

**Molekulare Mechanismen der
IKKepsilon-vermittelten
Insulinresistenz in
Säugetiermodellen**

Dissertation
von
Barbara Heese

Universität Hamburg
Department Biologie
2007

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Frau Professor Dr. U. BEISIEGEL
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. W. SCHÄFER
Tag der Disputation: 06. Juli 2007

Hamburg, den 21. Juni 2007




Professor Dr. Reinhard Lieberei
Leiter des Departments Biologie

1	<u>EINLEITUNG</u>	5
<hr/>		
1.1	BLUTZUCKERREGULIERUNG	5
1.2	INSULINSIGNALTRANSDUKTION	6
1.2.1	INSULINREZEPTOR-SUBSTRATE	10
1.2.2	PHOSPHOINOSITID 3-KINASE	11
1.2.3	AKT/PROTEINKINASE B	12
1.2.5	GLUKOSETRANSPORTER	13
1.3	INSULINRESISTENZ UND DIABETES TYP 2	13
1.3.1	DIABETES MELLITUS	14
1.3.2	INSULINRESISTENZ	14
1.3.3	BEKANNTE MECHANISMEN DER INSULINRESISTENZ	15
1.4	IKB-KINASE-KOMPLEX EPSILON (IKKE)	17
1.4.1	UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS VON IKKE AUF DEN INSULINREZEPTOR	18
1.5	ZIEL DER ARBEIT	20
2	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	21
<hr/>		
2.1	BIOLOGISCHES MATERIAL	21
2.1.1	STÄMME VON E. COLI	21
2.1.2	VERWENDETE PLASMIDE	21
2.1.3	VERWENDETE ZELLINIEN	21
2.2	MEDIEN	21
2.2.1	MEDIEN FÜR E. COLI	21
2.2.2	MEDIEN FÜR ZELLINIEN	22
2.3	METHODEN ZUR DNA-ANALYSE	22
2.3.1	DNA-PRÄZIPITATION	22
2.3.2	AGAROSEGEL-ELEKTROPHORESE	22
2.3.3	ISOLIERUNG VON DNA AUS AGAROSEGEL-FRAGMENTEN	23
2.4	PCR-METHODEN	23
2.4.1	STANDARD-PCR	24
2.4.2	OVERLAP-PCR	25
2.4.3	cDNA-SYNTHESE	26
2.4.4	TAQMAN: REAL TIME PCR	26
2.5	KLONIERUNG	27
2.5.1	DEPHOSPHORYLIERUNG	27
2.5.2	LIGATION	28
2.5.3	RESTRIKTIONSSPALTUNGEN	28
2.5.4	ISOLIERUNG VON PLASMID-DNA AUS ESCHERICHIA COLI	29
2.5.5	MINI- UND MIDIPREP	29
2.5.6	HEATSHOCK-TRANSFORMATION	29
2.6	ARBEITEN MIT EUKARYOTISCHEN ZELLINIEN	30
2.6.1	AUFTAUEN DER ZELLEN	30
2.6.2	KULTIVIERUNG DER ZELLEN	30
2.6.3	EINFRIEREN DER ZELLEN	30
2.6.4	TRANSFORMATION	30
2.6.5	LYSE	31
2.6.6	PROTEINBESTIMMUNG	31
2.6.7	IMMUNPRÄZIPITATION	31
2.7	ARBEITEN MIT MURINEM GEWEBE	32
2.7.1	GEWEBEPREPARATION	32
2.7.2	RNA-ISOLATION	32
2.8	ANALYSEMETHODEN	33
2.8.1	WESTERN BLOT	33
2.8.2	KINASE-ASSAY	33

2.8.3	TKA-ELISA	35
2.8.4	REALTIME PCR (TAQMAN)	36
2.8.5	NFKB-AKTIVITÄTSMESSUNG	36
2.8.6	GENOTYPISIERUNG DER IKKE-KNOCKOUTMÄUSE	37
3	<u>ERGEBNISSE</u>	38
3.1	INTERAKTION VON IKKE MIT DEM INSULINREZEPTOR UND SEINEN SUBSTRATEN IN VITRO	38
3.1.1	<i>IN VITRO</i> -AKTIVITÄT VON REKOMBINANTEM IKKE	38
3.1.2	IKKE-VERMITTELTE PHOSPHORYLIERUNG DES INSULINREZEPTORS	40
3.1.3	IKKE-VERMITTELTE ³³ P-PHOSPHORYLIERUNG VON IRS1 UND IRS2	44
3.1.4	EINFLUSS VON IKKE AUF DIE INSULINSIGNALTRANSDUKTION IN INSULINSENSITIVEN ZELLMODELLEN	51
3.2	EINFLUSS VON IKKE AUF DIE ENTSTEHUNG DER INSULINRESISTENZ IN VIVO	70
3.2.1	IKKE-EXPRESSION IN WILDTyp- UND INSULINRESISTENTEN C57BL/6-MÄUSEN	70
3.2.2	<i>IN VIVO</i> -EXPRESSIONSUNTERSCHIEDE IN WILDTyp- UND IKKE-KNOCKOUT-MÄUSEN	72
3.2.3	GENOTYPISIERUNG DER IKKE-KNOCKOUT MÄUSE	73
3.2.4	UNTERSUCHUNGEN DER IKKE-KNOCKOUT-MÄUSE AUF PROTEINEBENE	76
3.2.5	mRNA-EXPRESSIONSUNTERSCHIEDE IN WT- UND IKKE-KNOCKOUT-MÄUSEN	78
3.2.6	NFKB-AKTIVITÄTSMESSUNG	86
4	<u>DISKUSSION</u>	88
4.1	INTERAKTION VON IKKE MIT DEM INSULINREZEPTOR UND SEINEN SUBSTRATEN IN VITRO	88
4.1.1	EINFLUSS VON IKKE AUF DIE INSULINREZEPTORAUTOPHOSPHORYLIERUNG	89
4.1.2	IKKE-VERMITTELTE PHOSPHORYLIERUNG VON IRS1 UND IRS2	90
4.1.3	EINFLUSS VON IKKE AUF DIE INSULINSIGNALTRANSDUKTION IN ZELLINIEN	91
4.2	FUNKTION VON IKKE BEI DER ENTSTEHUNG DER INSULINRESISTENZ IN VIVO	99
4.2.1	IKKE-EXPRESSION IN WILDTyp- UND INSULINRESISTENTEN C57BL/6-MÄUSEN	99
4.2.2	BEDEUTUNG DER EXPRESSIONSUNTERSCHIEDE IN WILDTyp- UND IKKE- KNOCKOUT MÄUSEN	101
4.3	SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK	108
5	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	109
6	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	110
7	<u>ANHANG</u>	127
7.1	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	127
7.2	SEQUENZEN	128
7.3	SEQUENZIERUNGEN	129
7.4	ASSAY ON DEMAND-LISTE (TAQMAN PRIMER)	130

A	AKT	auch PKB, siehe dort
	AS160	AKT Substrat von 160 kDa
C	°C	Grad Celsius
	Cox2	Cyclooxygenase 2
D	DIO	<i>diet induced obesity</i> (Diät induzierte Adipositas)
	DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	eIF2 α	eukaryotischer Initiationsfaktor 2
	ER	Endoplasmatisches Retikulum
	epiWAT	<i>epididymial white adipose tissue</i> (epididymales weißes Fettgewebe)
F	FAM	6-Carboxyfluorescein
	FAO	Rattenhepatomzellen
G	GAP	GTPase-aktivierende Proteine
	GLUT4	Glukosetransporter 4
	GSK3	Glykogensynthase Kinase 3
H	HEK	<i>human embryonal kidney</i> (humane embryonale Nierenzellen)
	HFD	<i>high fat diet</i> (hochkalorische Diät)
I	IKK ϵ	Inhibitorischer κ B-Kinase-Komplex epsilon
	IL	Interleukin
	IP	Immunpräzipitation
	IR	Insulinrezeptor
	IRF3	Interferon regulierender Faktor 3
	IRS1/2	Insulinrezeptor Substrat 1 bzw. 2
J	JNK	c-Jun Kinase
K	κ B	NF κ B DNA-Motiv
L	LacZ	Das <i>lacZ</i> Gen codiert für das Enzym β -Galaktosidase
	LPS	Lipopolysaccharid
M	MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
	MCP1	Monozyten Chemoattraktant Protein 1

	mTOR	mammalian target of Rapamycin
N	NFκB	Nukleärer Faktor κB
P	³³ P-ATP	Phosphor-Isotop 33 markiertes ATP
	PDK1	<i>phosphoinositide-dependent kinase 1</i> (Phosphoinositid-abhängige Kinase 1)
	PH	Pleckstrinhomologie
	PI3K	Phosphatidylinositol-3 Kinase
	PIP3	Phosphatidylinositol 3,4,5-tri-Phosphat
	PKB	Proteinkinase B, auch AKT
	PKC	Proteinkinase C
	Ppie	Peptidylprolyl Isomerase E
	PTB	Phosphotyrosinbindedomäne
	PTP	Protein Tyrosin Phosphatase
R	RANTES	regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted
	RNA	Ribonukleinsäure
	rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
	RT	Raumtemperatur
	RT-PCR	<i>Real-Time PCR</i> (Echtzeit-PCR)
	ru	<i>relative units</i> (relative Einheiten)
S	S6K1	S6 Kinase 1
	SAA	Serum- Amyloid- A- Proteine
	SH2	Src-Homologie
	siRNA	small interfering RNA
T	TANK	TRAF family member-associated NFκB activator
	Tbp	TATA Binde-Protein
	TKA	Tyrosin Kinase Aktivator
	TNFα	Tumornekrosefaktor alpha
	TRAF	TNF Rezeptor assoziierter Faktor
U	U	Einheiten (units) der Enzymaktivität
	üN	über Nacht
W	WB	Western Blot
	wt	Wildtyp

1 Einleitung

Der Insulinrezeptor ist das Bindeglied zwischen extra- und intrazellulärer Insulinsignaltransduktion. Bindet Insulin an den Insulinrezeptor, beginnt die Signalkaskade, die schließlich zur Aufnahme von Glukose in die Zellen des Fett- und Muskelgewebes führt. Dies ist ein essentieller Schritt bei der Aufrechterhaltung des Blutzuckerspiegels. Beim Diabetes Typ 2 ist diese Signalkette gestört, da der Insulinrezeptor das vom Insulin vermittelte Signal vermindert weiterleitet, man spricht von Insulinresistenz. Ein Faktor, der eng mit der Entstehung der Insulinresistenz assoziiert ist, ist Übergewicht bzw. Adipositas. Die Adipozyten und die ins Fettgewebe infiltrierten Makrophagen schütten vermehrt Zytokine aus, die über den NF κ B-Signalweg (Nukleärer Faktor κ B) und dort eingebundene Proteine die Insulinsignaltransduktion beeinträchtigen. Ein in diesen Signalweg eingegliedertes Enzym ist IKK ϵ (I κ B-Kinase-Komplex epsilon). Einige Untersuchungen (HEMMI et al., 2004; SWEENEY et al., 2005) deuten darauf hin, dass IKK ϵ das Entstehen der Insulinresistenz beeinflusst. Daher beschäftigt sich diese Arbeit mit IKK ϵ und seinen Auswirkungen auf die Insulinsignaltransduktion.

1.1 *Blutzuckerregulierung*

Insulin ist das wichtigste Hormon bei der Regulation der Blutglukosekonzentration und ist essentiell im postprandialen Stadium (SESTI, 2006). Wenn die Blutzuckerkonzentration nach Nahrungsaufnahme steigt, wird Insulin in den Betazellen der Langerhansschen Inseln der Pankreas sekretiert. Ein Insulin-Monomer besteht aus 2 Aminosäureketten, Kette A umfasst 21 Aminosäuren, Kette B 30 Aminosäuren. Diese beiden Ketten sind durch zwei Disulfidbrücken verbunden. Die Insulinmonomere assoziieren in Gegenwart von Zinkionen zu stabileren Hexameren (DE MEYTS, 2004) und werden so in Vesikeln des Golgiapparates gespeichert, bis sie als Reaktion auf einen erhöhten Blutzuckerspiegel freigesetzt werden. Der Organismus benötigt Glukose zu Energiegewinnung. Nach Aufnahme von Kohlenhydraten über die Nahrung steigt die Glukosekonzentration im Blutplasma an, was eine verstärkte Sekretion des Hormons Insulin aus den Betazellen der Pankreas zur Folge hat. Unter der Einwirkung des Insulins kommt es zur Aufnahme von Glukose in die Zielzellen, was zum Absinken der Plasmaglukosekonzentration führt. Die Glukose, die nicht sofort verstoffwechselt

wird, wird in Leber und Muskel in Form von Glykogen, im Fettgewebe als intrazelluläre Triglyceride gespeichert (SHULMAN, 2000). Das wichtigste glukosespeichernde Organ ist die Leber. Insulin inhibiert des Weiteren Glykogen abbauende Enzyme (Glykogenphosphorylase) (KHAN et al., 2002). So wird keine weitere Glukose freigesetzt, die postprandial erhöhten Blutzuckerwerte sinken wieder auf den Basalwert ab. Damit fehlt der wichtigste Stimulus für die Insulinsekretion und auch der Insulinspiegel im Blut fällt wieder auf den Basalwert ab. Während Insulin die Glykogensynthese fördert, resultiert die Freisetzung von Glukagon im Abbau von Glykogen. Glukagon ist der Gegenspieler des Insulins. Es wird in den Alphazellen der Langerhansschen Inseln der Pankreas erzeugt und besteht aus 29 Aminosäuren. Bei Hypoglykämie wird Glukagon sekretiert und bindet an den Glukagon-Rezeptoren der Leber. Dies führt zur Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration, was zur Glukosefreisetzung aus Glykogen führt. Die so freigesetzte Glukose steht nun wieder der Energiegewinnung zur Verfügung.

