. Um differenzierende Zellen wie die 3T3-L1-Adipozyten erfolgreich zu transfizieren, wäre wahrscheinlich ein adenovirales Konstrukt nötig. Diese haben eine höhere Transfektionseffektivität als mechanische Versuche (Luo and Saltzman, 2000). Eventuell wäre dies auch ein erfolgversprechender Ansatz in einem Zellmodell mit Primärzellen oder einem Tierversuch. Diese zeichnen sich durch eine bessere Übertragbarkeit auf den Menschen aus.

Eine andere Möglichkeit wäre die Verwendung eines Zytokincocktails aus Tumor Nekrose Faktor α (TNF α), Lipopolysaccharid (LPS) und Interferon- γ , welcher eine iNOS Induktion und NO-Produktion bewirkt (Bedard et al., 1997). Diese Zytokine

sind bekannte Entzündungsmediatoren. In dem Versuch von Bedard et al. konnte unter iNOS Induktion durch den Zytokincocktail eine Steigerung der GLUT1 und eine Hemmung der GLUT4 Expression mit konsekutiver Insulinresistenz beobachtet werden. Nachteil dieses Ansatzes ist, dass man bei einem solchen Ansatz Störfaktoren nicht ausschließen kann. Man aktiviert verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden und kann somit nicht sicher sagen, dass die beobachteten Effekte eine spezifische iNOS Wirkung sind.

5.5 Einfluss von NO-Donatoren

Um dennoch einen Einfluss von NO in dem verwendeten Zellkultursystem der 3T3-L1-Adipozyten zu untersuchen, verwendeten wir verschiedene NO-Donatoren: SIN-1 setzt äquimolar NO und Superoxidanionen frei, DETA ist ein reiner NO-Donator. In den Transportversuchen konnte sowohl unter Zugabe von SIN-1, als auch von DETA eine Steigerung der basalen Glucoseaufnahme festgestellt werden (vgl. Abschnitt 4.2).

Diese Daten sind ähnlich zu denen von Tanaka, Nakatani et al. (2003), die eine Steigerung der Glucoseaufnahme unter Zugabe des NO-Donators Nitroprussidnatrium (sodium nitroprusside, SNP) zeigen konnten. Sie war unabhängig von der IRS-1- und Akt-Phosphorylierung. Zudem blieb der Proteingehalt des membranständigen GLUT1-Transporters konstant, sodass die Autoren von einem Insulinsignalkaskade unabhängigen, aber GLUT4 abhängigen Effekt von NO auf die Zellen ausgingen.

Ein Weg zu gesteigerter Glucoseaufnahme in vivo wäre die NO vermittelte Vasodilatation (Balon and Nadler, 1997, Etgen et al., 1997, Young et al., 1997). Steinberg et al. (1994) wiesen sogar nach, dass ein Teil der Insulinwirkung über die NO-Freisetzung mediiert wird. Die folgende Vasodilatation führt dabei zu einer besseren Versorgung des peripheren Gewebes mit Nährstoffen. Da es in unserem Zellkulturmodell allerdings keine Gefäße gibt, die die Durchblutung und damit auch die Glucoseaufnahme steigern könnten, vermuten wir, dass NO auch Prozesse auf zellulärer Ebene stimuliert.

Lira et al. (2007) konnten eine Stimulation der GLUT4 Expression durch NO-Donatoren über eine Aktivierung der AMP-Kinase (5'-Adenosinmonophosphat-aktivierte Kinase) zeigen. Dies stellt einen weiteren möglichen Signalweg der Insulin unabhängigen verbesserten Glucoseaufnahme dar (vgl. Abbildung 34). Die

AMPK ist ein heterotrimeres Enzym, welches die Zelle vor Energiemangel schützt. Adenosinmonophosphat ist das Abbauprodukt von ATP (Adenosintriphosphat), also ein geeigneter Indikator für den Energiebedarf der Zelle (Hardie and Carling, 1997). Die Kinase kann den zellulären Energiehaushalt somit unter anderem über die Expression des GLUT4-Transporters steuern, der für die Aufnahme von Glucose in die Zelle verantwortlich ist. Problem der Arbeit von Lira et. al war die Darstellung des Einflusses auf die funktionelle Bedeutsamkeit. Sie haben eine Modulation von NO auf die Insulinsignalkaskade gezeigt, jedoch nicht ob dies auch eine Steigerung der Glucoseaufnahme bewirkt. Dafür müsste man die Translokation der GLUT4 Transporter oder eben die radioaktive Glucoseaufnahme untersuchen.

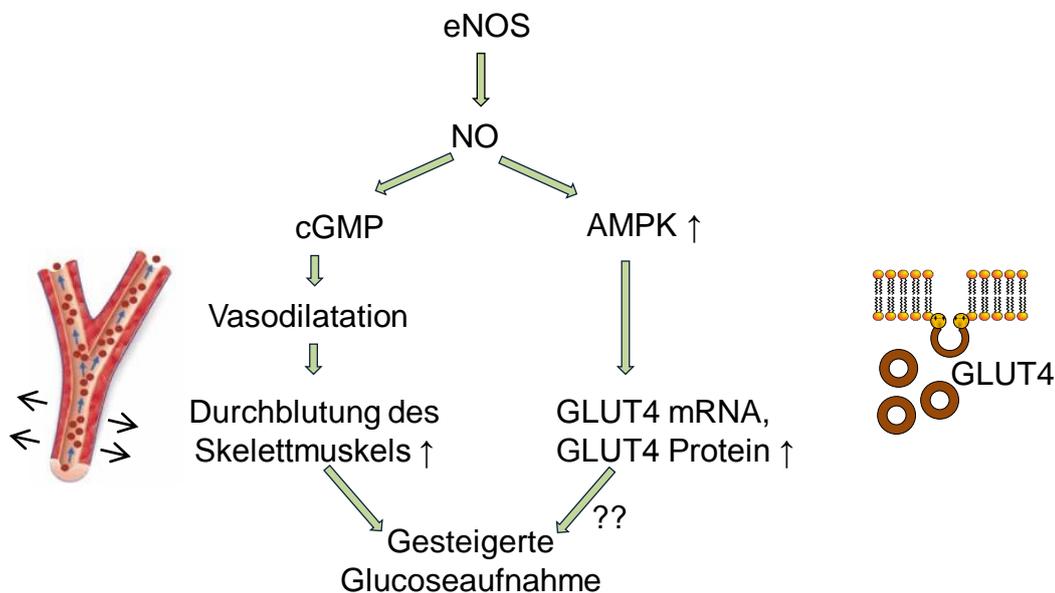


Abbildung 34: eNOS vermittelte Steigerung der Glucoseaufnahme, AMPK Adenosinmonophosphat stimulierte Kinase, eigene Darstellung.

DETA steigerte die basale Glucoseaufnahme in unseren Versuchen stärker, als SIN-1 dies vermochte ($99,9 \pm 8\%$ vs. $32,2 \pm 7,8\%$, vgl. Abbildung 35).

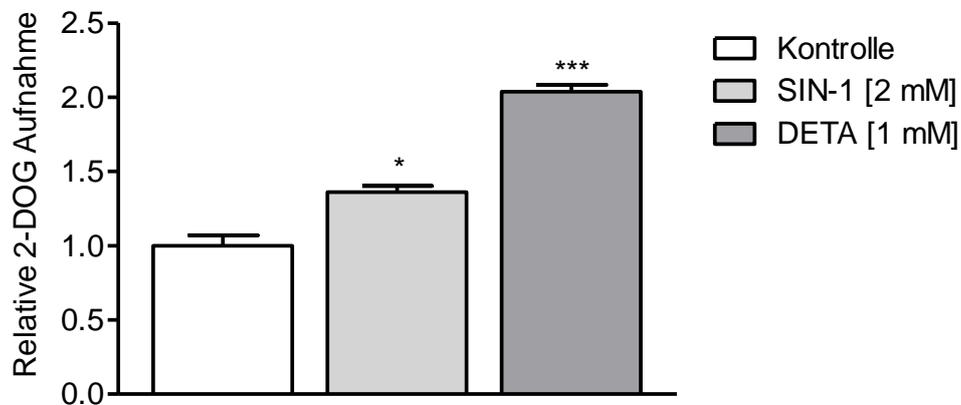


Abbildung 35: Veränderung der basalen 2-Deoxyglucoseaufnahme unter Stimulation mit NO-Donatoren. Darstellung als relative Einheiten zur Kontrolle, $n = 6$, * $p \leq 0,05$, *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle.