1.2 Insulinsignaltransduktion

Bei der Insulinsignaltransduktion bindet das Insulin an den Insulinrezeptor, wodurch eine Signalkaskade über mehrere Proteine innerhalb der Zelle ausgelöst wird, die schließlich zur Translokation des Glukosetransporters in die Zellmembran und damit zur Glukoseaufnahme in die Zelle führt. Insulin ist des Weiteren essentiell für eine Vielzahl anderer Signalwege (siehe Abbildung 1). Diese sollen, da sie nicht Inhalt der vorliegenden Arbeit sind, hier nur kurz erwähnt werden.

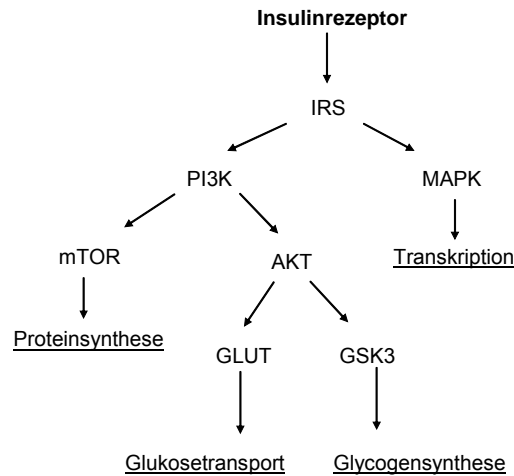


Abbildung 1: Insulinsignalwege

Schematisch dargestellt sind verschiedene Insulinsignalwege (nach LEE et al., 2004). Der PI3K-Signalweg ist verantwortlich für die metabolischen Effekte von Insulin wie Proteinsynthese, Glukosetransport und Glykogensynthese, der MAPK-Weg reguliert die Expression von Genen und kontrolliert damit Zellwachstum und -differenzierung. (IRS: Insulinrezeptorsubstrat; PI3K: Phosphatidylinositol-3 Kinase; mTOR: mammalian target of Rapamycin; AKT: auch PKB, Proteinkinase B; GLUT: Glukosetransporter; GSK3: Glykogensynthase Kinase 3; MAPK: mitogenaktivierte Proteinkinase)

Insulin ist neben der Aktivierung der Glukoseaufnahme für eine Reihe anderer Signalwege verantwortlich, die die Differenzierung von Gewebe, Wachstum der Zellen, Proteinsynthese und Genexpression beeinflussen (SESTI, 2006). Dabei werden die metabolischen Effekte des Insulins über den PI3K-Weg (Phosphatidylinositol-3 Kinase) reguliert. Dazu gehört die Regulierung der Proteinsynthese über mTOR (mammalian target of Rapamycin), die Initiierung des Glukosetransport in die Zielzellen über die Aktivierung von AKT und des Glukosetransporters (GLUT) sowie die GSK3-vermittelte Aktivierung der Glykogensynthese (LEE et al., 2004). Die Regulation der Genexpression und damit auch die Kontrolle des Zellwachstums und der Gewebedifferenzierung werden über den MAPK-Weg (mitogenaktivierte Proteinkinase) vermittelt. (TANIGUCHI et al., 2006).

Der Insulinrezeptor

Der Insulinrezeptor gehört zur Familie der Rezeptortyrosinkinasen (PATTI et al., 1998). Er ist ein tetrameres Protein, das sich aus zwei α -Untereinheiten von je 135 kDa (GOLDFINE, 1987) sowie zwei β -Untereinheiten von 95 kDa (JACOBS et al., 1981) zusammensetzt. Die α -Untereinheiten befinden sich ausschließlich extrazellulär. Die β -Untereinheiten bestehen aus einem extrazellulären, einem transmembranen und einem intrazellulären Teil. Zwei der α - β -Dimere sind über Disulfidbrücken verbunden (TANIGUCHI et al., 2006).

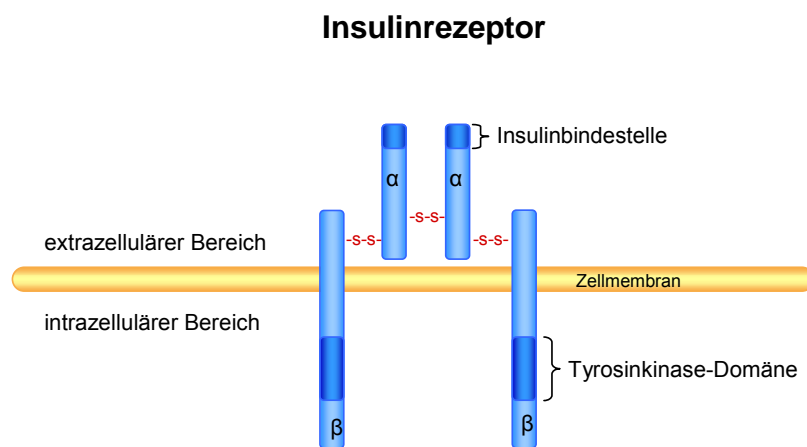


Abbildung 2: Insulinrezeptor

Die Abbildung zeigt die schematische Darstellung des Insulinrezeptors. Er setzt sich aus je zwei α - und β -Untereinheiten zusammen, die über Disulfidbrücken ($-s-s-$) miteinander verbunden sind. Die α -Untereinheiten befinden sich ausschließlich extrazellulär, die β -Untereinheiten haben einen extrazellulären, einen transmembranen und einen intrazellulären Bereich. Die Insulinbindestelle befindet sich an den α -Untereinheiten. Am intrazellulären Bereich der β -Untereinheiten befindet sich die Tyrosinkinasedomäne, an der nach Insulinstimulation Adapterproteine binden können.

Die Insulinbindestelle befindet sich an der α -Untereinheit, in der β -Untereinheit liegen verschiedene für das Insulinsignaltransduktion wichtige Bereiche wie die Tyrosinkinase (HUBBARD et al., 1994). Die Tyrosinkinase der β -Untereinheit ist an sich aktiv, jedoch in Abwesenheit von Insulin durch die α -Untereinheiten sterisch gehemmt (SALTIEL et al., 2001).

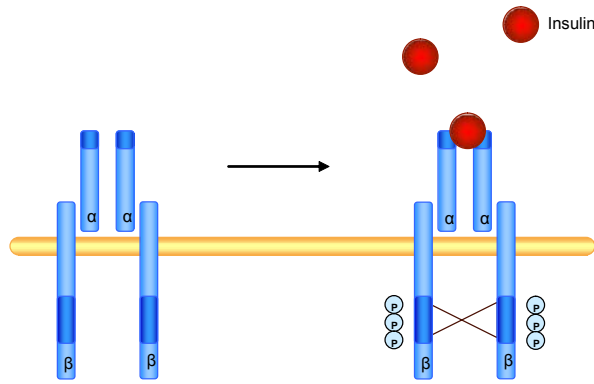


Abbildung 3: Autophosphorylierung der β -Untereinheiten

Zu sehen ist die Autophosphorylierung der Tyrosinkinase-Domänen der β -Untereinheiten des Insulinrezeptors nach Insulinbindung an den α -Untereinheiten. An die phosphorylierten Bereiche der β -Untereinheit können nun Adapterproteine binden und das Insulinsignal weiterleiten.

Bindet Insulin an die α -Untereinheit, führt dies zur Abschwächung der Inhibition der Kinaseaktivität der β -Untereinheit (GOREN et al., 1987), gefolgt von der intramolekularen auto-Transphosphorylierung der β -Untereinheiten und einer Konformationsänderung, die die Kinaseaktivität weiter verstärkt. Ist die Tyrosinkinasedomäne der β -Untereinheiten nach Bindung von Insulin an den α -Untereinheiten phosphoryliert, werden als nächster Schritt der Signalkaskade die Insulinrezeptorsubstrate (IRS) phosphoryliert und damit aktiviert (SESTI et al., 2001).

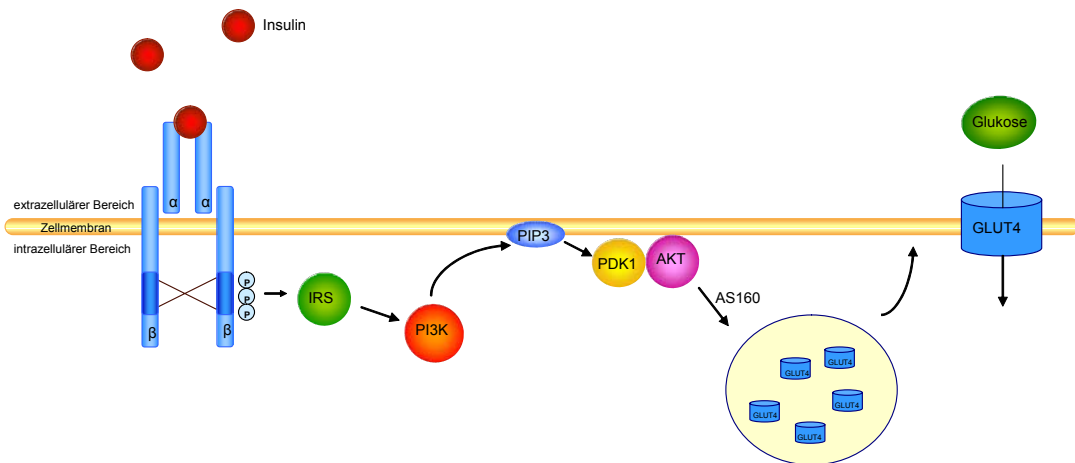


Abbildung 4: Übersicht der an der Insulin-Signaltransduktion beteiligten Elemente

In der Abbildung ist schematisch die durch Insulin induzierte Signaltransduktionskette zu sehen. Nach Bindung von Insulin an die α -Untereinheit des Insulinrezeptors kommt es zur Autophosphorylierung der β -Untereinheiten. Durch diese Phosphorylierung wird das Signal des Insulins über IRS, PI3K und PIP3 schließlich zu PDK1 und AKT weitergeleitet. Das aktivierte AKT vermittelt über AS160 die Translokation von GLUT4-tragenden Vesikeln an die Plasmamembran. Durch Verschmelzen mit der Membran werden die Glukosetransporter in die Zellmembran eingebracht und können so Glukose in die Zelle transportieren. (IRS: Insulinrezeptorsubstrat; PI3K: Phosphatidylinositol-3 Kinase; PIP3: Phosphatidylinositol 3,4,5-tri-Phosphat; PDK1: phosphoinositide-dependent kinase 1; AKT: auch PKB, Proteinkinase B; AS160: AKT Substrat von 160 kDa; GLUT4: Glukosetransporter 4)

Nachdem die IRS1-Proteine nach Insulinbindung an den Insulinrezeptor aktiviert wurden, wird das Signal des Insulins über PI3K, PIP3, PDK1, AKT und schließlich AS160 (PI3K: Phosphatidylinositol-3 Kinase; PIP3: Phosphatidylinositol 3,4,5-tri-Phosphat; PDK1: phosphoinositide-dependent kinase 1; AKT: auch PKB, Proteinkinase B; AS160: AKT Substrat von 160 kDa) weitergeleitet, was letztendlich zur Verschmelzung von Glukosetransporter-tragenden (GLUT4) Vesikeln mit der Plasmamembran und anschließenden Glukoseaufnahme in die Zelle führt. Die genauen Mechanismen werden im Folgenden beschrieben.

1.2.1 Insulinrezeptor-Substrate

Bisher wurden sechs verschiedene Insulinrezeptorsubstrate (IRS1-6) identifiziert. IRS1 und IRS2 werden in den für die Glukose- und Lipidhomöostase wichtigen Geweben hoch exprimiert. IRS1 ist im Muskel- und Fettstoffwechsel von größerer Bedeutung, IRS2 in der Leber und den Betazellen (KIM et al., 2007). IRS3 wird vornehmlich im Gehirn und Adipozyten exprimiert, IRS4 hauptsächlich in embryonalem Gewebe. IRS5 und IRS6 werden nicht stark exprimiert und scheinen nur eine untergeordnete Rolle im Signaling zu spielen, zumal ihnen die PI3K Aktivierungsdomäne fehlt (CAI et al., 2003).

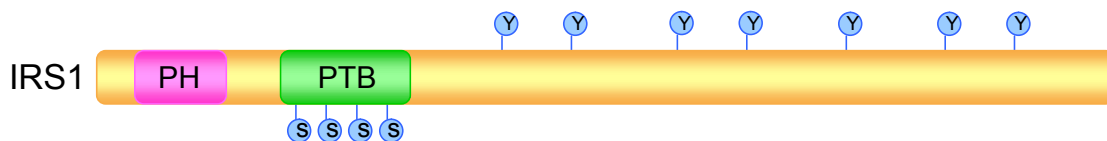


Abbildung 5: Schematische Darstellung der IRS-Proteine

Die IRS-Proteine (hier IRS1 abgebildet) besitzen eine Pleckstrinhomologie- (PH) Domäne und eine serinreiche (S) Phosphotyrosinbinde- (PTB) Domäne, die für die hohe Affinität zum Insulinrezeptor verantwortlich sind. Weiter enthalten die IRS-Proteine bis zu 20 potentielle Tyrosin-Phosphorylierungsstellen (Y), die nach Phosphorylierung durch den Insulinrezeptor an intrazelluläre Moleküle, die eine SH2-Domäne besitzen, binden können.