Dies unterstützt die Hypothese, dass NO sowohl diabetogene, als auch antidiabetogene Wirkungen haben kann. Da SIN-1 äquimolar NO und Superoxid freisetzt, was miteinander schnell zu Peroxinitrit reagiert, könnte es sich durch Nitrierungsprozesse von Proteinen selbst in seiner Wirkung hemmen. So sorgte möglicherweise das freiwerdende NO für eine verstärkte Translokation von GLUT4 in die Zellmembran. Das entstandene Peroxinitrit führte aber gleichzeitig zu einer Nitrierung von intrazellulären Signalmolekülen. Die effektive Steigerung der Glucoseaufnahme fiel dadurch geringer aus, als bei dem reinen NO-Donator DETA.

In den Versuchen von Nomiya et al. (2004) zeigte sich sogar eine ausschließliche Hemmung der Insulin stimulierten Glucoseaufnahme unter Zugabe von SIN-1. Diese widersprüchlichen Ergebnisse könnten durch unterschiedlich hohe Freisetzungsraten von NO und Superoxid und daher an entstehendem Peroxinitrit bedingt sein. In unseren Versuchen wurde also möglicherweise mehr NO als Peroxinitrit gebildet, was im Gegensatz zu den Beobachtungen von Nomiya et al., aber im geringeren Maßstab als DETA, zu einer Steigerung der Insulin unabhängigen 2-DOG-Aufnahme führte. Unterschiede könnten sich aber auch durch die unterschiedlichen Inkubationszeiten mit SIN-1 (12 Stunden in deren und 24 Stunden in unserem Versuchsaufbau) ergeben.

Der zusätzliche Insulineffekt war in unseren Versuchen bei beiden NO-Donatoren nicht signifikant (vgl. Abbildung 36).

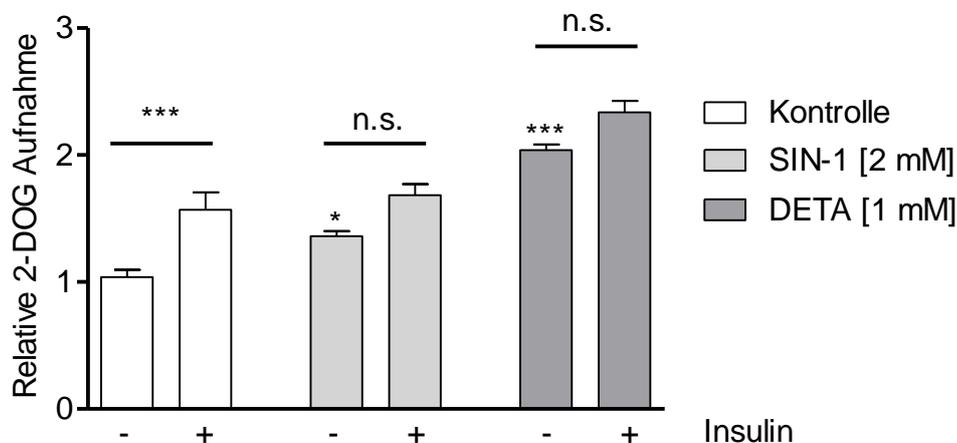


Abbildung 36: 2-Deoxyglucosetransport unter Stimulation der NO Donatoren SIN-1 und DETA in 3T3-L1. Darstellung als relative 2-DOG-Aufnahme zur Kontrolle, $n = 6$, $***p \leq 0,001$ vs. Kontrolle, $*p \leq 0,05$ vs. Kontrolle, n.s. nicht signifikante Insulinstimulation.

5.6 Ausblick

Diabetes mellitus, insbesondere Typ 2, ist eine stetig mehr an Bedeutung gewinnende Erkrankung. Vor allem in den westlichen Industrienationen wird es durch den Bewegungsmangel und die Fehl- bzw. Überernährung zu einer starken Zunahme der Anzahl von Diabetikern kommen. Die *International Diabetes Federation* geht von einem Anstieg von 366 Millionen (2011) auf 552 Millionen (2030) Betroffenen weltweit aus. Den größten Anteil wird weiterhin der Typ 2 Diabetes mellitus ausmachen, dessen Pathophysiologie trotz intensiver Forschung noch nicht ganz verstanden ist. Eine kausale Behandlung fehlt deshalb noch. Bisherige Therapieansätze verfolgen vor allem die exogene Zufuhr von Insulin oder die Gabe von Sekretagoga, was den Circulus vitiosus aus Hyperinsulinämie und Insulinresistenz vermutlich noch verstärkt. Medikamente, die die Insulinsensitivität des peripheren Gewebes steigern, sind mögliche Ansatzpunkte für die zukünftige Diabetestherapie.

Glitazone stellten beispielsweise einen vielversprechenden Versuch zur medikamentösen Verbesserung der Insulinsensitivität dar. Über Aktivierung des *Peroxisome proliferator-activated receptor γ* (PPAR γ), der verschiedene Stoffwechselprozesse aktiviert, wurde eine erhöhte Empfindlichkeit der Zellen auf

Insulinstimulation erzielt. Damit wurde eine Senkung der Blutglucose ohne große Gefahr einer Hypoglycämie erreicht. Leider stellte sich in späteren klinischen Studien ein höheres Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse heraus (Nissen and Wolski, 2007). Fast alle Glitazone mussten daher unter Erregung großen öffentlichen Interesses vom Markt genommen werden. Dies stellte einen herben Rückschlag in der Entwicklung neuer Antidiabetika dar.

Mögliche andere Ansatzpunkte zur Verbesserung der Insulinsensitivität wurden in dieser Arbeit angedeutet. Die Bekämpfung der chronischen Mikroinflammation oder die spezifischere NO Abgabe durch Regulation der verschiedenen NO-Synthasen (von der Leyen and Dzau, 2001) sind dabei mögliche Forschungsansätze. Gerade bei kritisch kranken Patienten könnte die Untersuchung der inflammatorischen Prozesse zu einer Verbesserung der intensivmedizinischen Versorgung führen.

Man sollte andererseits nicht außer Acht lassen, dass gerade der Typ 2 Diabetes mellitus eine sogenannte Zivilisationskrankheit ist. Eine kalorienarme Ernährung, vermehrte sportliche Aktivität, sowie ein frühzeitiges Entdecken der Krankheit (z.B. durch HbA1c Screening) könnten wahrscheinlich die Anzahl der diabetischen Komplikationen verringern. Verbesserte Aufklärung und Ernährungsschulungen, sowie die Motivation zu sportlicher Betätigung sind daher neben der weiteren Erforschung wichtig für die Eindämmung der Diabetesepidemie.

6 Zusammenfassung

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine experimentelle Untersuchung der Einflüsse von Argininderivaten auf die Insulinsignalkaskade im Zellkulturmodell. Das asymmetrische (ADMA) und das symmetrische Dimethylarginin (SDMA) sind Argininderivate, die physiologisch durch postrtranslationale Modifikation von Proteinen entstehen. Insbesondere ADMA hat sich durch Hemmung der Stickstoffmonoxid (NO) Synthese in den letzten Jahren als unabhängiger Risikofaktor für Mortalität in verschiedenen Zusammenhängen von Arteriosklerose herausgestellt. Diabetes mellitus ist eine chronische Stoffwechselerkrankung, die einen bedeutsamen Risikofaktor für kardiovaskuläre Ereignisse darstellt. Studien über Zusammenhänge zwischen ADMA und Diabetes mellitus lieferten bisher widersprüchliche Ergebnisse. Der entscheidende verbindende Ansatzpunkt scheint der Einfluss auf den NO-Stoffwechsel zu sein. NO kann zum Einen vasodilatativ, anti-atherogen und fördernd auf die Glucoseaufnahme wirken, auf der anderen Seite kann es über Nitrierungs- bzw. Nitrosylierungsreaktionen zur Inaktivierung von Proteinen und Insulinresistenz führen. ADMA kann alle NO-Synthasen hemmen und vermag somit je nach Grundzustand des Organismus fördernd oder hemmend auf die Insulinsensitivität wirken. Auch ein eigener Einfluss von Argininderivaten auf die Insulinsignalkaskade konnte bisher nicht ausgeschlossen werden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl ADMA, als auch SDMA, als (patho-)physiologisch bedeutsame Argininderivate keinen Einfluss auf die Insulinsensitivität im Zellkulturmodell haben. Die Expression wichtiger Targets der Insulinsignaltransduktionskaskade (IRS-1/2, Akt/PKB, GLUT4) blieb sowohl auf Transkriptions-, als auch auf Translationsebene unter Stimulation mit den Argininderivaten konstant. Sie veränderten zudem nicht die basale oder die Insulin stimulierte Glucoseaufnahme. NO, aus verschiedenen NO-Donatoren freigesetzt, war dagegen in unseren Versuchen in der Lage die basale Glucoseaufnahme in Zellen zu erhöhen. Die zusätzliche Insulinstimulation konnte die Glucoseaufnahme nicht signifikant steigern, was als Insulinresistenz gesehen werden kann. Der Einfluss von Argininderivaten auf ein Mikroinflammationsmodell, zum Beispiel einem iNOS überexprimierendem Zellsystem, wäre ein viel versprechender Ansatz zur Erforschung der Pathomechanismen der Insulinresistenz.

7 Anhang

7.1 Literaturverzeichnis

- 1) ABBASI, F., ASAGMI, T., COOKE, J. P., LAMENDOLA, C., MCLAUGHLIN, T., REAVEN, G. M., STUEHLINGER, M. & TSAO, P. S. 2001. Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine are increased in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol*, 88, 1201-3.
- 2) ABHARY, S., KASMERIDIS, N., BURDON, K. P., KUOT, A., WHITING, M. J., YEW, W. P., PETROVSKY, N. & CRAIG, J. E. 2009. Diabetic retinopathy is associated with elevated serum asymmetric and symmetric dimethylarginines. *Diabetes Care*, 32, 2084-6.
- 3) ABHOLZ, H. D., ANLAUF, M., FRITSCHKA, E., HALLER, H., HALLER, N., HASSLACHER, C., HEEMANN, U., HEMMING, B., LANDGRAF, R., MAYER, C., MENNE, J., POMMER, W., RAHN, K. H., ROTHE, U., RÜMENAPF, G., SPRANGER, J., TEPE, G. & VIEBAHN, R. 2011. Nierenerkrankungen bei Diabetes im Erwachsenenalter. *Nationale VersorgungsLeitlinie*, 1.3, 1-169.
- 4) ANDERSSOHN, M., SCHWEDHELM, E., LÜNEBURG, N., VASAN, R. S. & BÖGER, R. H. 2010. Asymmetric dimethylarginine as a mediator of vascular dysfunction and a marker of cardiovascular disease and mortality: an intriguing interaction with diabetes mellitus. *Diab Vasc Dis Res*, 7, 105-18.
- 5) ANTONESCU, C. N., RANDHAWA, V. K. & KLIP, A. 2008. Dissecting GLUT4 traffic components in L6 myocytes by fluorescence-based, single-cell assays. *Methods Mol Biol*, 457, 367-78.
- 6) ANTONIADES, C., SHIRODARIA, C., LEESON, P., ANTONOPOULOS, A., WARRICK, N., VAN-ASSCHE, T., CUNNINGTON, C., TOUSOULIS, D., PILLAI, R., RATNATUNGA, C., STEFANADIS, C. & CHANNON, K. M. 2009. Association of plasma asymmetrical dimethylarginine (ADMA) with elevated vascular superoxide production and endothelial nitric oxide synthase uncoupling: implications for endothelial function in human atherosclerosis. *Eur Heart J*, 30, 1142-50.
- 7) ARCHULETA, T. L., LEMIEUX, A. M., SAENGSIRISUWAN, V., TEACHEY, M. K., LINDBORG, K. A., KIM, J. S. & HENRIKSEN, E. J. 2009. Oxidant stress-induced loss of IRS-1 and IRS-2 proteins in rat skeletal muscle: role of p38 MAPK. *Free Radic Biol Med*, 47, 1486-93.
- 8) BALON, T. W. & NADLER, J. L. 1997. Evidence that nitric oxide increases glucose transport in skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 82, 359-63.
- 9) BECKMAN, J. S. & KOPPENOL, W. H. 1996. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol*, 271, C1424-37.
- 10) BEDARD, S., MARCOTTE, B. & MARETTE, A. 1997. Cytokines modulate glucose transport in skeletal muscle by inducing the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biochem J*, 325 (Pt 2), 487-93.
- 11) BODE-BÖGER, S. M., SCALERA, F., KIELSTEIN, J. T., MARTENS-LOBENHOFFER, J., BREITHARDT, G., FOBKER, M. & REINECKE, H. 2006. Symmetrical dimethylarginine: a new combined parameter for renal

- function and extent of coronary artery disease. *J Am Soc Nephrol*, 17, 1128-34.
- 12) BOGDAN, C. 2001. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol*, 2, 907-16.
 - 13) BÖGER, R. H. 2006. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk marker in cardiovascular medicine and beyond. *Ann Med*, 38, 126-36.
 - 14) BÖGER, R. H., SULLIVAN, L. M., SCHWEDHELM, E., WANG, T. J., MAAS, R., BENJAMIN, E. J., SCHULZE, F., XANTHAKIS, V., BENNDORF, R. A. & VASAN, R. S. 2009. Plasma asymmetric dimethylarginine and incidence of cardiovascular disease and death in the community. *Circulation*, 119, 1592-600.
 - 15) BÖHM, B. O., DREYER, M., FRITSCHKE, A., FÜCHTENBUSCH, M., GÖLZ, S. & MARTIN, S. 2011. Therapie des Typ-1-Diabetes. 1.0, 1-115.
 - 16) BUNDESÄRZTEKAMMER (BÄK), K. B. K., ARBEITSGEMEINSCHAFT DER WISSENSCHAFTLICHEN MEDIZINISCHEN FACHGESELLSCHAFTEN (AWMF). 2013. Nationale VersorgungsLeitlinie Therapie des Typ-2-Diabetes – Langfassung, 1. Auflage. Version 1. 2013. Available from: http://www.versorgungsleitlinien.de/themen/diabetes2/dm2_Therapie; [cited: 10.09.2013]; DOI: 10.6101/AZQ/000145. 1-253.
 - 17) CARAVATTI, M., PERRIARD, J. C. & EPPENBERGER, H. M. 1979. Developmental regulation of creatine kinase isoenzymes in myogenic cell cultures from chicken. Biosynthesis of creatine kinase subunits M and B. *J Biol Chem*, 254, 1388-94.
 - 18) CARVALHO-FILHO, M. A., UENO, M., CARVALHEIRA, J. B., VELLOSO, L. A. & SAAD, M. J. 2006. Targeted disruption of iNOS prevents LPS-induced S-nitrosation of IRbeta/IRS-1 and Akt and insulin resistance in muscle of mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 291, E476-82.
 - 19) CARVALHO-FILHO, M. A., UENO, M., HIRABARA, S. M., SEABRA, A. B., CARVALHEIRA, J. B., DE OLIVEIRA, M. G., VELLOSO, L. A., CURTI, R. & SAAD, M. J. 2005. S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1, and protein kinase B/Akt: a novel mechanism of insulin resistance. *Diabetes*, 54, 959-67.
 - 20) CREAGER, M. A., LUSCHER, T. F., COSENTINO, F. & BECKMAN, J. A. 2003. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part I. *Circulation*, 108, 1527-32.
 - 21) DANAEI, G., FINUCANE, M. M., LU, Y., SINGH, G. M., COWAN, M. J., PACIOREK, C. J., LIN, J. K., FARZADFAR, F., KHANG, Y. H., STEVENS, G. A., RAO, M., ALI, M. K., RILEY, L. M., ROBINSON, C. A. & EZZATI, M. 2011. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. *Lancet*, 378, 31-40.
 - 22) DARLEY-USMAR, V. M., HOGG, N., O'LEARY, V. J., WILSON, M. T. & MONCADA, S. 1992. The simultaneous generation of superoxide and nitric oxide can initiate lipid peroxidation in human low density lipoprotein. *Free Radic Res Commun*, 17, 9-20.