Die IRS-Proteine haben N-terminal PH-Domänen (Pleckstrin-Homologie) und PTB-Domänen (Phosphotyrosin-Bindedomäne), die die hohe Affinität zum Insulinrezeptor ausmachen. In der Mitte und zum C-Terminus hin befinden sich bis zu 20 potentielle Tyrosin-Phosphorylierungsstellen (TANIGUCHI et al., 2006). Diese können nach Phosphorylierung durch den Insulinrezeptor intrazelluläre Moleküle binden, die über

eine SH2-Domäne (Src-Homologie) verfügen. Dabei ist die wichtigste Kinase zur Weiterleitung des Insulinsignals unterhalb der IRS-Proteine die Phosphoinositid 3-Kinase (PI3K) (MYERS et al., 1993).

IRS1 und IRS2 sind die Hauptsubstrate der Insulinrezeptorkinase (SUN et al., 1991). IRS1 besitzt über 200 Serin- und Threonin-Reste (Ser/Thr) (HERSCHKOVITZ et al., 2007), wovon rund 70 Homologien zu Phosphorylierungsstellen verschiedener Kinasen enthalten (ZICK, 2004). Die Regulation des Insulinsignals wird über IRS-Kinasen gesteuert. Im physiologischen Zustand phosphoryliert insulin-aktiviertes PKB Serin-Reste innerhalb der PTB-Domäne, was dazu führt, dass die IRS-Proteine vor der PTP (Protein Tyrosin Phosphatase) geschützt werden und dadurch ihre aktive Tyrosin-Phosphorylierung-vermittelte Konformation behalten (PAZ et al., 1999). Dahingegen wird durch die gezielte Phosphorylierung von Ser/Thr-Resten durch PKCzeta, die weitere Tyrosin-Phosphorylierung verhindert, die Dissoziation der IRS-Proteine vom Insulinrezeptor eingeleitet (ZICK, 2001; PAZ et al., 1997). Dieser Mechanismus wirkt als physiologische Rückkopplungshemmung (LIU et al., 2001).

Was unter physiologischen Bedingungen als Rückkopplungshemmung dient, führt unter pathologischen Bedingungen aufgrund der vermehrten Aktivierung der IRS-Kinasen zur gesteigerten Phosphorylierung der Ser/Thr-Reste, was letztendlich im Zustand der Insulinresistenz resultiert. Die negative Regulation findet besonders an Serin-Resten statt, die sich innerhalb oder in der Nähe der PTB-Domäne befinden. mTOR vermittelt eine Ser/Thr-Phosphorylierung, die die Tyrosin-Phosphorylierung der IRS-Proteine erschwert und damit die Bindung an PI3K verhindert (LI et al., 1999; MOTHE et al., 1996). Des Weiteren können IRS-Proteine von intrazellulären Komplexen gelöst werden, die sie in unmittelbarer Nähe des Insulinrezeptors halten (TIROSH et al., 1999). Ebenfalls durch IRS-Kinasen vermittelt wird die Degradation der IRS-Proteine (PEDERSON et al., 2001). Deswegen könnte die Phosphorylierung von Serin- und Threonin-Resten ein genereller Mechanismus der Insulinresistenz sein.

1.2.2 Phosphoinositid 3-Kinase

Die PI3-Kinase (Phosphoinositid 3-Kinase) ist ein Heterodimer, bestehend aus der 110 kDa großen (p110) katalytischen Untereinheit und der 85 kDa großen (p85) regulatorischen Untereinheit. Die p85-Untereinheit besitzt 2 SH2-Domänen, die mit den tyrosin-phosphorylierten Motiven der IRS-Proteine interagieren (MYERS, et al. 1992; LEE et al., 2004). Die Kinase liegt im Zytosol vor, durch die Rekrutierung der

katalytischen Untereinheit wird sie an die Plasmamembran gebracht. PI3K produziert Second Messenger, indem sie die Phosphorylierung der 3'-OH Position am Inositolring der Inositolphospholipide katalysiert. Dadurch entsteht PIP3 (Phosphatidylinositol 3,4,5-tri-Phosphat) (FRUMAN et al., 1998; ALESSI et al., 1999). PIP3 bindet an die PH-Domäne von verschiedenen Signalmolekülen, im Fall der Insulinsignaltransduktion an PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase 1) (LIETZKE et al., 2000). PI3K reguliert damit PDK1, das wiederum die Serin/Threonin Kinase AKT/PKB1 phosphoryliert und damit zu deren Aktivierung führt (ALESSI et al., 1997).

1.2.3 AKT/Proteinkinase B

AKT oder auch PKB1 (Protein Kinase B) ist eine Tyrosinkinase, die eine PH-Domäne und eine katalytische Domäne besitzt. Die Aktivierung von AKT durch PDK1 ist abhängig von der vorausgehenden Aktivierung von PI3K. Diese produziert Second Messenger (PIP3), die an die PH-Domäne von AKT und PDK1 binden, das führt dazu, dass diese Enzyme an die Plasmamembran rekrutiert werden, wo dann AKT von PDK1 phosphoryliert wird. (LAWLOR et al., 2002)

AKT wiederum hat ein Substrat, das etwa 160 kDa groß ist und AS160 (AKT Substrat von 160 kDa) genannt wird. Dieses Protein besitzt sechs AKT-Phosphorylierungsstellen sowie eine Rab-GAP-Homologie (GTPase-aktivierende Proteine) -Domäne und wird nach Insulinstimulation von AKT phosphoryliert (KANE et al., 2002). Rab Proteine beinhalten den größten Abschnitt der Ras Superfamilie von kleinen G-Proteinen (KANZAKI, 2006). GAP Proteine sind involviert bei der Regulation des GTP/GDP Zyklus der Rab Proteinfamilie, dies sind GTPasen, die eine Vielzahl von Membran „trafficking“ Prozessen regulieren (DENEKA et al., 2003). Wie andere kleine G-Proteine zirkulieren Rab Proteine zwischen dem GDP und GTP-Zustand. Rab-Proteine wurden in GLUT4-enhaltenen Vesikeln gefunden (MIINEA et al., 2005). Daher scheint das vom dem Insulin-aktivierten AKT phosphorylierte AS160, das mit Rab-Proteinen, die sich in unmittelbarer Nähe von GLUT4 befinden, das Bindeglied zwischen AKT und der Translokation von GLUT4 zur Plasmamembran darzustellen.

1.2.5 Glukosetransporter

Bekannt sind 13 Mitglieder der Glukosetransporter- (GLUT) Familie, am besten untersucht sind GLUT1 - 4. GLUT1 ist insulinunabhängig, wird ubiquitär exprimiert und ist für die basale Glukoseaufnahme verantwortlich. GLUT2 ist ebenfalls insulinunabhängig, wird hauptsächlich in den Betazellen und der Leber exprimiert und hat eine sehr geringe Affinität zu Glukose, er fungiert als Teil des Glukosesensors. Bei einem zu hohen Glukosespiegel im Blut aktiviert er die Insulinsynthese und -freisetzung in den Betazellen. GLUT3 hat die höchste Affinität zu Glukose und wird während der fetalen Entwicklung und in adulten Neuronen exprimiert. Durch die hohe Affinität zu Glukose wird gewährleistet, dass den fetalen Zellen und dem Gehirn auch bei einem niedrigen Glukosespiegels im Blut ausreichend Glukose als Energiequelle zur Verfügung steht. GLUT4 wird in Fett und Muskel exprimiert und ist für die Insulin-vermittelte Glukoseaufnahme zuständig (KHAN et al., 2002).

Alle Glukosetransporter bestehen aus 12 Transmembrandomänen, die sich so in der Plasmamembran anordnen, dass die hydrophoben Anteile nach außen in die Membran binden und in der Mitte eine hydrophile Pore für Glukose entsteht. Dabei liegen Amino-Terminus und Carboxyl-Terminus auf zytosolischer Seite. Die Bindung von Glukose verursacht eine Konformationsänderung des Glukosetransporters, aufgrund derer das Zuckermolekül zur anderen Seite transportiert wird.

Im Basalstadium liegt der größte Teil von GLUT4-Molekülen in Endosomen vor, der Rest in der Umgebung des Golgiapparates (KARYLOWSKI et al., 2004; MARTIN et al., 2006). Nach Insulinstimulierung wird GLUT4 von intrazellulären Lagerstätten („tubulovesicular system“) zur Plasmamembran von Fett, Muskel und Herzmuskel bewegt (SMITH et al., 1991). Die Translokation der GLUT4-tragenden Vesikel wird über AKT-aktiviertes AS160 vermittelt, der genaue Mechanismus ist bislang unklar. Der limitierende Schritt der insulinabhängigen Glukoseaufnahme in Muskel und Fett ist die Translokation des GLUT4 (SALTIEL, 2001).

1.3 Insulinresistenz und Diabetes Typ 2

Im vorangegangenen Abschnitt wurde die Insulin-vermittelte Glukoseaufnahme am Beispiel der Muskel- und Fettzellen erläutert. Der initiale Schritt dabei ist die Bindung des Insulins an den Insulinrezeptor, dessen Aktivierung und die daraus resultierende Signalweiterleitung bis hin zur Translokation des Glukosetransporters in

die Zellmembran und die abschließende Aufnahme von Glukose in die Zelle. Dieser Mechanismus ist grundlegend für eine ausgeglichene Regulierung des Blutzuckerspiegels. Wird die Signalweiterleitung gestört oder unterbrochen, kann nicht ausreichend Glukose in die Zielzellen aufgenommen werden und der Blutzuckerspiegel steigt weiter an, man spricht von Hyperglykämie. Daraus resultiert, zusammen mit einer nicht ausreichenden Kompensation der Insulinausschüttung durch die Betazellen, letztendlich das Krankheitsbild des Diabetes mellitus Typ 2. Den durch diverse Faktoren verursachten Zustand, der zu der mangelnden Signalweiterleitung des Insulins führt, bezeichnet man als Insulinresistenz.

1.3.1 Diabetes mellitus

Beim Diabetes mellitus ist die Regulierung des Blutzuckerspiegels gestört. Dies beruht auf einem totalen bzw. relativen Mangel an Insulin. Man unterscheidet zwischen zwei Formen von Diabetes, dem Diabetes Typ 1 und Diabetes Typ 2. Der Diabetes Typ 1 manifestiert sich bereits bei Kindern, er ist in den meisten Fällen genetisch bedingt. Hier kommt es zur Apoptose der Betazellen der Pankreas, in Folge dessen bleibt die Sekretion von Insulin aus. Beim Diabetes Typ 2 wird noch genügend Insulin produziert, jedoch kann der Insulinrezeptor das durch das Insulin vermittelte Signal nicht mehr weiterleiten, man spricht von Insulinresistenz. Zunächst kann die Insulinresistenz durch eine erhöhte Sekretion von Insulin ausgeglichen werden, ist dies jedoch nicht mehr der Fall, manifestiert sich (üblicherweise nach dem 50. Lebensjahr) der Diabetes Typ 2.

1.3.2 Insulinresistenz

Die Insulinresistenz wird definiert als Stadium der reduzierten Antwort auf normale Konzentrationen von zirkulierendem Insulin (SALTIEL, 2000). Als Ursachen werden vor allem Übergewicht, aber auch zunehmendes Alter, ein unausgewogener Lebensstil mit Bewegungsmangel und zu einem geringen Anteil eine genetische Prädisposition angesehen. Übergewichtige Menschen haben ein erniedrigtes Insulinrezeptor-Expressionsniveau sowie eine verminderte Tyrosinkinaseaktivität der Insulinrezeptoren in den Zellen der Skelettmuskeln und des Fettgewebes. Gleiches gilt für Diabetes Typ 2 Patienten (VIRKAMÄKI et al., 1999). Bei adipösen Menschen ist zudem das IRS1-Expressionsniveau im Vergleich zu normalgewichtigen Menschen fast um die Hälfte reduziert (GOODYEAR et al., 1995). Von den Adipozyten freigesetzte

Entzündungsfaktoren und Lipide inhibieren die Insulinsignaltransduktion durch Serin-Phosphorylierung von IRS1 (SESTI, 2006). Die Betazellen kompensieren die beginnende Insulinresistenz mit einer erhöhten Sekretion von Insulin. Auf Dauer können die Betazellen dies nicht mehr ausgleichen. Das führt unweigerlich zur Verschlechterung der Glukose-Homöostase und zu Hyperglykämie. Diese verschlechtert weiter die Insulinsensitivität sowie die Insulinsekretion der Betazellen. Dieses Phänomen wird Glukosetoxizität genannt (ROSSETTI, 1995). Letztendlich manifestiert sich der Diabetes Typ 2.

1.3.3 Bekannte Mechanismen der Insulinresistenz

Die Ursachen, die für die Entstehung der Insulinresistenz verantwortlich sind, werden intensiv untersucht. Es sind bereits diverse molekulare Faktoren bekannt.

Ein Mechanismus, der die Entwicklung von Insulinresistenz insbesondere bei Adipositas fördert, ist das so genannte „Stress-Signaling“ (SHOELSON et al., 2006; EVANS et al., 2003). Hierbei werden Kinasen als Antwort auf Stimuli wie inflammatorische Zytokine, oxidativem Stress oder auch ER (Endoplasmatisches Retikulum) Stress aktiviert (ÖZCAN et al., 2004; FURUKAWA et al., 2004). Diese Kinasen wiederum phosphorylieren verschiedene Proteinsubstrate an Serin- und Threonin-Resten, was z. B. zur Abschwächung ihrer Funktionalität oder ihrer Stabilität führt. Eine dieser Stresskinasen ist JNK (c-Jun Kinase), eine MAP-Kinase, die IRS1 in der Maus am Serin-Rest 307 (beim Menschen an Ser312) phosphoryliert und damit bewirkt, dass IRS1 schlechter an den Tyrosin-Resten phosphoryliert werden kann, die für die Insulinsignalweiterleitung notwendig sind (HIROSUMI et al., 2002). JNK wird durch Zytokine aktiviert, die aus dem Fettgewebe, insbesondere von den dort infiltrierten Makrophagen, sezerniert werden (TILG et al., 2006). Zusätzlich schütten die Makrophagen MCP1 (monocyte chemoattractant protein 1) aus, was zur Rekrutierung weiterer Monozyten und so zur Infiltration von immer mehr Makrophagen führt.

Weitere Kinasen, die in stressinduzierte sowie Insulin-Signalwege eingebunden sind, sind z. B. PKC-Kinasen (Proteinkinase C), mTOR (mammalian target of Rapamycin) und S6K1 (S6 Kinase 1) (ZICK, 2005). Die physiologische Funktion dieser Kinasen ist die Kontrolle der Insulinsignaltransduktion über Negative Feedback Mechanismen. Dabei phosphorylieren sie gezielt IRS-Proteine, um das vom Insulin vermittelte Signal zu beenden. Unter pathologischen Gegebenheiten führt dies zu einer permanenten Abschwächung des Insulinsignals und somit zu Insulinresistenz (UM et al. 2004).

Ein weiterer Faktor, der für die Entstehung der Insulinresistenz verantwortlich gemacht wird, ist das proinflammatorische Zytokin TNF α (Tumornekrosefaktor alpha). Es wird in vielen Geweben - hauptsächlich von Makrophagen, aber auch von Monozyten und Adipozyten - gebildet (VASSALLI, 1992; MIJATOVIC et al., 1997) und ist ein bekannter Entzündungsmarker, der die Synthese von proinflammatorischen Molekülen wie z. B. Interleukin 1, Interleukin 6 und Interferon β induziert (TRACEY et al., 1993). Bindet TNF α an seinen Rezeptor, werden Proteine rekrutiert (TRAF, TNF receptor associated factor), die die inflammatorischen Signale weiterleiten (BAUD et al., 2001).

Adipozyten von adipösen Menschen überexprimieren TNF α (HOTAMISLIGIL et al., 1993) in Korrelation zum Ausmaß des Übergewichtes. Gewichtsreduktion lässt die TNF α Expression wieder auf ein normales Niveau herabsinken (HOTAMISLIGIL et al., 1994). Insulinresistenz wird unter anderen beobachtet bei einigen Krebserkrankungen, Infektionen und schweren Brandverletzungen. Dies sind allesamt Konditionen, bei denen hohe Spiegel an TNF α detektiert werden können (COPELAND et al., 1987; MARANO et al., 1988).

TNF α induziert die Insulinresistenz, indem es die Phosphorylierung von IRS1 am Serin-Rest 307 vermittelt (AGUIRRE et al., 2002; KANETY et al., 1995) und so IRS1 als Mediator der Insulinsignaltransduktion inhibiert. Serin-phosphoryliertes IRS1 inhibiert zusätzlich die Insulinrezeptor-Tyrosinkinaseaktivität, was zu einer weiteren Abschwächung der unterhalb von IRS1 liegenden Signalweiterleitung führt (PERALDI et al., 1998; HOTAMISLIGIL et al., 1996).

Auch NF κ B (nuclear factor κ B) ist für die Entwicklung der Insulinresistenz von Bedeutung. Dies ist ein Transkriptionsfaktor, der in den meisten Geweben vorkommt. NF κ B besteht bei Säugetieren aus einem Proteinkomplex, der sich aus 5 verschiedenen Proteinen (p50, p52, p65, RelB, c-Rel) zusammensetzt. Diesen Proteinen ist die so genannte Rel-Homologie-Domäne gemein, die als Dimerisations-, DNA-Binde-Domäne und prinzipielle regulatorische Domäne dient (KARIN et al., 2004). Eine spezifische Antwort auf verschiedene Stimuli wird durch unterschiedliche Aktivierung und Dimerisierung der einzelnen Untereinheiten erreicht (WIETEK et al., 2006). NF κ B kann an ein spezifisches DNA-Motiv von etwa zehn Basenpaaren, das so genannte κ B-Motiv, binden. Das κ B-Motiv wurde an zahlreichen regulatorischen Bereichen in der DNA nachgewiesen.

In den meisten Zelltypen liegt NF κ B im basalen Zustand gebunden durch inhibitorische κ B-Proteine (I κ B) im Zytoplasma vor (SEN et al., 1986). NF κ B kann z. B. durch

Zytokine wie TNF α , Lipopolysaccharide, oxidativen Stress oder auch UV-Licht aktiviert werden (WU et al., 2004). Dabei wird der I κ B-Kinase-Komplex (IKK) aktiviert, der die inhibitorischen Proteine phosphoryliert, und damit deren Ubiquitinylierung und den darauf folgenden Abbau einleitet (KARIN et al., 2000). Nach der Freisetzung der NF κ B-Moleküle können diese in den Zellkern wandern und als Transkriptionsfaktoren agieren (BRIVANLOU et al., 2002). NF κ B ist für die Produktion vieler inflammatorischer Stimuli wie TNF α , Interleukin 1 und 6 sowie Interferon β zuständig (SHOELSON et al., 2003).

Die Aktivierung von NF κ B z. B. durch Zytokine kann zur Insulinresistenz führen. Werden die regulatorischen IKK-Kinasen inhibiert, kann NF κ B nicht mehr aktiviert werden (GHOSH et al., 1998). Es konnte gezeigt werden, dass zahlreiche Serin/Threonin-Kinasen (wie z. B. IKK β) Insulinresistenz induzieren. Dies scheint durch die Serin/Threonin-Phosphorylierung des Insulinrezeptors und den Insulinrezeptorsubstraten verursacht zu sein, da aufgrund dieser die Tyrosin-Phosphorylierung-vermittelte Insulinsignaltransduktion vermindert wird.

IKK β wird für die NF κ B-Aktivierung bei akuten Entzündungen benötigt (CHEN et al., 2003). Weiter ist IKK β beschrieben als eine inflammatorische Kinase, durch deren Inhibierung beim Menschen die Insulinsensibilität verbessert werden kann (CAI et al., 2005) und in Nagermodellen die Insulinresistenz abnimmt (YIN et al., 1998). IKK β -Knockout-Mäuse entwickeln im Gegensatz zu den Wildtyp-Tieren unter HFD keine Insulinresistenz (ARKAN et al., 2005). Weitere Untersuchungen belegen den Einfluss von IKK β bei der Entstehung der Insulinresistenz (SHOELSON et al., 2003; KAMON et al., 2004; BASHAN et al., 2007). IKK ϵ weist eine hohe Homologie zu IKK β auf und ist ebenfalls ein Regulator von NF κ B. Daher scheint IKK ϵ ein geeignetes Ziel zur Untersuchung der Entstehung der Insulinresistenz zu sein.

1.4 I κ B-Kinase-Komplex epsilon (IKK ϵ)

IKK ϵ , auch als IKKi für „induzierbar“ abgekürzt (WANG et al., 2005) ist eine Serin/Threoninkinase. Das Gen wird in vielen Geweben als 3.2-kb Transkript exprimiert. Besonders hoch ist die basale Expression von IKK ϵ in Thymus, Milz und in peripheren Blutleukozyten (PETERS et al., 2001; KISHORE et al., 2002). Die Aminosäuresequenz des IKK ϵ -Proteins stimmt innerhalb der Kinasedomäne zu 33% mit IKK α bzw. zu 31% mit IKK β überein (HUYNH et al., 2002). Die Homologie insgesamt mit den beiden anderen IKK-Isoformen beträgt etwa 27% (SHIMADA et al., 1999). IKK ϵ

agiert abhängig vom Signaltransduktionsweg entweder oberhalb von IKK α und IKK β (SANKAR et al., 2006) oder interagiert z. B. bei der Immunantwort direkt mit p52, einer Untereinheit des NF κ B-Komplexes (WIETEK et al., 2006) oder wie in einem Modell von Krebszellen gezeigt, mit p65 (ADLI et al., 2006).

IKK ϵ wird hauptsächlich auf Ebene der Genexpression und nicht auf der Ebene der posttranslationalen Modifikation (z. B. durch aktivierende Phosphorylierung) reguliert (NOMURA et al., 2000). Die Expression von IKK ϵ wird durch Zytokine wie TNF α , IL-1 oder IL-6, durch LPS (HEMMI et al., 2004), sowie durch Anisomycin- und PMA-Behandlung induziert (KRAVCHENKO et al., 2003). IKK ϵ seinerseits stimuliert die Aktivierung von NF κ B und JNK, einer weiteren Kinase, die an der Pathogenese von Diabetes und Rheumatischer Arthritis beteiligt ist (SWEENEY et al., 2005; WAETZIG et al., 2005). IKK ϵ wird für die LPS-vermittelte Induktion von Genen benötigt, die inflammatorische Proteine wie Interleukin 1, Interleukin 6, TNF α , RANTES und COX-2 kodieren. IKK ϵ ist funktionell über TANK (TRAF family member-associated NF κ B activator; TRAF: TNF receptor associated factor) mit den IKK α/β -Komplexen verbunden (SHARMA et al., 2003). TANK ist in die Regulation der NF κ B Aktivität involviert (CHARIOT et al., 2002).

IKK ϵ aktiviert IRF3 (Interferon regulating factor 3) (INDUKURI et al., 2006; BIBEAU-POIRIER et al., 2006). Dieser Faktor ist neben NF κ B essentiell für die Regulierung der Expression vieler Gene (z. B. Interferon- β), die an der Immunantwort nach viraler Infektion, z. B. mit dem Hepatitis C Virus (VILASCO et al., 2006), beteiligt sind (TENOEVEER et al., 2007; FITZGERALD et al., 2003). IKK ϵ wird dabei jedoch nicht direkt von der dsRNA der Viren aktiviert (EHRHARDT et al., 2004).

1.4.1 Untersuchungen zum Einfluss von IKK ϵ auf den Insulinrezeptor

Die Aktivierung/Überexpression von IKK ϵ in Zellen führt zur Beeinträchtigung der Insulin-induzierten Autophosphorylierung des Insulinrezeptors und nachfolgender Schritte der Insulinsignaltransduktion wie IRS1- und AKT-Phosphorylierung (WERNER et al., 2005). Die Hemmung des Insulinrezeptors basiert auf der selektiven Phosphorylierung von Ser964 und Thr1148 innerhalb der Aktivierungsdomäne des Insulinrezeptors. Phosphorylierung von Thr1148 in Geweben wurde in Tiermodellen bei Adipositas, Insulinresistenz, Typ 2 Diabetes und anhaltender Insulineinwirkung beobachtet. In Zellen wurde Thr1148-Phosphorylierung nach Zugabe von Caliculin, TNF α , Anisomycin und PMA festgestellt. Des Weiteren ist die Expression von IKK ϵ im

weißen Fettgewebe (WAT) und in der Leber von ob/ob Mäusen, einem Nagetiermodell von Diabetes Typ 2, hochreguliert (WERNER und SHOELSON, Joslin Diabetes Center, Boston, persönliche Kommunikation, 2004 und 2005).

1.5 Ziel der Arbeit

Die molekularen Mechanismen, die zur Entstehung der Insulinresistenz führen, sind multifaktoriell und nur teilweise verstanden. Bei der Übergewichts-induzierten Insulinresistenz spielt das Fettgewebe eine entscheidende Rolle, so führt eine Erhöhung der Fettgewebsmasse zu Veränderungen in der Sekretion von Adipozytokinen wie z.B. TNF α . Ein wichtiger Aspekt dabei ist die TNF α -vermittelte Aktivierung von IKK β und des NF κ B-Komplexes. Dies führt zur einer Serin/Threoninphosphorylierung des Insulinrezeptors und seiner Substrate IRS1 und IRS2 und damit zur Beeinträchtigung der Weiterleitung des Insulinsignals, der Insulinresistenz. WERNER und SHOELSON haben den Einfluss einer der IKK β eng verwandten Kinase, IKK ϵ , auf die Aktivität des Insulinrezeptors untersucht und haben eine wichtige Rolle für dieses Protein bei der Entstehung der Insulinresistenz postuliert.

An diese Ergebnisse sollte in dieser Arbeit angeknüpft werden, um 1.) die Interaktion von IKK ϵ mit dem Insulinrezeptor und seinen Substraten *in vitro* und 2.) den Einfluss von IKK ϵ auf die Entstehung der Insulinresistenz *in vivo* zu untersuchen.

Für die *in vitro* Studien sollten zunächst die IKK ϵ Wildtyp cDNA und als Kontrolle eine Kinase-inaktive Version von IKK ϵ (IKK ϵ K38A) in einen eukaryotischen Expressionsvektor kloniert werden. Mit diesen Konstrukten sollte der Einfluss von IKK ϵ und IKK ϵ K38A auf die Insulinrezeptorautophosphorylierung und die Substratphosphorylierung in verschiedenen Zelllinien untersucht werden. Des Weiteren sollten *in vitro* Kinase-Assays mit rekombinantem IKK ϵ zur Untersuchung der Insulinrezeptor- und Insulinrezeptorsubstratphosphorylierung durchgeführt werden.

Um die Bedeutung von IKK ϵ *in vivo* zu untersuchen, sollte zunächst die Expression von IKK ϵ und Entzündungsmarkern in verschiedenen murinen Geweben mittels quantitativer PCR bestimmt werden. Zu diesem Zweck sollten C57BL/6-Mäuse untersucht werden, die eine normalkalorische Diät bzw. eine Insulinresistenz-induzierende, hochkalorische Diät (HFD, high fat diet) erhalten haben. Des Weiteren sollten Studien zur Insulinsensitivität in IKK ϵ Knockout-Mäusen nach Fütterung einer normal- bzw. hochkalorischen Diät in Fett- und Lebergewebe im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen analysiert werden. Die mRNA-Expression verschiedener Markerproteine des Insulinsignalweges sollte in Wildtyp- und IKK ϵ -Knockout Tiere mittels quantitativer RT-PCR analysiert werden, um die mögliche Auswirkung von IKK ϵ auf die Entstehung der Insulinresistenz zu beschreiben.