- 23) DETMERS, P. A., HERNANDEZ, M., MUDGETT, J., HASSING, H., BURTON, C., MUNDT, S., CHUN, S., FLETCHER, D., CARD, D. J., LISNOCK, J., WEIKEL, R., BERGSTROM, J. D., SHEVELL, D. E., HERMANOWSKI-VOSATKA, A., SPARROW, C. P., CHAO, Y. S., RADER, D. J., WRIGHT, S. D. & PURE, E. 2000. Deficiency in inducible nitric oxide synthase results in reduced atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Immunol*, 165, 3430-5.
- 24) DEVANGELIO, E., SANTILLI, F., FORMOSO, G., FERRONI, P., BUCCIARELLI, L., MICHETTI, N., CLISSA, C., CIABATTONI, G., CONSOLI, A. & DAVI, G. 2007. Soluble RAGE in type 2 diabetes: association with oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 43, 511-8.
- 25) DUGANI, C. B. & KLIP, A. 2005. Glucose transporter 4: cycling, compartments and controversies. *EMBO Rep*, 6, 1137-42.
- 26) ETGEN, G. J., JR., FRYBURG, D. A. & GIBBS, E. M. 1997. Nitric oxide stimulates skeletal muscle glucose transport through a calcium/contraction- and phosphatidylinositol-3-kinase-independent pathway. *Diabetes*, 46, 1915-9.
- 27) GIANI, G., JANKA, H. U., HAUNER, H., STANDL, E., SCHIEL, R., NEU, A., RATHMANN, W. & ROSENBAUER, J. 2004. Epidemiologie und Verlauf des Diabetes mellitus in Deutschland. *Evidenzbasierte Leitlinie DDG*, 12.
- 28) GIUSTARINI, D., ROSSI, R., MILZANI, A. & DALLE-DONNE, I. 2008. Nitrite and nitrate measurement by Griess reagent in human plasma: evaluation of interferences and standardization. *Methods Enzymol*, 440, 361-80.
- 29) GREEN, H. & MEUTH, M. 1974. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell*, 3, 127-33.
- 30) GUZIK, T. J., MUSSA, S., GASTALDI, D., SADOWSKI, J., RATNATUNGA, C., PILLAI, R. & CHANNON, K. M. 2002. Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*, 105, 1656-62.
- 31) HARDIE, D. G. & CARLING, D. 1997. The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell? *Eur J Biochem*, 246, 259-73.
- 32) HENSLEY, K., MOU, S. & PYE, Q. N. 2003. Nitrite Determination by Colorimetric and Fluorimetric Griess Diazotization Assays. *Methods in Biological Oxidative Stress Methods in Pharmacology and Toxicology*. Springer Science & Business Media.
- 33) HIGAKI, Y., HIRSHMAN, M. F., FUJII, N. & GOODYEAR, L. J. 2001. Nitric oxide increases glucose uptake through a mechanism that is distinct from the insulin and contraction pathways in rat skeletal muscle. *Diabetes*, 50, 241-7.
- 34) IDF 2013. IDF's Diabetes Atlas, 5th Edition. International Diabetes Federation.
- 35) ITO, A., EGASHIRA, K., NARISHIGE, T., MURAMATSU, K. & TAKESHITA, A. 2002. Angiotensin-converting enzyme activity is involved in the mechanism of increased endogenous nitric oxide synthase inhibitor in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circ J*, 66, 811-5.

- 36) KANEKI, M., SHIMIZU, N., YAMADA, D. & CHANG, K. 2007. Nitrosative stress and pathogenesis of insulin resistance. *Antioxid Redox Signal*, 9, 319-29.
- 37) KERNER, W. & BRÜCKEL, J. 2011. Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus. In: DDG:, KELLERER, M. & MATTHAEI, S. (eds.) *Diabetologie und Stoffwechsel*. Georg Thieme Verlag KG.
- 38) KIELSTEIN, J. T., SALPETER, S. R., BODE-BOEGER, S. M., COOKE, J. P. & FLISER, D. 2006. Symmetric dimethylarginine (SDMA) as endogenous marker of renal function--a meta-analysis. *Nephrol Dial Transplant*, 21, 2446-51.
- 39) KIM, C., NEWTON, K. M. & KNOPP, R. H. 2002. Gestational diabetes and the incidence of type 2 diabetes: a systematic review. *Diabetes Care*, 25, 1862-8.
- 40) KLIP, A. 2009. The many ways to regulate glucose transporter 4. *Appl Physiol Nutr Metab*, 34, 481-7.
- 41) KOTLIAR, N. & PILCH, P. F. 1992. Expression of the glucose transporter isoform GLUT 4 is insufficient to confer insulin-regulatable hexose uptake to cultured muscle cells. *Mol Endocrinol*, 6, 337-45.
- 42) KRZYZANOWSKA, K., MITTERMAYER, F., WOLZT, M. & SCHERNTHANER, G. 2007. Asymmetric dimethylarginine predicts cardiovascular events in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 30, 1834-9.
- 43) KUO, P. C. & SCHROEDER, R. A. 1995. The emerging multifaceted roles of nitric oxide. *Ann Surg*, 221, 220-35.
- 44) LAJER, M., TARNOW, L., JORSAL, A., TEERLINK, T., PARVING, H. H. & ROSSING, P. 2008. Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine (ADMA) predicts cardiovascular morbidity and mortality in type 1 diabetic patients with diabetic nephropathy. *Diabetes Care*, 31, 747-52.
- 45) LIBERATORE, G. T., JACKSON-LEWIS, V., VUKOSAVIC, S., MANDIR, A. S., VILA, M., MCAULIFFE, W. G., DAWSON, V. L., DAWSON, T. M. & PRZEDBORSKI, S. 1999. Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. *Nat Med*, 5, 1403-9.
- 46) LILLIOJA, S., MOTT, D. M., SPRAUL, M., FERRARO, R., FOLEY, J. E., RAVUSSIN, E., KNOWLER, W. C., BENNETT, P. H. & BOGARDUS, C. 1993. Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin-dependent diabetes mellitus. Prospective studies of Pima Indians. *N Engl J Med*, 329, 1988-92.
- 47) LUO, D. & SALTZMAN, W. M. 2000. Synthetic DNA delivery systems. *Nat Biotechnol*, 18, 33-7.
- 48) MITSUMOTO, Y. & KLIP, A. 1992. Development regulation of the subcellular distribution and glycosylation of GLUT1 and GLUT4 glucose transporters during myogenesis of L6 muscle cells. *J Biol Chem*, 267, 4957-62.
- 49) MOORE, D. J., GREGORY, J. M., KUMAH-CRYSTAL, Y. A. & SIMMONS, J. H. 2009. Mitigating micro- and macro-vascular complications of diabetes beginning in adolescence. *Vasc Health Risk Manag*, 5, 1015-31.

- 50) NASRAWAY, S. A., JR. 2006. Hyperglycemia during critical illness. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 30, 254-8.
- 51) NISSEN, S. E. & WOLSKI, K. 2007. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. *N Engl J Med*, 356, 2457-71.
- 52) NOMIYAMA, T., IGARASHI, Y., TAKA, H., MINEKI, R., UCHIDA, T., OGIHARA, T., CHOI, J. B., UCHINO, H., TANAKA, Y., MAEGAWA, H., KASHIWAGI, A., MURAYAMA, K., KAWAMORI, R. & WATADA, H. 2004. Reduction of insulin-stimulated glucose uptake by peroxynitrite is concurrent with tyrosine nitration of insulin receptor substrate-1. *Biochem Biophys Res Commun*, 320, 639-47.
- 53) PAIVA, H., LEHTIMAKI, T., LAAKSO, J., RUOKONEN, I., RANTALAIHO, V., WIRTA, O., PASTERNAK, A. & LAAKSONEN, R. 2003. Plasma concentrations of asymmetric-dimethyl-arginine in type 2 diabetes associate with glycemic control and glomerular filtration rate but not with risk factors of vasculopathy. *Metabolism*, 52, 303-7.
- 54) PATEL, R. P., LEVONEN, A., CRAWFORD, J. H. & DARLEY-USMAR, V. M. 2000. Mechanisms of the pro- and anti-oxidant actions of nitric oxide in atherosclerosis. *Cardiovasc Res*, 47, 465-74.
- 55) PAULI, J. R., ROPELLE, E. R., CINTRA, D. E., CARVALHO-FILHO, M. A., MORAES, J. C., DE SOUZA, C. T., VELLOSO, L. A., CARVALHEIRA, J. B. & SAAD, M. J. 2008. Acute physical exercise reverses S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1 and protein kinase B/Akt in diet-induced obese Wistar rats. *J Physiol*, 586, 659-71.
- 56) PERREAULT, M. & MARETTE, A. 2001. Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. *Nat Med*, 7, 1138-43.
- 57) PERTICONE, F., SCIACQUA, A., MAIO, R., PERTICONE, M., GALIANO LEONE, G., BRUNI, R., DI CELLO, S., PASCALE, A., TALARICO, G., GRECO, L., ANDREOZZI, F. & SESTI, G. 2010. Endothelial dysfunction, ADMA and insulin resistance in essential hypertension. *Int J Cardiol*, 142, 236-41.
- 58) RASSOW, D., NETZKER, HAUSER 2012. *Duale Reihe Biochemie*, Alexander Bob und Konstantin Bob.
- 59) REAVEN, G. M. 1993. Role of insulin resistance in human disease (syndrome X): an expanded definition. *Annu Rev Med*, 44, 121-31.
- 60) SADOWSKI, H. B., WHEELER, T. T. & YOUNG, D. A. 1992. Gene expression during 3T3-L1 adipocyte differentiation. Characterization of initial responses to the inducing agents and changes during commitment to differentiation. *J Biol Chem*, 267, 4722-31.
- 61) SARAN, R., NOVAK, J. E., DESAI, A., ABDULHAYOGLU, E., WARREN, J. S., BUSTAMI, R., HANDELMAN, G. J., BARBATO, D., WEITZEL, W., D'ALECY, L. G. & RAJAGOPALAN, S. 2003. Impact of vitamin E on plasma asymmetric dimethylarginine (ADMA) in chronic kidney disease (CKD): a pilot study. *Nephrol Dial Transplant*, 18, 2415-20.
- 62) SCHMIDT, H. H. & WALTER, U. 1994. NO at work. *Cell*, 78, 919-25.