2 Material und Methoden

2.1 *Biologisches Material*

2.1.1 Stämme von *E. coli*

Für die Klonierungsarbeiten wurde der *Escherichia coli*-Stamm DH5 α von INVITROGEN verwendet.

2.1.2 Verwendete Plasmide

Das humane IKK ϵ lag im Expressionsvektor pCMV6-XL4 von ORIGENE vor. Für Klonierungen in *E. coli* wurde pcDNA3.1A aus dem INVITROGEN Vektor-System verwendet.

2.1.3 Verwendete Zelllinien

Es wurden zum einen HEK293rapid-Zellen (human embryonal kidney rapid) als auch FAO-Zellen (rat hepatoma cells) verwendet.

2.2 *Medien*

2.2.1 Medien für *E. coli*

LB _{Amp} -Medium	1% Hefeextrakt
	1% Trypton
	0,5% NaCl, pH 7,5
	50 μ g/ml Ampicillin
LB _{Amp} -Platten	LB-Medium
	2% Agar
	200 μ g/ml Ampicillin

2.2.2 Medien für Zelllinien

HEK293rapid-Vollmedium und MEF-Vollmedium	D-MEM high Glucose (GIBCO) 10% FBS (GIBCO) 2mM L-Glutamin (GIBCO) 1% Penicillin/Streptomycin (GIBCO)
HEK293rapid-Hungermedium	D-MEM high Glucose (GIBCO) 0,1% FBS (GIBCO) 2mM L-Glutamin (GIBCO) 1% Penicillin/Streptomycin (GIBCO)
FAO-Vollmedium	RPMI 1640 (GIBCO) 10% FBS (GIBCO) 2mM L-Glutamin (GIBCO) 1% Penicillin/Streptomycin (GIBCO)
FAO-Hungermedium	RPMI 1640 (GIBCO) 0,1% FBS (GIBCO) 2mM L-Glutamin (GIBCO) 1% Penicillin/Streptomycin (GIBCO)
Einfriermedium	FBS (GIBCO) 10% DMSO

2.3 Methoden zur DNA-Analyse

2.3.1 DNA-Präzipitation

Man präzipitiert DNA, um sie aufzukonzentrieren oder in einem anderen Puffer aufzunehmen. Bei der in dieser Arbeit bevorzugten Methode werden zur DNA-Lösung $\frac{1}{10}$ Vol. 3 M NaAc, pH 4,8, und 0,7 Vol. Isopropanol gegeben und durch Invertieren gemischt. Beim 25-minütigen Zentrifugieren bei 4°C sedimentiert die DNA. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wird das Pellet mit 70% EtOH gewaschen, um überschüssige Salze zu lösen. Anschließend wird das Pellet in der gewünschten Puffermenge gelöst.

2.3.2 Agarosegel-Elektrophorese

6 x Loading Dye Solution	30% Glycerol 0,5% Bromphenolblau 50 mM EDTA	MBI
1 x TAE	40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA	pH 8,0
Ethidiumbromid-Bad	5 µg/ml	

DNA-Molekulargewichtsmarker

100 bp DNA Ladder (INVITROGEN)	1000 ng/1 μ l
1 Kb Plus DNA Ladder (INVITROGEN)	1000 ng/1 μ l

Mithilfe der Agarosegel-Elektrophorese können DNA-Fragmente voneinander getrennt werden. Die Agarose-Matrix wirkt wie ein grobmaschiges Sieb, das den DNA-Fragmenten umso weniger Widerstand bietet, je kleiner diese sind.

Nach Beendigung der Elektrophorese wird das Gel für einige Minuten in ein Ethidiumbromidbad gelegt, um die DNA unter UV-Licht sichtbar machen zu können.

2.3.3. Isolierung von DNA aus Agarosegel-Fragmenten

Um die in einem Agarosegel aufgetrennte DNA zu isolieren, wurde das Kit „QIAquick Gel Extraction Kit“ von QIAGEN nach Standardprotokoll verwendet. Die gewünschte Bande wird dazu möglichst schnell unter 70 % UV-Licht ausgeschnitten.

2.4 PCR-Methoden

Die PCR führt enzymatisch und *in vitro* zu einer exponentiellen Amplifikation eines definierten DNA-Fragments. Sie findet vielfältige Anwendung, da sie eine sehr sensitive Nachweismethode für spezifische DNA-Sequenzen ist. Daher eignet sie sich zum Screenen transformierter Organismen. Sie wird auch benutzt, um Fragmente für die Klonierung mit den entsprechenden Restriktionsschnittstellen bereitzustellen. Dafür werden Oligonukleotide verwendet, die im 5'-Bereich nicht vollständig mit der Template-DNA übereinstimmen, sondern die Erkennungssequenz einer bestimmten Restriktionsendonuklease enthalten. Nach demselben Prinzip können auch längere DNA-Sequenzen an PCR-Produkte synthetisiert werden.

2.4.1 Standard-PCR

Platinum Taq DNA-Polymerase	5 U/μl	INVITROGEN
10x PCR-Puffer	200 mM Tris-HCl, pH 8,4	INVITROGEN
	500 mM KCl	
MgCl ₂ -Lösung	50 mM MgCl ₂	INVITROGEN
dNTP-Mix	1,25 mM	INVITROGEN
Primer (siehe Tabelle)	10 μM	MWG

Für einen typischen PCR-Ansatz werden zusätzlich einige fmol Template-DNA und ddH₂O ad 50 μl benötigt.

Die Standard-PCR findet unter folgenden Bedingungen im Thermocycler statt:

	3 min, 94°C	Initiale Denaturierung
18 Zyklen mit je	45 sek, 94°C	Denaturierung
	45 sek, 50-55°C	Annealing (Temperatur je nach Primer)
	1 min, 72°C	Elongation (pro 1 kb ca. 1 min)
	5 min, 72°C	Terminale Elongation (um noch nicht vollständige Amplifikate aufzufüllen)
	4°C	Lagerung

Tabelle 1: Für PCR verwendete Primer

Gelb unterlegt: Startcodon (ATG)

kursiv: Markierung der neu eingefügten Schnittstelle

Rote Schrift: Markierung der Mutation; Lysin (AAG) --> Alanin (GCG)

Klonierungs- und Overlap-PCR	
BamHI	TA <i>GGA TCC</i> ACC ATG CAG AGC ACA GCC AAT TAC
XmaI-as	CTC ATC ATC ATC CAG CTC C
SacI	CCT ACA CGA AAG GAC CTG C
EcoRI-as	TA <i>GAA TTC</i> GAC ATC AGG AGG TGC TGG
K38A fw	G GTT GCT GTG GCG GTC TTC AAC
K38A-as	GTT GAA GAC CGC CAC AGC AC C
Sequenzierungsprimer	
1015 hIKKε 639 S	GAT GAG TTC CTG GTG GTG C
1016 hIKKε 1160 S	CAT CAC CTG CCA GCT GTC AC
1017 hIKKε 2181 S	CCT TAG GTC ACA CAC GGC AAG
1018 hIKKε 1674 S	CAG GAG CTA ATG TTT CGG G
1040 hIKKε 1459 S	TAG AAT TCT GGA GCC CCT GTT CCC AGC
1052 hIKKε 1942 AS	GGT TCA GGC TGC TCA GG
Primer zur Genotypisierung der IKKε Knockout Mäuse	
GS(E,T)	AGC ATC TAA ATG GAA CTT CCC AGG C
NEO(T)	GGG CCA GCT CAT TCC TCC CAC TCA T
GS(E1)	TCC TGC CTC AGT ATT TCG AGA TGG G

2.4.2 Overlap-PCR

Das Grundprinzip der Overlap-PCR beruht auf der Tatsache, dass zwei DNAs gleichzeitig als Template (Megaprimer) eingesetzt werden können, wenn diese auf einem kurzen Abschnitt am Ende komplementäre Basensequenzen aufweisen. Bei geeigneter Wahl der Primer und äquimolarem Verhältnis der Template-DNAs ist es möglich, aus den beiden einander überlappenden Templates ein einziges, durchgehendes Produkt zu erzielen. Durch entsprechende vorgeschaltete PCR-Reaktionen ist es möglich, völlig verschiedene DNA-Bereiche mit den benötigten komplementären Sequenzen zu versehen, um sie zu fusionieren.

Overlap-PCR

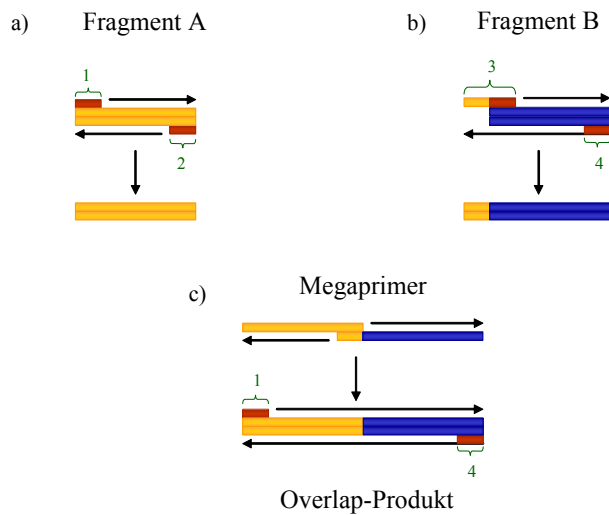


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Overlap-PCR

Zunächst werden Fragment A (gelb) und Fragment B (blau) amplifiziert (a und b). Der forward-Primer (3) des Fragments B enthält einen homologen Bereich zu seinem 5'-Ende (rot) und den Überlappungsbereich vom Fragment A (gelb). Bei der eigentlichen Overlap-PCR (c) fungieren Fragment A und B als Megaprimer und die Primer 1 und 4 als Außenprimer. Verwendete Primer (rot dargestellt; grüne Zahlen) 1: BamHI; 2: K38A-as; 3: K38A fw; 4: XmaI-as.

2.4.3 cDNA-Synthese

Mit Hilfe der Reversen Transkriptase kann aus RNA die dazu komplementäre cDNA hergestellt werden. Es wurde das „High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit“ von APPLIED BIOSYSTEMS nach Herstellerangaben benutzt.

MultiScribe Reverse Transcriptase (50 U/μl)	2,5 μl
Reverse Transcription Buffer (10X)	5 μl
RNase Out (40 U/μl)	1,25 μl
dNTP-Mix (25X)	2 μl
Random Primers (10X)	5 μl
DEPC-H ₂ O	ad 25 μl
RNA (1 μg)	1 μg

Die cDNA-Synthese findet unter folgenden Bedingungen im Thermocycler statt:

10 min 25°C
120 min 37°C
15 min 70°C
hold 4°C

2.4.4 TaqMan: Real Time PCR

Die Real-Time-quantitative-PCR ist eine spezielle PCR-Methode, die zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung bietet. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen während eines PCR-Zyklus (daher der Name „Real Time“) durchgeführt. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu, was die Quantifizierung möglich macht. Eine gelelektrophoretische Auftrennung der Fragmente ist nicht nötig.

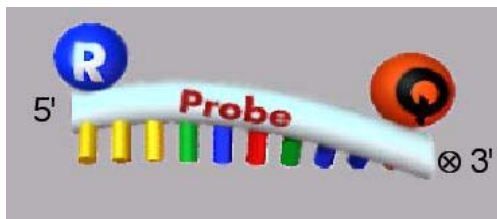


Abbildung 7: TaqMan-Sonde

Am 5'-Ende der TaqMan Sonde befindet sich der Fluoreszenz-Reporter (R), am 3'-Ende der Quencher (Q).

Die TaqMan Sonden sind an einem Ende mit dem Quencher, am anderen mit dem Reporter-Fluoreszenzstoff FAM markiert. Wenn die Taq-Polymerase, die zusätzlich eine Exonuclease-Aktivität besitzt, die Sonde während der Synthese des Gegenstranges am 5'-Ende abbaut, entfernen sich Quencher und Fluorophor voneinander und so kann die steigende Reporter-Fluoreszenz gemessen werden.

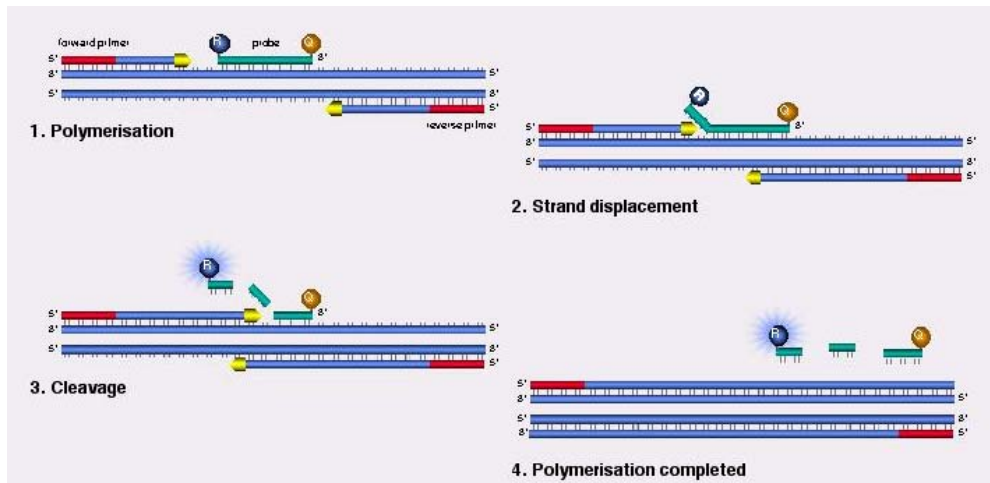


Abbildung 8: Ablauf RealTime-PCR

Quantifizierung von Nukleinsäuren mit Hilfe der RealTime-PCR und TaqMan-Sonden. 1. die Fluoreszenz des Reporter-Fluorophor (FAM) wird bei intakten TaqMan Sonden durch den Quencher unterdrückt. 2.+ 3. Die Taq-Polymerase baut während eines PCR-Zyklus das 5'-Ende der Sonde ab. 4. Der abgespaltene Reporter ist nun zur Fluoreszenz befähigt.