- 63) SCHULZE, F., LENZEN, H., HANEFELD, C., BARTLING, A., OSTERZIEL, K. J., GOUDEVA, L., SCHMIDT-LUCKE, C., KUSUS, M., MAAS, R., SCHWEDHELM, E., STRODTER, D., SIMON, B. C., MUGGE, A., DANIEL, W. G., TILLMANN, H., MAISCH, B., STREICHERT, T. & BÖGER, R. H. 2006. Asymmetric dimethylarginine is an independent risk factor for coronary heart disease: results from the multicenter Coronary Artery Risk Determination investigating the Influence of ADMA Concentration (CARDIAC) study. *Am Heart J*, 152, 493 e1-8.
- 64) SCHWEDHELM, E., TAN-ANDRESEN, J., MAAS, R., RIEDERER, U., SCHULZE, F. & BÖGER, R. H. 2005. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the analysis of asymmetric dimethylarginine in human plasma. *Clin Chem*, 51, 1268-71.
- 65) SHANKAR, R. R., WU, Y., SHEN, H. Q., ZHU, J. S. & BARON, A. D. 2000. Mice with gene disruption of both endothelial and neuronal nitric oxide synthase exhibit insulin resistance. *Diabetes*, 49, 684-7.
- 66) SHEARS, L. L., 2ND, KIBBE, M. R., MURDOCK, A. D., BILLIAR, T. R., LIZONOVA, A., KOVESDI, I., WATKINS, S. C. & TZENG, E. 1998. Efficient inhibition of intimal hyperplasia by adenovirus-mediated inducible nitric oxide synthase gene transfer to rats and pigs in vivo. *J Am Coll Surg*, 187, 295-306.
- 67) SORRENTI, V., MAZZA, F., CAMPISI, A., VANELLA, L., LI VOLTI, G. & DI GIACOMO, C. 2006. High glucose-mediated imbalance of nitric oxide synthase and dimethylarginine dimethylaminohydrolase expression in endothelial cells. *Curr Neurovasc Res*, 3, 49-54.
- 68) STEINBERG, H. O., BRECHTEL, G., JOHNSON, A., FINEBERG, N. & BARON, A. D. 1994. Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation is nitric oxide dependent. A novel action of insulin to increase nitric oxide release. *J Clin Invest*, 94, 1172-9.
- 69) SUGAI, M., OHTA, A., OGATA, Y., NAKANISHI, M., UENO, S., KAWATA, T., SAITO, N. & TANAKA, Y. 2007. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) in the aqueous humor of diabetic patients. *Endocr J*, 54, 303-9.
- 70) SUGITA, H., FUJIMOTO, M., YASUKAWA, T., SHIMIZU, N., SUGITA, M., YASUHARA, S., MARTYN, J. A. & KANEKI, M. 2005. Inducible nitric-oxide synthase and NO donor induce insulin receptor substrate-1 degradation in skeletal muscle cells. *J Biol Chem*, 280, 14203-11.
- 71) SYDOW, K., MONDON, C. E., SCHRADER, J., KONISHI, H. & COOKE, J. P. 2008. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase overexpression enhances insulin sensitivity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28, 692-7.
- 72) SYDOW, K. & MÜNZEL, T. 2003. ADMA and oxidative stress. *Atheroscler Suppl*, 4, 41-51.
- 73) TANAKA, T., NAKATANI, K., MORIOKA, K., URAKAWA, H., MARUYAMA, N., KITAGAWA, N., KATSUKI, A., ARAKI-SASAKI, R., HORI, Y., GABAZZA, E. C., YANO, Y., WADA, H., NOBORI, T., SUMIDA, Y. & ADACHI, Y. 2003. Nitric oxide stimulates glucose transport through insulin-independent GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes. *Eur J Endocrinol*, 149, 61-7.

- 74) TORRES, S. H., DE SANCTIS, J. B., DE, L. B. M., HERNANDEZ, N. & FINOL, H. J. 2004. Inflammation and nitric oxide production in skeletal muscle of type 2 diabetic patients. *J Endocrinol*, 181, 419-27.
- 75) TRAN, C. T., LEIPER, J. M. & VALLANCE, P. 2003. The DDAH/ADMA/NOS pathway. *Atheroscler Suppl*, 4, 33-40.
- 76) TSUCHIYA, K., SAKAI, H., SUZUKI, N., IWASHIMA, F., YOSHIMOTO, T., SHICHIRI, M. & HIRATA, Y. 2007. Chronic blockade of nitric oxide synthesis reduces adiposity and improves insulin resistance in high fat-induced obese mice. *Endocrinology*, 148, 4548-56.
- 77) TZENG, E., SHEARS, L. L., 2ND, ROBBINS, P. D., PITT, B. R., GELLER, D. A., WATKINS, S. C., SIMMONS, R. L. & BILLIAR, T. R. 1996. Vascular gene transfer of the human inducible nitric oxide synthase: characterization of activity and effects on myointimal hyperplasia. *Mol Med*, 2, 211-25.
- 78) UEYAMA, A., YAWORSKY, K. L., WANG, Q., EBINA, Y. & KLIP, A. 1999. GLUT-4myc ectopic expression in L6 myoblasts generates a GLUT-4-specific pool conferring insulin sensitivity. *Am J Physiol*, 277, E572-8.
- 79) VALKONEN, V. P., PAIVA, H., SALONEN, J. T., LAKKA, T. A., LEHTIMAKI, T., LAAKSO, J. & LAAKSONEN, R. 2001. Risk of acute coronary events and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine. *Lancet*, 358, 2127-8.
- 80) VAN DEN BERGHE, G., WOUTERS, P., WEEKERS, F., VERWAEST, C., BRUYNINCKX, F., SCHETZ, M., VLASSELAERS, D., FERDINANDE, P., LAUWERS, P. & BOUILLON, R. 2001. Intensive insulin therapy in critically ill patients. *N Engl J Med*, 345, 1359-67.
- 81) VON DER LEYEN, H. E. & DZAU, V. J. 2001. Therapeutic potential of nitric oxide synthase gene manipulation. *Circulation*, 103, 2760-5.
- 82) WHO 1999. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications: Report of a WHO Consultation. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Geneve.
- 83) WIMALAWANSA, S. J. 2008. Nitric oxide: new evidence for novel therapeutic indications. *Expert Opin Pharmacother*, 9, 1935-54.
- 84) XU, H., BARNES, G. T., YANG, Q., TAN, G., YANG, D., CHOU, C. J., SOLE, J., NICHOLS, A., ROSS, J. S., TARTAGLIA, L. A. & CHEN, H. 2003. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*, 112, 1821-30.
- 85) YAFFE, D. 1968. Retention of differentiation potentialities during prolonged cultivation of myogenic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 61, 477-83.
- 86) YANG, Z. C., WANG, K. S., WU, Y., ZOU, X. Q., XIANG, Y. Y., CHEN, X. P. & LI, Y. J. 2009. Asymmetric dimethylarginine impairs glucose utilization via ROS/TLR4 pathway in adipocytes: an effect prevented by vitamin E. *Cell Physiol Biochem*, 24, 115-24.
- 87) YASUKAWA, T., TOKUNAGA, E., OTA, H., SUGITA, H., MARTYN, J. A. & KANEKI, M. 2005. S-nitrosylation-dependent inactivation of Akt/protein kinase B in insulin resistance. *J Biol Chem*, 280, 7511-8.
- 88) YE, J., COULOURIS, G., ZARETSKAYA, I., CUTCUTACHE, I., ROZEN, S. & MADDEN, T. L. 2012. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13, 134.

- 89) YOUNG, M. E., RADDA, G. K. & LEIGHTON, B. 1997. Nitric oxide stimulates glucose transport and metabolism in rat skeletal muscle in vitro. *Biochem J*, 322 (Pt 1), 223-8.

7.2 Abkürzungen

µl	Mikroliter
µg	Mikrogramm
ADMA	Asymmetrisches Dimethylarginin
Akt/PKB, pAkt	Proteinkinase B, phosphorylierte Proteinkinase B
AMPK	5'-Adenosinmonophosphat aktivierte Kinase
Amp(R)	Ampicillin-Resistenz
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
AZ	Adipozyten
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CBBG	Coomassie-Brilliant-Blau G-250
cDNA	Complementary DNA
CK-M	Muskelspezifische Kreatinkinase
cpm	Counts per minute, Zerfall pro Minute
CS	Calf Serum
DAN	Diaminonaphthalin
DDAH	Dimethylarginin- Dimethylaminohydrolase
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DETA	Diethyltetraamin NONOate
DMEM	Dulbecco's Eagle Modified Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic Acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynucleotidtriphosphate
2-DOG	2-Deoxyglucose
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF4e	Eukaryotic Initiation Factor 4E
eNOS, (NOS-3)	Endotheliale NO-Synthase
Erk1/2	Extracellular-regulated Kinase1/2
FABP4	Fatty acid binding protein 4
FB	Fibroblasten
FBS/FCS	Fetales Kälberserum
For	Forward Primer
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GLUT1/GLUT4	Glucosetransporter-1/4
h	Hours, Stunden
HbA1c	Glykiertes Hämoglobin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Horseradish peroxidase, Merretichperoxidase
IBMX	3-Isobutyl-2-methylxanthin
IgG	Immunglobulin G
i-NOS (NOS-2)	Induzierbare NO-Synthase
IRS-1/2	Insulin Rezeptor Substrat
kDa	kiloDalton
KRP	Krebs-Ringer-Puffer

L	Ladder
LADA	Latent autoimmune diabetes in adults
L-NMMA	Monomethyl-L-arginin
LPS	Lipopolysaccharid
M	molar
mAb	Monoclonal Antibody
MB	Myoblasten
ml	Milliliter
mM	millimolar
mRNA	Messenger RNA
MT	Myotuben
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	Nanometer
nM	nanomolar
N	Normal
nNOS (NOS-1)	Neuronale NO- Synthase
NO	Nitric oxide, Stickstoffmonoxid
NOS	NO- Synthase
OD	Optische Dichte
oGTT	Oraler Glucosetoleranztest
PAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphat buffered saline, Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PI ₃ -Kinase	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
P/S	Penicillin / Streptomycin
PI3-Kinase	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
PRMT	Protein-Arginin-Methyl-Transferase
qPCR	Quantitative PCR
Rev	Reverse Primer
RM	Rattenmuskel
RNA	Ribonucleic Acid, Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
rpm	revolutions per minute, Umdrehungszahl
RT-PCR	Real Time Polymerase Ketten Reaktion
SD	Standard Deviation, Standardabweichung
SDMA	Symmetrisches Dimethylarginin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SE	Standard Error (Standardfehler)
SIN-1	3-Morpholinonydnomin-Hydrochlorid
SNP	Sodium-nitroprusside, Nitroprussidnatrium
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris buffered saline
TBS-T	Tris buffered saline Tween
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
Tris-Puffer	Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Puffer

7.3 Risiko- und Sicherheitssätze (R- und S-Sätze)

- R 1 In trockenem Zustand explosionsgefährlich.
- R 2 Durch Schlag, Reibung, Feuer und andere Zündquellen explosionsgefährlich.
- R 3 Durch Schlag, Reibung, Feuer und andere Zündquellen besonders explosionsgefährlich.
- R 4 Bildet hochempfindliche explosionsgefährliche Metallverbindungen.
- R 5 Beim Erwärmen explosionsfähig.
- R 6 Mit und ohne Luft explosionsfähig.
- R 7 Kann Brand verursachen.
- R 8 Feuergefahr bei Berührung mit brennbaren Stoffen.
- R 9 Explosionsgefahr bei Mischung mit brennbaren Stoffen.
- R 10 Entzündlich.
- R 11 Leichtentzündlich.
- R 12 Hochentzündlich.
- R 14 Reagiert heftig mit Wasser.
- R 15 Reagiert mit Wasser unter Bildung leicht entzündlicher Gase.
- R 16 Explosionsgefährlich in Mischung mit brandfördernden Stoffen.
- R 17 Selbstentzündlich an der Luft.
- R 18 Bei Gebrauch Bildung explosionsfähiger /leicht-entzündlicher Dampf-Luftgemische möglich.
- R 19 Kann explosionsfähige Peroxide bilden.
- R 20 Gesundheitsschädlich beim Einatmen.
- R 21 Gesundheitsschädlich bei Berührung mit der Haut.
- R 22 Gesundheitsschädlich beim Verschlucken.
- R 23 Giftig beim Einatmen.
- R 24 Giftig bei Berührung mit der Haut.
- R 25 Giftig beim Verschlucken.
- R 26 Sehr giftig beim Einatmen.
- R 27 Sehr giftig bei Berührung mit der Haut.
- R 28 Sehr giftig beim Verschlucken.
- R 29 Entwickelt bei Berührung mit Wasser giftige Gase.
- R 30 Kann bei Gebrauch leicht entzündlich werden.
- R 31 Entwickelt bei Berührung mit Säure giftige Gase.
- R 32 Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase.
- R 33 Gefahr kumulativer Wirkungen.
- R 34 Verursacht Verätzungen.
- R 35 Verursacht schwere Verätzungen.
- R 36 Reizt die Augen.
- R 37 Reizt die Atmungsorgane.
- R 38 Reizt die Haut.
- R 39 Ernste Gefahr irreversiblen Schadens.
- R 40 Verdacht auf krebserzeugende Wirkung.
- R 41 Gefahr ernster Augenschäden.
- R 42 Sensibilisierung durch Einatmen möglich.
- R 43 Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich.
- R 44 Explosionsgefahr bei Erhitzen unter Einschluss.
- R 45 Kann Krebs erzeugen.
- R 46 Kann vererbare Schäden verursachen.
- R 48 Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition.

- R 49 Kann Krebs erzeugen beim Einatmen.
- R 50 Sehr giftig für Wasserorganismen.
- R 51 Giftig für Wasserorganismen.
- R 52 Schädlich für Wasserorganismen.
- R 53 Kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben.
- R 54 Giftig für Pflanzen.
- R 55 Giftig für Tiere.
- R 56 Giftig für Bodenorganismen.
- R 57 Giftig für Bienen.
- R 58 Kann längerfristig schädliche Wirkungen auf die Umwelt haben.
- R 59 Gefährlich für die Ozonschicht.
- R 60 Kann die Fortpflanzungsfähigkeit beeinträchtigen.
- R 61 Kann das Kind im Mutterleib schädigen.
- R 62 Kann möglicherweise die Fortpflanzungsfähigkeit beeinträchtigen.
- R 63 Kann das Kind im Mutterleib möglicherweise schädigen.
- R 64 Kann Säuglinge über die Muttermilch schädigen.
- R 65 Gesundheitsschädlich: Kann beim Verschlucken Lungenschäden verursachen.
- R 66 Wiederholter Kontakt kann zu spröder oder rissiger Haut führen.
- R 67 Dämpfe können Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.
- R 68 Irreversibler Schaden möglich.

- S 1 Unter Verschluss aufbewahren.
- S 2 Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen.
- S 3 Kühl aufbewahren.
- S 4 Von Wohnplätzen fernhalten.
- S 5 Unter ... aufbewahren. (geeignete Flüssigkeit vom Hersteller anzugeben)
- S 6 Unter ... aufbewahren. (inertes Gas vom Hersteller anzugeben)
- S 7 Behälter dicht geschlossen halten.
- S 8 Behälter trocken halten.
- S 9 Behälter an einem gut gelüfteten Ort aufbewahren.
- S 10 Inhalt feucht halten.
- S 11 Zutritt von Luft verhindern.
- S 12 Behälter nicht gasdicht verschließen.
- S 13 Von Nahrungsmitteln, Getränken und Futtermitteln fernhalten.
- S 14 Von ... fernhalten. (inkompatible Substanzen vom Hersteller anzugeben)
- S 15 Vor Hitze schützen.
- S 16 Von Zündquellen fernhalten – Nicht rauchen.
- S 17 Von brennbaren Stoffen fernhalten.
- S 18 Behälter mit Vorsicht öffnen und handhaben.
- S 20 Bei der Arbeit nicht essen und trinken.
- S 21 Bei der Arbeit nicht rauchen.
- S 22 Staub nicht einatmen.
- S 23 Gas/Rauch/Dampf/Aerosol nicht einatmen. (geeignete Bezeichnungen vom Hersteller anzugeben)
- S 24 Berührung mit der Haut vermeiden.
- S 25 Berührung mit den Augen vermeiden.
- S 26 Bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren.
- S 27 Beschmutzte, getränkte Kleidung sofort ausziehen.