In dieser Arbeit wurden die genspezifischen Primer (assay on demand, AoD) von ABI (APPLIED BIOSYSTEMS) bezogen. (siehe Anhang)

Als Housekeeper wurde bei Messungen von RNA aus dem Muskel mPpie (peptidylprolyl isomerase E), bei den restlichen Geweben mTbp (TATA binding protein) verwendet.

2.5 Klonierung

2.5.1 Dephosphorylierung

Damit in ein linearisiertes Plasmid ein anderes DNA-Fragment eingefügt werden kann, wird dieses zunächst dephosphoryliert, so dass es nicht wieder religieren kann. Durch das Fehlen der 5'-Phosphatgruppen ist eine erneute Verknüpfung über Diesterbindungen zwischen den beiden Enden der DNA ausgeschlossen.

Der Ansatz wird 30 min bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung der alkalischen Phosphatase wird 15 min auf 85°C erhitzt.

1 µl	CIAP (Calf Intestine Alkaline Phosphatase); 1 U/µl
5 µl	Puffer
5 µl	linearisierter Vektor
35 µl	ddH ₂ O

Um Proteine zu dephosphorylieren, werden anstelle des linearisierten Vektors die an Agarosebeads gebundenen Proteine aus einer Immunpräzipitation (IP) (s. 2.7.7) eingesetzt. Für diese IP wurden dem Lysepuffer und der HNTG-Lösung kein Phosphataseinhibitorcocktail zugesetzt.

Der Ansatz wird 60 min bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Zur Inaktivierung der alkalischen Phosphatase werden die Beads 3x mit HNTG + Phosphataseinhibitorcocktail gewaschen.

25 µl	CIAP (Calf Intestine Alkaline Phosphatase); 1 U/µl
5 µl	Puffer
	Agarosebeads aus IP
20 µl	ddH ₂ O

2.5.2 Ligation

T4 DNA Ligase	5 U/µl	INVITROGEN
10x Ligationspuffer	400 mM Tris-HCl, pH 7,8	INVITROGEN
	100 mM MgCl ₂	
	100 mM DTT	
	5 mM ATP	

Ein Ligationsansatz enthält 400-800 ng restringierte, dephosphorylierte und gereinigte Vektor-DNA und die einzufügende Fremd-DNA. Der Ligationsansatz hat ein Volumen von 20µl. Es wird bei RT 1 Stunde inkubiert. Die T4 DNA Ligase kann durch 10-minütiges Erhitzen auf 65°C inaktiviert werden.

2.5.3 Restriktionsspaltungen

Restriktionsendonucleasen erkennen sequenzspezifische DNA-Doppelstränge und schneiden die DNA innerhalb dieser Bereiche. Diese palindromischen Erkennungssequenzen sind zwischen 4 und 8 bp lang.

Der Verdau von DNA erfolgt im enzymespezifischen Restriktionspuffer. Pro μg zu verdauender DNA werden 1-2 U Enzym eingesetzt. Der Verdau erfolgt meistens bei 37°C (siehe Herstellerangaben) innerhalb einer Stunde. Einige Enzyme verlangen den Zusatz von $100 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ Rinderserum-Albumin (BSA).

Enzymname	Schnittstelle	Konz.	Reaktionsbedingungen	Firma
<i>Bam</i> HI	G'GATC C	10 U/ μl	37°C Buffer <i>React 3</i>	GIBCO
<i>Eco</i> 8II (Testverdau)	CC'TNA GG	10 U/ μl	37°C Buffer Y ⁺ /TANGO TM	MBI
<i>Eco</i> RI	G'AATT C	10 U/ μl	37°C Buffer <i>Eco</i> RI	MBI
<i>Not</i> I	GC'GGCC GC	10 U/ μl	37°C Buffer O ⁺	MBI
<i>Sac</i> I	G AGCT'C	10 U/ μl	37°C Buffer <i>Sac</i> I	MBI
<i>Sst</i> I (<i>Sac</i> I)	G AGCT'C	10 U/ μl	37°C Buffer <i>React 2</i>	GIBCO
<i>Xma</i> I	C'CCGG G	10 U/ μl	37°C Buffer 4 +BSA	NEB

2.5.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 7,4 1 mM EDTA, pH 8,0
-----------	---

TE ist ein Standardpuffer für die längerfristige Lagerung von DNA. Er verhindert den Abbau der DNA durch DNasen dadurch, dass die dafür notwendigen 2-wertigen Ionen durch den Chelatbildner EDTA abgefangen werden.

2.5.5 Mini- und Midiprep

Die gewünschten Klone werden in 5 ml LB_{Amp} bei 37°C vorkultiviert und als 100 ml (Miniprep) bzw. 300 ml (Midiprep) LB_{Amp}-Kultur bei 37°C im Schüttler über Nacht angezogen. Die Zellen werden durch Zentrifugation bei 4°C sedimentiert.

Für die Plasmidisolierungen wurde das Kit „QIA Prep Spin Miniprep Kit“ bzw. „QIAGEN Plasmid Midi Kit“ von Qiagen nach Standardprotokoll benutzt.

2.5.6 Heatshock-Transformation

Pro Transformationsansatz wird ein $100 \mu\text{l}$ -Aliquot kompetenter Zellen (DH5 α ; INVITROGEN) auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe der Plasmid-DNA erfolgt eine 20-minütige Inkubation auf Eis. Anschließend werden die Zellen für 60 sek bei 42°C im Wasserbad einem Hitzeschock ausgesetzt und dann für 2 min auf Eis abgekühlt. Danach

wird der Ansatz in 250 μ l LB-Medium aufgenommen, auf eine LB_{Amp}-Platte ausgestrichen und ü.N. bei 37°C kultiviert.

2.6 Arbeiten mit eukaryotischen Zelllinien

2.6.1 Auftauen der Zellen

Das Zell-Vial aus dem Stickstofftank wird 3-4 min im 37°C Wasserbad aufgetaut. Die Zellsuspension wird in 10 ml des jeweiligen Vollmediums aufgenommen und 4 min bei 1000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wird in 10 ml Vollmedium resuspendiert und in eine 75 cm²-Flasche überführt.

Die Kultivierung erfolgt über Nacht bei 37°C und 5% CO₂, Mediumwechsel am nächsten Tag.

2.6.2 Kultivierung der Zellen

Die Zelllinien werden in Zellkulturflaschen von 162 cm² Fläche mit 25 ml des entsprechenden Vollmediums bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Sind sie zu 80 % konfluent, werden sie mit PBS gewaschen, mit Trypsin gelöst und 1:5 gesplittet.

2.6.3 Einfrieren der Zellen

Die Zellen werden trypsiniert, in Vollmedium aufgenommen und in einer Neubauer Zählkammer gezählt. 5 x 10⁶ Zellen werden 4 min bei 1000 rpm abzentrifugiert, in 500 μ l Einfriermedium aufgenommen und sofort in Cryo-Vials überführt, die ü.N. in einer „Mr. Frosty“-Isopropanolbox bei -80°C eingefroren werden. Diese Boxen gewährleisten, dass die Zellen pro min um 1°C abgekühlt werden. Anschließend werden die Cryo-Vials zur längerfristigen Lagerung in Flüssigstickstoff überführt.

2.6.4 Transformation

Die Zellen werden mit „FuGene“ von ROCHE nach Standardprotokoll transfiziert.

2.6.5 Lyse

Die Zellen werden mit PBS gewaschen und mit Lysepuffer (200 µl/well einer 6 well Platte) 15 min auf Eis lysiert. Anschließend werden die Zellrückstände 15 min bei 4°C abzentrifugiert.

Lysepuffer	25 mM Tris-HCl pH 7,4	
	1 mM EGTA	
	1 mM EDTA	
	10 mM NaF	
	10 mM Na ₄ P ₂ O ₇	
	1 % NP40	
	1 x Complete (ROCHE)	vor Gebrauch hinzufügen
	1 x Phosphataseinhibitorcocktail (SIGMA)	vor Gebrauch hinzufügen

2.6.6 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde mit dem „BCA Protein Assay Kit“ von PIERCE nach Standardprotokoll durchgeführt.

2.6.7 Immunpräzipitation

HNTG	50 mM HEPES pH 7,5	
	150 mM NaCl	
	0,1 % Triton X-100	
	10 % Glycerin	
	100 mM NaF	
	1 x Complete (ROCHE)	vor Gebrauch hinzufügen
	1 x Phosphataseinhibitorcocktail (SIGMA)	vor Gebrauch hinzufügen

Um ein spezifisches Protein aus dem Zelllysate zu gewinnen, wendet man die Immunpräzipitation (IP) an. Dabei wird zum Lysat der entsprechende Antikörper (ca. 4 µg/500µg Protein) gegeben und dann 3 h bei 4°C gerollt. Anschließend werden 50 µl Protein-A-bzw. Protein-G-Agarosebeads (Roche) dazugegeben und für eine weitere Stunde bei 4°C gerollt.

Die Beads werden kurz abzentrifugiert und 3x mit je 1 ml HNTG gewaschen. Das Pellet wird in 25 µl 1x Ladepuffer aufgenommen und 5 min bei 95°C inkubiert.

2.7 Arbeiten mit murinem Gewebe

2.7.1 Gewebepräparation

Lysepuffer		
Puffer I	50 mM Tris-HCl pH 7,4 250 mM Mannitol 10 % Glycerin 1 mM EDTA 1 mM EGTA	Sterilfiltrieren und bei 4°C lagern
Puffer II	Puffer I 20 mM Natriumpyruvat 2 mM NaOrthovanadat 1 mM DTT 50 mM NaF 1x Complete w/o EDTA 1x Phosphataseinhibitorcocktail	vor Gebrauch hinzufügen vor Gebrauch hinzufügen
Puffer III	10 % Triton X-100 in Puffer II	

0,1 – 0,3 g Leber bzw. epiWAT werden abgewogen, in ein 10 ml Reaktionsgefäß gegeben und auf Trockeneis gelagert. Die Gewebe werden mit 3 ml des gekühlten Puffers II für 40 sek mit einem Ultrathurrax homogenisiert. Nach Zugabe von 330 µl Puffer III und anschließenden Vortexen wird das Lysat 15 min auf Eis inkubiert. Danach folgt ein weiteres Homogenisieren mit dem Ultrathurrax für 10 sek.

Die Proben werden bei 4°C für 30 min bei 13000 rpm abzentrifugiert.

Der Überstand wird aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.7.2 RNA-Isolation

Die RNA aus den Lebern wird mit dem Kit „RNeasy Mini“ von QIAGEN nach Standardprotokoll isoliert. Das epiWAT wird zunächst mit dem „QIAzol Lysis Reagent“ von QIAGEN lysiert und dann ebenfalls mit dem Kit „RNeasy Mini“ bearbeitet.

2.8 Analysemethoden

2.8.1 Western Blot

10 x NET	1,5 M NaCl 50 mM EDTA 0,5 % Triton X-100 0,5 M Tris pH 7,4
Proteinstandard	MagicMark XP (INVITROGEN)

Die Westernblots wurden mit dem „NuPage Gel System“ von INVITROGEN nach Herstellerangaben durchgeführt.

Die Nitrocellulosemembranen wurden mit 1x NET geblockt. Die Primär- und Sekundärantikörper wurden mit 1x NET im Verhältnis 1:1000 bzw. 1:10000 verdünnt.

Die Detektion erfolgte mit der ECL-Substratlösung „Super Signal West Pico“ von PIERCE.

Tabelle 2 verwendete Antikörper

Antikörper	Größe	Firma	Cat. No.
IKKε	80 kDa	SANTA CRUZ	sc5693
pIKKa/b	85/87 kDa	CELL SIGNALING	cs2681
IR	95 kDa	SANTA CRUZ	07-724
IRS1	170 kDa	UPSTATE	06-248
IRS1 für IP	170 kDa	UPSTATE	05-699
pIRS1 (Ser307)	170 kDa	UPSTATE	07-247
pIRS1 (Ser636/639)	170 kDa	CELL SIGNALING	cs-2388
IRS2	185 kDa	UPSTATE	06-506
IRS2 für IP	185 kDa	SANTA CRUZ	sc-1555R
c-myc	-	SANTA CRUZ	sc40
PY20	-	BIOMOL	SA240
Sekundär-Antikörper			
Goat	-	JACKSON IMMUNO RESEARCH	111-035-045
Mouse	-	JACKSON IMMUNO RESEARCH	115-035-062
Rabbit	-	JACKSON IMMUNO RESEARCH	111-035-045
Sheep	-	JACKSON IMMUNO RESEARCH	313-005-003

2.8.2 Kinase-Assay

Assaypuffer; pH 7,5	60 mM HEPES 3 mM MgCl ₂ 3 mM MnCl ₂ 3 μM Orthovanadat 1,2 mM DTT 2,5 mg/50 ml PEG ₂₀₀₀₀
---------------------	---

Kinase-Assay A

pro Reaktionsansatz	30 ng IKK ϵ (PROQUINASE)
	0,5 μ Ci 33 P-ATP
	1 μ M ATP

Die Inhibierung von IKK ϵ wurde in einem Kinase-Assay unter steigenden Konzentrationen drei verschiedener Compounds (LILLY intern) gemessen.