- S 28 Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel ... (vom Hersteller anzugeben)
- S 29 Nicht in die Kanalisation gelangen lassen.
- S 30 Niemals Wasser hinzugießen.
- S 31 Von explosionsfähigen Stoffen fernhalten
- S 33 Maßnahmen gegen elektrostatische Aufladung treffen.
- S 34 Schlag und Reibung vermeiden. [Anmerkung 1][4]
- S 35 Abfälle und Behälter müssen in gesicherter Weise beseitigt werden.
- S 36 Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen.
- S 37 Geeignete Schutzhandschuhe tragen.
- S 38 Bei unzureichender Belüftung Atemschutzgerät anlegen.
- S 39 Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.
- S 40 Fußboden und verunreinigte Gegenstände mit ... reinigen. (Material vom Hersteller anzugeben)
- S 41 Explosions- und Brandgase nicht einatmen.
- S 42 Beim Räuchern/Versprühen geeignetes Atemschutzgerät anlegen. (Bezeichnung vom Hersteller anzugeben)
- S 43 Zum Löschen ... verwenden. (vom Hersteller anzugeben)(wenn Wasser die Gefahr erhöht, anfügen: Kein Wasser verwenden)
- S 44 Bei Unwohlsein ärztlichen Rat einholen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen).
- S 45 Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen).
- S 46 Bei Verschlucken sofort ärztlichen Rat einholen und Verpackung oder Etikett vorzeigen.
- S 47 Nicht bei Temperaturen über ... °C aufbewahren. (vom Hersteller anzugeben)
- S 48 Feucht halten mit ... (vom Hersteller anzugeben)
- S 49 Nur im Originalbehälter aufbewahren.
- S 50 Nicht mischen mit ... (vom Hersteller anzugeben)
- S 51 Nur in gut belüfteten Bereichen verwenden.
- S 52 Nicht großflächig für Wohn- und Aufenthaltsräume zu verwenden.
- S 53 Exposition vermeiden – vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen. – Nur für den berufsmäßigen Verwender –.
- S 56 Dieses Produkt und seinen Behälter der Problemabfallentsorgung zuführen.
- S 57 Zur Vermeidung einer Kontamination der Umwelt geeigneten Behälter verwenden.
- S 59 Information zur Wiederverwendung/Wiederverwertung beim /Lieferanten erfragen.
- S 60 Dieses Produkt und sein Behälter sind als gefährlicher Abfall zu entsorgen.
- S 61 Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen/Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen.
- S 62 Bei Verschlucken kein Erbrechen herbeiführen. Sofort ärztlichen Rat einholen und Verpackung oder dieses Etikett vorzeigen.
- S 63 Bei Unfall durch Einatmen: Verunfallten an die frische Luft bringen und ruhigstellen.
- S 64 Bei Verschlucken Mund mit Wasser ausspülen (Nur wenn Verunfallter bei Bewusstsein ist)

7.4 **Abbildungsverzeichnis**

- Abbildung 1: Schematische Darstellung der intrazellulären Insulinsignaltransduktionskaskade. IRS-1/2 Insulin Rezeptor Substrat-1/2, MAPK *mitogen activated protein kinase*, Erk-1/2 *extracellular regulated kinase-1/2*, PI₃-Kinase Phosphatidylinositol-3-Kinase, Akt/PKB Proteinkinase B, GLUT4 Glucosetransporter 4, (P) Phosphorylierung, eigene Darstellung. 5
- Abbildung 2: Schematische Darstellung der NO-Produktion. ADMA Asymmetrisches Dimethylarginin, L-NMMA Monomethyl-L-Arginin, SDMA Symmetrisches Dimethylarginin, eigene Darstellung, Strukturformeln aus Tran et al (2003).....8
- Abbildung 3: Grafische Darstellung des Hazard Ratio für Mortalität nach steigenden ADMA Quartilen. A Nicht-Diabetiker (n = 2948), B Diabetiker (n = 372), Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Anderssohn et al. (2010). 10
- Abbildung 4: Wirkmechanismen von NO-Spezies auf die Glucoseaufnahme, eigene Darstellung. 12
- Abbildung 5: Vektorkarte des pcDNA3.1 iNOS-Vektors mit integrierter Neomycin/ Geneticin-Resistenz-Kassette (NeoR), Abbildung mit Vector NTI® Software (Fa. Invitrogen). 17
- Abbildung 6: Grafische Auswertung einer Schmelzkurvenanalyse des FABP: Darstellung als Peakkurve: negative erste Ableitung der Schmelzkurven nach der Temperatur. In 24 Proben lag die mittlere Schmelztemperatur bei $80,69 \pm 0,33$ °C (MW \pm SD).31
- Abbildung 7: Differenzierte L6 Myozyten (*Myotuben), 100-fache Vergrößerung, eigene Abbildung. 42
- Abbildung 8: Vom Differenzierungszustand abhängige Expression der wichtigsten Glucosetransporter in L6 Zellen. Bestimmung der relativen mRNA-Expression im Bezug zu den Myoblasten, n=2 .43
- Abbildung 9: Qualitative PCR der vorgeschalteten Signalmoleküle IRS-1, IRS-2 und Akt, sowie GAPDH und CK-M als Ladungs- bzw.

- Differenzierungskontrolle in L6 Zellen. Es wurden PCR-Produkte der cDNA (A) und RNA als Negativkontrolle (B), sowie ein Ladder (L) auf 1-2%ige Agarosegele aufgetragen.....43
- Abbildung 10: Darstellung der Insulinsignalkaskade in der Western Blot Analyse in L6 Zellen. IRS-1, IRS-2, Akt und pAkt, sowie Erk-1/2. Als Ladungskontrolle diente die Ponceaufärbung, sowie GAPDH (37 kDa). Es wurden je 50 µg Proteinlysate eingesetzt. (K) unstimulierte Zellen, (Insulin) 30-minütige Insulinstimulation.44
- Abbildung 11: Expressionsmuster des Glucosetransporters GLUT4 (55 kDa) in L6 Myozyten. Es wurden 30 µg Protein eingesetzt. (L) Ladder, (MB) Myoblasten, (MT) Myotuben, (RM) Rattenmuskellysat. Als Ladungskontrolle diente GAPDH (37 kDa).....45
- Abbildung 12: Darstellung der Insulin stimulierten 2-Deoxyglucoseaufnahme von L6 Myozyten. Abgebildet wurde jeweils die relative 2-DOG-Aufnahme zur Kontrolle ohne Insulinstimulation. n=12, **p < 0,01 vs. Kontrolle.45
- Abbildung 13: Vektorkarte des transfizierten pcDNA3.1iNOS-Vektors mit integrierter Neomycin/ Geneticin-Resistenz-Kassette. (NeoR) Neomycin Resistenz, (Amp(R)) Ampicillin Resistenz, (CMV) Cytomegalievirus. Abbildung mit Vector NTI® Software (Fa. Invitrogen)46
- Abbildung 14: Expressionsanalyse der Transfektion auf RNA- (A) und Proteinebene (B): (A) Qualitative Darstellung der PCR-Produkte auf einem 2%igem TBE Gel, Größe des iNOS-PCR-Produktes 141 bp, (L) Ladder. (B) Western Blot Analyse von iNOS (130 kDa): aufgetragen wurden 50 µg Proteinlysate, als Ladungskontrolle diente die Ponceaufärbung.47
- Abbildung 15: Funktionalität der transfizierten iNOS in HEK-293-iNOS Zellen, Griess Assay. Es wurden je 100 µl Überstand in Doppelbestimmung von je drei (HEK-293-iNOS) bzw. zwei (HEK-Wildtyp) Proben eingesetzt. Darstellung als absolute Nitritkonzentration [mM], *p < 0,05 vs. 48 h.....48

- Abbildung 16: Differenzierte 3T3-L1-Adipozyten mit intrazellulären Fettvesikeln (20-fache Vergrößerung), eigene Abbildung.49
- Abbildung 17: PCR Analyse der GLUT-Transporter in 3T3-L1. (A) quantitative Auswertung der GLUT1 mRNA-Expression in Relation zu den Fibroblasten, n=2. (B) Darstellung der PCR-Produkte von Adipozyten (AZ) und Fibroblasten (FB) auf einem 2%-gen TBE-Gel, (L) Ladder.49
- Abbildung 18: Expression der Targets der Insulinrezeptorsignalkaskade (IRS-1, IRS-2, Akt, sowie GLUT4) und FABP4 als Differenzierungsmarker in 3T3-L1-Zellen auf mRNA-Ebene. Die berechneten Größen der PCR-Produkte stehen in Klammern. Es wurden PCR-Produkte der cDNA (A) und RNA als Negativkontrolle (B), sowie ein Ladder (L) aufgetragen.....50
- Abbildung 19: Darstellung der Insulinsignalkaskade der 3T3-L1 im Western Blot. Es wurden jeweils 50 µg Proteinlysate eingesetzt. Nachweis von IRS-1, IRS-2 und Akt, sowie eine Zunahme der Phosphorylierung von Akt und von MAPK durch Insulinstimulation, (K) Kontrolle, (Insulin) 30-minütige Insulinstimulation.51
- Abbildung 20: GLUT-4 Western Blot der 3T3-L1 Zellen: Fibroblasten und Adipozyten. Es wurden jeweils 30 µg Protein eingesetzt. Als Referenz diente die unspezifische Ponceau-Färbung.....52
- Abbildung 21: Radioaktive 2-Deoxyglucoseaufnahme in 3T3-L1-Zellen. Abgebildet wurde jeweils die relative 2-Deoxyglucoseaufnahme zur Kontrolle. Es wurden 24 unabhängige Wells gemessen. *** p < 0,001 vs. Kontrolle.52
- Abbildung 22: 2-Deoxyglucoseaufnahme unter 24-stündiger Stimulation mit den NO-Donatoren SIN-1 und DETA in 3T3-L1. Abgebildet wurde jeweils die relative 2-DOG-Aufnahme zur Kontrolle. n = 6, ***p < 0,001 vs. Kontrolle, *p < 0,05 vs. Kontrolle, n.s. nicht signifikante Insulinstimulation.53