Die Reaktionsansätze setzen sich wie folgt zusammen:

- 10 μ l Assaypuffer
- + 10 μ l IKK ϵ
- + 10 μ l ATP-Mix
- + 10 ml Compound
- + 10 μ l Casein

Für die Negativkontrollen wurde ein Ansatz ohne IKK ϵ und einer ohne IKK ϵ und Casein pipettiert. Bei der Negativkontrolle wurde keine Compound zugegeben.

Die Ansätze wurden für 90 min bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Dann wurden 130 μ l 10 % ige Phosphorsäurehinzugegeben um die Reaktion zu stoppen. Je 160 μ l eines Ansatzes wurde in einer vorbenetzte Filterplatte überführt, abgesaugt und 3-mal mit 200 μ l 0,5 % iger Phosphorsäure gewaschen. Die Platte wurde anschließend 60 min bei 60°C getrocknet. Nach Zugabe von 30 μ l MicroScint 0 pro well wurde die Messung durchgeführt.

Kinase-Assay B

pro Reaktionsansatz	30 ng IKK ϵ (PROQUINASE)
	0,5 μ Ci 33 P-ATP
	1 μ M ATP

Um den Effekt von IKK ϵ auf IRS1 und IRS2 *in vitro* zu untersuchen, wurde einen Kinase-Assay mit rekombinantem IKK ϵ und radioaktivem 33 P-ATP durchgeführt.

Dazu wurden zunächst HEK293rapid-Zellen mit IRS1 bzw. IRS2 und als Negativkontrollen mit einer inaktiven Form des Insulinrezeptors (IR K/A) bzw. LacZ transfiziert.

Von den jeweiligen Zelllysaten wurden IPs gemacht. Diese wurden aufgeteilt, um den Assay einmal mit und einmal ohne IKK ϵ durchzuführen.

Als Positivkontrolle diente Casein (2,5 μ g pro Ansatz).

IP-Agarosebeads bzw. Casein in 10 μ l Assaypuffer

+ 10 µl Assaypuffer (+/- IKKε)

+ 10 µl ATP-Mix

Die Reaktionen wurden 90 min bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert und mit 6 µl Ladepuffer gestoppt. Die Proben wurden auf ein SDS-Gel (Invitrogen) aufgetragen. Die Proteine wurden nach dem Gellauf ü.N. mit dem „GelCode Blue Stain Reagent“ von PIERCE angefärbt. Nach 2-stündigem Waschen mit Wasser wurde das Gel getrocknet und einem Autoradiogramm unterzogen.

2.8.3 TKA-ELISA

Assaypuffer; pH 7,5	50 mM Tris
	150 mM NaCl
	0,05 % Tween-20
	5 mM MnCl ₂
	50 µM ATP

Um zu untersuchen, ob IKKε den Insulinrezeptor phosphoryliert und so dessen Autophosphorylierung beeinträchtigt wird ein TKA-ELISA (Tyrosin Kinase Activator) durchgeführt, bei dem ein biotinyliertes IR-Peptid, das vom Insulinrezeptor phosphoryliert werden kann, als Substrat dient. Das Peptid enthält einen Teil der katalytischen Domäne der Tyrosinkinase mit den Tyrosinresten Tyr-1158, Tyr-1162 und Tyr-1163 (noch unveröffentlicht). Es bindet an die mit Streptavidin gecoatete Platte und die phosphorylierten Tyrosinreste werden vom HRP-gelabelten 4G10-Antikörper detektiert.

Zu dem Peptid wird Insulinrezeptor, bzw. als Negativkontrolle die kinase-inaktive Form des Insulinrezeptors (IR K/A) gegeben. In je einen Ansatz wird vor Peptidzugabe mit IKKε inkubiert (60 min bei 37°C), um dessen Einfluss auf die Aktivität des Insulinrezeptors zu untersuchen.

In eine Rundbodenplatte werden pipettiert:

20 µl Insulinlösung (20 nM)

+ 60 µl Assaypuffer

+ 10 µl Peptidlösung (50 µM)

+ 10 µl Insulinrezeptorlösung

Die Ansätze werden 120 min bei 30°C und leichtem Schwenken inkubiert. Danach werden je 60 µl auf eine Neutravidin-gecoatete Platte übertragen und für weitere 60 min

bei 30°C inkubiert. Die Platten werden 6-mal mit 200 µl PBS gewaschen, dann werden für 30 min bei 30°C 50 µl des Antikörpers (1:20000 verdünnt) hinzugegeben. Es folgt ein erneuter Waschschrift. Je well werden 100 µl der TMB-Substratlösung pipettiert und für 15 min bei RT inkubiert. In dieser Zeit setzt das an den Antikörper gekoppelte HRP das Substrat zu einem blauen Farbstoff um. Nach Zugabe von 100 µl der Stop-Lösung wird bei 450 nm gemessen.

2.8.4 RealTime PCR (TaqMan)

Universal Mix (2X)	15 µl
Assay on Demand	1,5 µl
cDNA (1:3-Verdünnung)	5 µl
DEPC-H ₂ O	ad 30 µl

Die TaqMan-Ansätze werden in eine 384-well Platte umpipettiert (4 wells à 5 µl) und anschließend gemessen.

Zur Quantifizierung der TaqMan RealTime PCR wurde als Referenzgen für die cDNA aus Leber, epiWAT und Niere mTbp (TATA binding protein), für die cDNA aus Muskel mPpie (peptidylprolyl isomerase E) verwendet. Als Standardkurve wurde die Formel „virtually Quantity = $10^{((Ct - 35)/(-3.3219))}$ “ zugrunde gelegt. Das Expressionsniveau ist in den Abbildungen als virtuelle Kopienzahl dargestellt.

2.8.5 NFκB-Aktivitätsmessung

Die NFκB Aktivitätsmessung erfolgt mit dem Kit „TransAM Flexi NFκB Family“ von ACTIVE MOTIV nach Standardprotokoll.

Der im Assay eingesetzte Zellextrakt – hier der von wt- und IKKε KO-Lebern – enthält ggf. aktiviertes NFκB, das an das im Kit vorhandene biotinylierte Oligonucleotid bindet. Dieser Komplex haftet an der Streptavidin-gecoateten Assayplatte und kann mithilfe der spezifischen NFκB-Antikörper (p65; p50; p52; c-Rel und RelB) quantitativ nachgewiesen werden.

2.8.6 Genotypisierung der IKK ϵ -Knockoutmäuse

Zur Genotypisierung der Knockoutmäuse wird aus den Schwanzspitzen der Mäuse mit dem Kit „DNeasy tissue“ von QIAGEN gDNA nach Standardprotokoll gewonnen. Zur Kontrolle werden die Wildtypmäuse ebenfalls genotypisiert.

Dazu wird eine PCR mit den spezifischen Genotypisierungsprimern durchgeführt, um anhand der unterschiedlichen Größe der PCR-Produkte zu erkennen, ob die für den Knockout eingefügte NEO-Kassette vorhanden ist.

3 Ergebnisse

3.1 Interaktion von IKKε mit dem Insulinrezeptor und seinen Substraten in vitro

Es sollte der Einfluss von IKKε auf die Entstehung der Insulinresistenz untersucht werden. Dazu wurden zunächst *in vitro*-Experimente zur Interaktion von IKKε mit dem Insulinrezeptor und seinen Substraten durchgeführt. Neben *in vitro* Kinase-Assays mit rekombinantem IKKε zur Untersuchung der Insulinrezeptor- und Insulinrezeptorsubstratphosphorylierung wurde IKKε in insulinsensitiven Zelllinien transient exprimiert, um mögliche Auswirkungen auf die Insulinsignaltransduktion zu untersuchen.

3.1.1 *in vitro*-Aktivität von rekombinantem IKKε

Das rekombinante IKKε wurde von PROKINASE bezogen. Zur Kontrolle, und um die Assaybedingungen für die folgenden Versuche zu optimieren, wurde zu Beginn die Aktivität des rekombinanten IKKε *in vitro* untersucht. Dazu wurde ein Kinase-Assay mit radioaktivem ³³P-ATP etabliert, bei dem Casein als Substrat von IKKε phosphoryliert werden sollte. Im Weiteren wurden verschiedene Konzentrationen von drei unterschiedlichen Inhibitoren (LILLY intern) eingesetzt. Bei diesem Assay kann ausschließlich das gebundene ³³P gemessen werden (cpm = counts per minute).

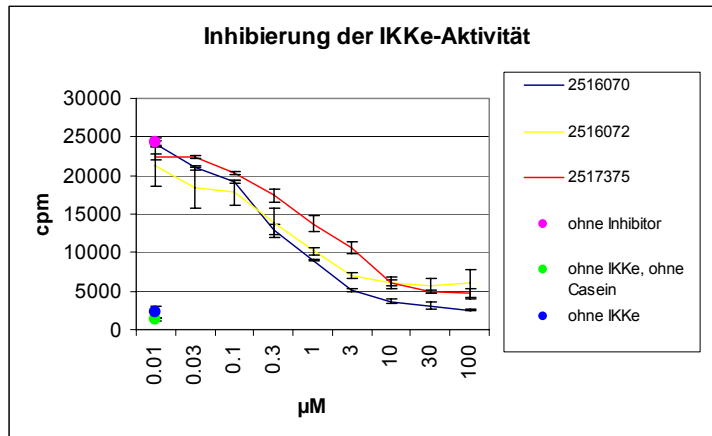


Abbildung 9: Phosphorylierung von Casein durch rekombinantes IKKε

Die Abbildung zeigt die Inhibierung der IKKε-Aktivität (counts per minute; cpm) bei zunehmender Konzentration drei verschiedener Inhibitoren (2516070; 2516072; 2517375; LILLY interne Nummerierung). Als blauer Punkt dargestellt ist eine Negativkontrolle, der beim Assay kein IKKε zugesetzt wurde, so dass Casein nicht phosphoryliert werden konnte. Die zweite Negativkontrolle (grüner Punkt) enthält weder Casein noch IKKε, und repräsentiert den Background. Im Ansatz der Positivkontrolle (rosa Punkt) wurde kein Inhibitor zugesetzt, so dass dieser die komplette Phosphorylierung von Casein durch IKKε darstellt. Bei einer Inhibitor-Konzentration von 0,01 μM besteht so gut wie keine Inhibierung der IKKε-Aktivität, bei 100 μM ist sie fast 100 %ig.

Der Assay zeigt, dass die Aktivität des rekombinanten IKKε mit zunehmender Konzentration der drei verschiedenen Inhibitoren gleichermaßen abnimmt (

Abbildung 9). Als Positivkontrolle (rosa Punkt) diente ein Ansatz, der IKKε und Casein, aber keinen Inhibitor enthielt. Der gemessene Wert von ca. 25000 cpm (counts per minute) zeigt die maximale Phosphorylierung des Caseins durch IKKε. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz mit Casein, aber ohne IKKε gemessen, er stellt die basale Phosphorylierung des Caseins dar (blauer Punkt). Zum Vergleich wurde ein Ansatz gemessen, bei dem weder IKKε noch Casein zugegeben wurden (grüner Punkt). Dieser repräsentiert den Backgroundwert.

Bei einer Inhibitor-Konzentration von 0,01 μM besteht so gut wie keine Inhibierung der IKKε-Aktivität, bei 100 μM hingegen ist sie fast 100 %ig. Das rekombinante IKKε ist unter den ausgewählten Versuchsbedingungen aktiv und kann für die geplanten Experimente verwendet werden.

3.1.2 IKK ϵ -vermittelte Phosphorylierung des Insulinrezeptors

In den folgenden Experimenten wird der Einfluss von IKK ϵ auf den Insulinrezeptor analysiert. Es soll untersucht werden, ob IKK ϵ den Insulinrezeptor (IR) phosphoryliert und so dessen Autophosphorylierung und die Insulinsignaltransduktion beeinträchtigt.

Zur Untersuchung der IKK ϵ -vermittelten Phosphorylierung des Insulinrezeptors wird ein TKA-ELISA (Tyrosin Kinase Aktivator) durchgeführt, bei dem ein biotinyliertes IR-Peptid, das vom Insulinrezeptor phosphoryliert werden kann, als Substrat dient. Das Peptid umfasst einen Teil der katalytischen Domäne der Insulinrezeptor-Tyrosinkinase mit den Autophosphorylierungsresten Tyr-1158, Tyr-1162 und Tyr-1163. Es bindet an die mit Streptavidin beschichtete Platte und die phosphorylierten Tyrosinreste werden mittels eines HRP-markierten 4G10-Antikörpers detektiert. Zu dem Peptid wird Insulinrezeptor, bzw. als Negativkontrolle die kinase-inaktive Form des Insulinrezeptors (IR K/A) gegeben. Je ein Ansatz wird vor Peptidzugabe mit rekombinantem IKK ϵ inkubiert, um dessen Einfluss auf die Aktivität des Insulinrezeptors zu untersuchen.

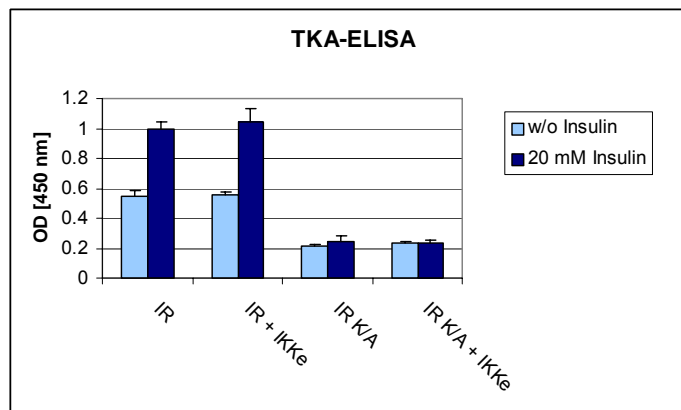


Abbildung 10: Ergebnisse des TKA-ELISA

Beim TKA (Tyrosin Kinase Aktivator)-ELISA werden die Phosphorylierungen an drei Tyrosinresten (Tyr-1158, Tyr-1162, Tyr-1163) der katalytischen Domäne des Insulinrezeptors mit einem HRP-gekoppelten 4G10-Antikörper detektiert. Diese befinden sich in der Sequenz eines biotinylierten Peptides. Phosphoryliert wird es unter Insulinstimulation (dunkelblaue Bande) vom Insulinrezeptor (IR). Als Negativkontrolle dient die kinase-inaktive Form des Insulinrezeptors (IR K/A). In je einem Ansatz wird der IR bzw. IR K/A vor Zugabe des Peptids zunächst mit IKK ϵ inkubiert, um dessen Auswirkung auf die Aktivität des Insulinrezeptors zu untersuchen. *In vitro* ist kein Einfluss von IKK ϵ auf die Insulinrezeptoraktivität festzustellen.