- Abbildung 23: Einfluss von ADMA auf die mRNA-Expression in 3T3-L1. Darstellung als relative Expression zur Kontrolle. 24-stündige Inkubation mit 5 μ M, 25 μ M und 100 μ M ADMA, n=3, Auftragung der Proben in Doppelbestimmung.54
- Abbildung 24: Western Blot Analyse der IRS-1 und IRS-2 Proteinexpression in 3T3-L1. Es wurde jeweils 50 μ g Protein aus zwei Wells aufgetragen. Die Grafen zeigen die densitometrische Auswertung der Banden in Relation zur Ladungskontrolle und zu den nur mit Insulin stimulierten Zellen.56
- Abbildung 25: Western Blot des Akt bzw. pAkt in 3T3-L1: Es wurde jeweils 50 μ g Protein aufgetragen. Die Grafen zeigen die densitometrische Auswertung der Banden in Relation zur Ladungskontrolle und zu den nur mit Insulin stimulierten Zellen. Zur Kontrolle der Insulinstimulation wurde jeweils eine Kontrollprobe ohne ADMA- und Insulinstimulation aufgetragen (K), (L) Ladder.57
- Abbildung 26: Western Blot Analyse der GLUT4 Expression in 3T3-L1. Aufgetragen wurden 50 μ g Protein aus je zwei Wells. Grafen als densitometrische Auswertung der Banden in Relation zur Ladungskontrolle und zu den nur mit Insulin stimulierten Zellen. 57
- Abbildung 27: Relative 2-DOG von 3T3-L1-Adipozyten unter 24-stündiger ADMA Inkubation: Darstellung als relative 2-DOG im Bezug zu den Kontroll-Wells ohne ADMA- und Insulin-Stimulation. In den Balken stehen jeweils die verwendeten Anzahlen an Wells, ***p < 0,001 ohne vs. mit Insulin.58
- Abbildung 28: Einfluss von SDMA auf die mRNA-Expression in 3T3-L1. Darstellung als relative Expression zur Kontrolle. 24-stündige Inkubation mit 5 μ M, 25 μ M und 100 μ M SDMA, n=3, Auftragung der Proben in Doppelbestimmung.59
- Abbildung 29: Western Blot Analyse IRS-1 und IRS-2 Expression in 3T3-L1. Es wurden jeweils 50 μ g Protein aus zwei Wells aufgetragen. Die Grafen zeigen die densitometrische Auswertung der Banden in

- Relation zur Ladungskontrolle (GAPDH) und der nur mit Insulin stimulierten Zellen. (L) Ladder, (K) Kontrolle.....60
- Abbildung 30: Western Blot Analyse der Akt Expression und Phosphorylierung in 3T3-L1. Es wurden jeweils 50 µg Protein aus zwei Wells aufgetragen. Die Grafen zeigen die densitometrische Auswertung der Banden in Relation zur Ladungskontrolle (GAPDH und eIF4e) und den nur mit Insulin stimulierten Zellen. (L) Ladder, (K) Kontrolle.....61
- Abbildung 31: Western Blot Analyse der GLUT4 Expression in 3T3-L1. Es wurden jeweils 50 µg Protein aus zwei Wells aufgetragen. Die Grafen zeigen die densitometrische Auswertung der Banden in Relation zur Ladungskontrolle (GAPDH) und der nur mit Insulin stimulierten Zellen. (L) Ladder, (K) Kontrolle.....62
- Abbildung 32: Relative 2-DOG-Aufnahme von 3T3-L1-Adipozyten unter 24-stündiger SDMA Inkubation. Gezeigt wird die relative 2-Deoxyglucoseaufnahme im Bezug zu Kontroll- Wells ohne SDMA und Insulinstimulation, *p < 0,05 vs. Kontrolle + Insulin, *** p < 0,001 Insulin vs. Kein Insulin.....63
- Abbildung 33: Durch iNOS vermittelte Hemmung der Insulinsignalkaskade, eigene Darstellung.68
- Abbildung 34: eNOS vermittelte Steigerung der Glucoseaufnahme, AMPK Adenosinmonophosphat stimulierte Kinase, eigene Darstellung.71
- Abbildung 35: Veränderung der basalen 2-Deoxyglucoseaufnahme unter Stimulation mit NO-Donatoren. Darstellung als relative Einheiten zur Kontrolle, n = 6, *p ≤ 0,05, ***p < 0,001 vs. Kontrolle.72
- Abbildung 36: 2-Deoxyglucosetransport unter Stimulation der NO Donatoren SIN-1 und DETA in 3T3-L1. Darstellung als relative 2-DOG-Aufnahme zur Kontrolle, n = 6, ***p ≤ 0,001 vs. Kontrolle, *p ≤ 0,05 vs. Kontrolle, n.s. nicht signifikante Insulinstimulation..73

7.5 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Kulturmedien für die 3T3-L1-Zellen	15
Tabelle 2:	Zusammensetzung des Lysispuffers zur Proteingewinnung	18
Tabelle 3:	Zusammensetzung der Gele	19
Tabelle 4:	Herstellung des Laufpuffers	20
Tabelle 5:	Zusammensetzung des Transferpuffers für den Western Blot	20
Tabelle 6:	Zusammensetzung von TBS, 10x und TBS-T	21
Tabelle 7:	1. Antikörper für die Western Blot Analyse	22
Tabelle 8:	2. Antikörper für die Western Blot Analyse	22
Tabelle 9:	Ansatz DNase-Verdau	24
Tabelle 10:	Master Mix zum Umschreiben von RNA in cDNA	25
Tabelle 11:	Designte Primer für die PCR-Analyse der Insulinsignaltransduktionskaskade in den L6 Zellen (rattus norvegicus)	27
Tabelle 12:	Designte Primer für die PCR-Analyse der Insulinsignaltransduktionskaskade in den 3T3-L1-Zellen (Mus musculus)	28
Tabelle 13:	Master Mix für eine qualitative PCR	29
Tabelle 14:	Temperaturprogramm einer qualitativen PCR	29
Tabelle 15:	Mastermix für die Sybr® Green qPCR	30
Tabelle 16:	Temperaturprogramm einer SYBR Green Real-Time-qPCR	30
Tabelle 17:	Verwendete TaqMan® Sonden für die TaqMan®-Real-Time-qPCR	33
Tabelle 18:	Zusammensetzung des 10X Krebs-Ringer-Puffers für die Herstellung des Inkubationsmediums der Radioaktivversuche ...	35
Tabelle 19:	Zusammensetzung des Inkubationsmediums (pH 7,0 – 7,4) für die Radioaktivversuche	35

8 Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Rainer H. Böger für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Vergabe und die umfassende Betreuung dieser Promotionsarbeit.

Mein größter Dank gilt Dr. Maike Anderssohn für ihre großartige Betreuung und Unterstützung in allen Phasen dieser Arbeit.

Allen Kollegen des Instituts - vor allem Cornelia Wörmann, ohne die die Radioaktivversuche nicht möglich gewesen wären, Sandra Maak, Anna Steenpass und Mariola Kastner - möchte ich für die große Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre danken.

Ein ganz besonderer Dank geht an Dr. Henrike Arnold und Dr. Dorothee Atzler, die geduldig alle meine Fragen ertrugen und im Laufe der Laborzeit zu guten Freundinnen wurden.

Mein aufrichtigster Dank gilt meinen Eltern, die mir meinen bisherigen Lebensweg ermöglicht haben und mich immer bedingungslos unterstützt haben. Außerdem danke ich meinen Brüdern Jens und Marco, sowie meiner Oma Anita, die mir immer mit aufmunternden Worten beigestanden haben.

Meinem Freund Steffen möchte ich für die große Geduld und Unterstützung während des gesamten Studiums und meiner Doktorarbeit danken.

Zudem möchte ich allen meinen Freundinnen, insbesondere Susanne Klein und Carolin Nadollek danken, die immer ein offenes Ohr für mich hatten.

9 Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

10 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit

Der Einfluss von Argininderivaten auf die Insulinsignalkaskade im Zellkulturmodell

selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Susann Groschke