Die hellblauen Balken stellen die basale Aktivität des IR bzw. IR K/A dar, in diesen Ansätzen war kein Insulin vorhanden (Abbildung 10). Die dunkelblauen Balken hingegen zeigen die erhöhte Aktivität des Insulinrezeptors (Autophosphorylierung der Tyrosin-Reste) nach Insulinstimulation. Um den Einfluss von IKK ϵ auf die Aktivität des Insulinrezeptors zu untersuchen, wird dieser zunächst in einem vorgeschalteten Kinase-Assay mit rekombinatem IKK ϵ inkubiert, ebenso wie der inaktive Insulinrezeptor (IR K/A), der als Negativkontrolle dient. IKK ϵ zeigt *in vitro* keinen Einfluss auf die Aktivität des Insulinrezeptors.

Im vorausgegangenen Experiment konnte mithilfe des Peptids, welches die katalytische Domäne der Insulinrezeptor-Tyrosinkinase umfasst, kein Einfluss von IKK ϵ auf die Aktivität des Insulinrezeptors nachgewiesen werden. Um dieses Ergebnis abzusichern, wird ein radioaktiver Kinase-Assay durchgeführt.

Für dieses Experiment werden zunächst HEK293rapid-Zellen mit drei verschiedenen Konstrukten transfiziert. Dabei handelt es sich um Plasmide, die zum einen LacZ, sowie den Insulinrezeptor (IR) bzw. die inaktive Form des Insulinrezeptors (IR K/A) umfassen. Von den drei Transfektionen wird nach der Lyse je ein Drittel der Lysate mit dem myc-Antikörper immunpräzipitiert, hier kann nur das myc-getagte LacZ binden. Mit dem Rest der Lysate wird eine Immunpräzipitation (IP) mit dem Insulinrezeptor-Antikörper durchgeführt. Die IR-IPs werden aufgeteilt. Die eine Hälfte – ebenso wie die kompletten myc-IPs – werden in Anwesenheit von rekombinatem IKK ϵ einem radioaktiven Kinase-Assay unterzogen, der zweiten Hälfte wird beim Assay kein rekombinantes IKK ϵ hinzugegeben. Das im Assay eingesetzte ^{33}P -ATP ermöglicht den Nachweis von Phosphorylierungen mittels eines Autoradiogramms. Die einzelnen Reaktionen werden über ein SDS-Gel aufgetrennt, das im Anschluss zum Sichtbarmachen der Proteine gefärbt wird (Coomassie-Färbung).

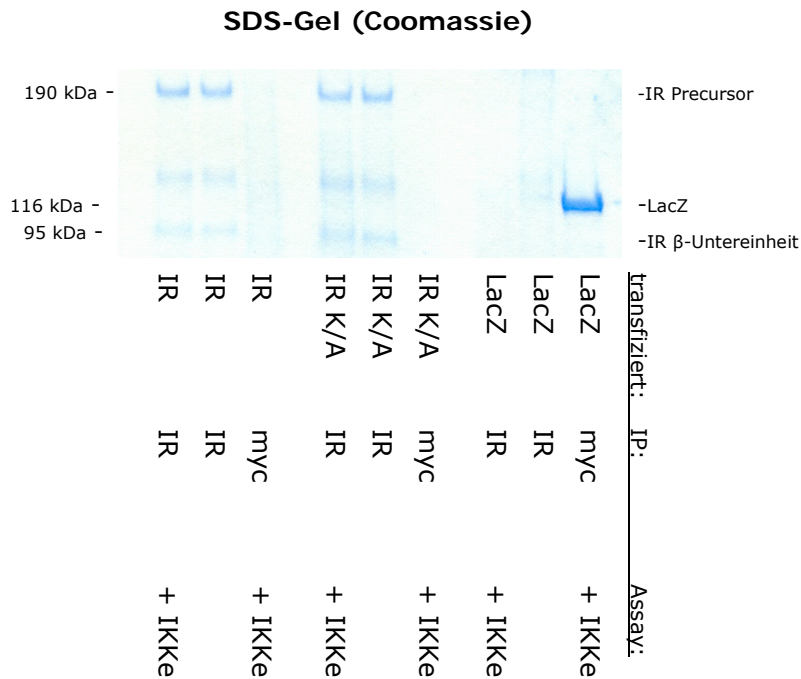


Abbildung 11: Coomassie-gefärbtes SDS-Gel des IR-Kinase-Assays

HEK293rapid-Zellen wurden mit LacZ bzw. der kinase-inaktiven Form des Insulinrezeptors (IR K/A) oder dem Insulinrezeptor (IR) transfiziert und lysiert. Es wurde jeweils eine Immunpräzipitation (IP) mit dem myc- bzw. dem IR-Antikörper durchgeführt. Die myc-IP sowie eine Hälfte der beiden IR (K/A)-IPs wurden einem radioaktiven (^{33}P -ATP) Kinase-Assay mit IKK ϵ unterzogen, ebenso die zweite Hälfte der IR (K/A)-IPs, aber ohne IKK ϵ . Die Ansätze wurden danach auf einem SDS-Gel aufgetrennt, das im Anschluss gefärbt und getrocknet wurde. Es ist zu sehen, dass bei den mit den Insulinrezeptoren transfizierten Zellen nur bei der IR-IP Insulinrezeptor immunpräzipitiert wurde, da kein myc-tag vorhanden ist, und bei den mit LacZ transfizierten Zellen wurde lediglich bei der myc-IP das myc-getagte LacZ immunpräzipitiert. Die Mengen an immunpräzipitiertem Insulinrezeptor und seinem Precursor sind in den jeweiligen Spuren gleich.

Bei der myc-IP wurde lediglich in den LacZ-Lysaten das einen myc-tag enthaltende LacZ immunpräzipitiert (Abbildung 11). In den Spuren der Insulinrezeptor-IP sind lediglich bei den Insulinrezeptor-Lysaten (IR und IR K/A) jeweils die β -Untereinheit des Insulinrezeptors und der Insulinrezeptor-Precursor zu sehen. Die Proteinmengen sind jeweils in den zwei IR- bzw. IR K/A Spuren vergleichbar.

Anschließend wurde von dem getrockneten Gel ein Autoradiogramm erstellt, bei dem die mit ^{33}P phosphorylierten Proteine detektiert wurden.

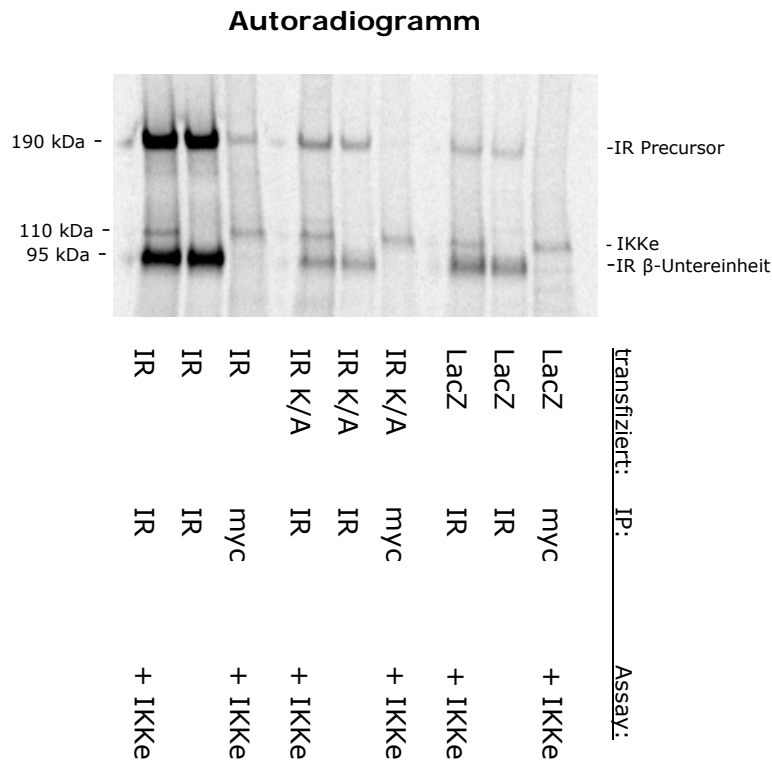


Abbildung 12: Autoradiogramm des IR-Kinase-Assays

Die Phosphorylierung der Proteine mit ^{33}P können mittels eines Autoradiogramms detektiert werden. Dazu wird das SDS-Gel des radioaktiven Kinase-Assays auf einen „storage phosphor screen“ aufgelegt, der anschließend mit einem Laser gelesen wird. Je höher die Strahlung an den entsprechenden Bereichen ist, d. h., je stärker diese phosphoryliert wurden, desto dunkler werden sie dargestellt. Man sieht, dass die β -Untereinheit des intakten Insulinrezeptors und der IR-Precursor $\text{IKK}\epsilon$ -unabhängig gleich stark phosphoryliert wurden. In den Spuren der IR K/A- sowie der LacZ-Lysate sieht man die Phosphorylierung der endogenen β -Untereinheit und dem endogenen IR-Precursor. Die Ursache für die höhere Intensität der Banden der LacZ-Lysate wird später diskutiert.

Das Autoradiogramm des IR-Kinase-Assays zeigt dunkle Banden, d. h. erhöhte Phosphorylierung, der β -Untereinheit des intakten Insulinrezeptors und des IR-Precursors (Abbildung 12). Sie sind in etwa gleich stark, unabhängig von der Zugabe von rekombinantem $\text{IKK}\epsilon$. Die Banden der β -Untereinheit des inaktiven Insulinrezeptors (IR K/A) und des IR-Precursors sind in etwa mit dem endogenen Spiegel des Insulinrezeptors der LacZ-Proben vergleichbar.

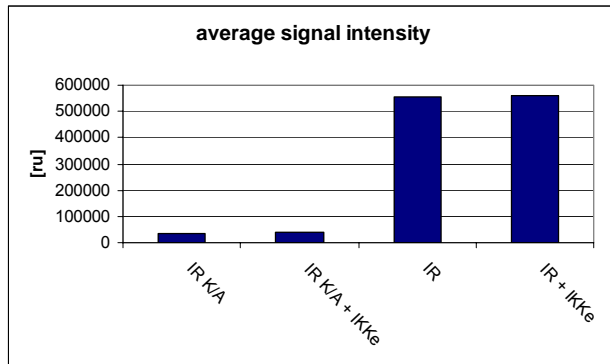


Abbildung 13: Quantifizierung des Autoradiogramms des IR-Kinase-Assays

Die Banden der phosphorylierten β -Untereinheiten des Insulinrezeptors wurden quantifiziert und als durchschnittliche Signalintensität in relativen Einheiten (ru) dargestellt. Die kinase-inaktiven Formen der β -Untereinheit des Insulinrezeptors wurden kaum phosphoryliert. Das Signal bei den intakten Insulinrezeptoren ist deutlich höher. Bei beiden IR-Formen hat IKK ϵ keinen signifikanten Einfluss auf den Grad der Phosphorylierung.

Die Banden der β -Untereinheiten der Insulinrezeptoren wurden zur genaueren Analyse quantifiziert. Bei der β -Untereinheit des intakten Insulinrezeptors (IR) wurden 8-mal höhere Werte als bei der kinase-inaktiven Form (IR K/A) gemessen. Das Vorhandensein von IKK ϵ im Assay zeigt hat keinen Einfluss auf die Phosphorylierung der β -Untereinheiten des Insulinrezeptors.

3.1.3 IKK ϵ -vermittelte ^{33}P -Phosphorylierung von IRS1 und IRS2

Da IKK ϵ eine Kinase ist, soll untersucht werden, ob es IRS1 und IRS2 *in vitro* direkt phosphoryliert. Dazu wurde ein radioaktiver Kinase-Assay durchgeführt. Es wurde von den Lysaten der mit IRS1 bzw. einer kinase-inaktiven Form des Insulinrezeptors (IR K/A) und LacZ-transformierten HEK293rapid-Zellen mit dem jeweiligen Antikörper zunächst eine Immunpräzipitation (IP) gemacht. Die an die Agarosebeads gebundenen Proteine wurden beim Kinase-Assay als Substrate eingesetzt. Sie wurden mit rekombinantem IKK ϵ (als Basiswert ohne IKK ϵ) und radioaktivem ^{33}P -ATP inkubiert. In der Positivkontrolle wurde rekombinantes Casein eingesetzt, das eine Vielzahl von unspezifischen Phosphorylierungsstellen hat, und sich deshalb als Positivkontrolle anbietet. Während des Kinase-Assays werden die Substrat-Proteine ggf. von IKK ϵ mit ^{33}P phosphoryliert, was später in einem Autoradiogramm nachgewiesen werden kann. Im Anschluss an den Kinase-Assay wurden die einzelnen

Ansätze zunächst über ein SDS-Gel aufgetrennt, das zum Sichtbarmachen der Proteine Coomassie-gefärbt und danach getrocknet wurde.

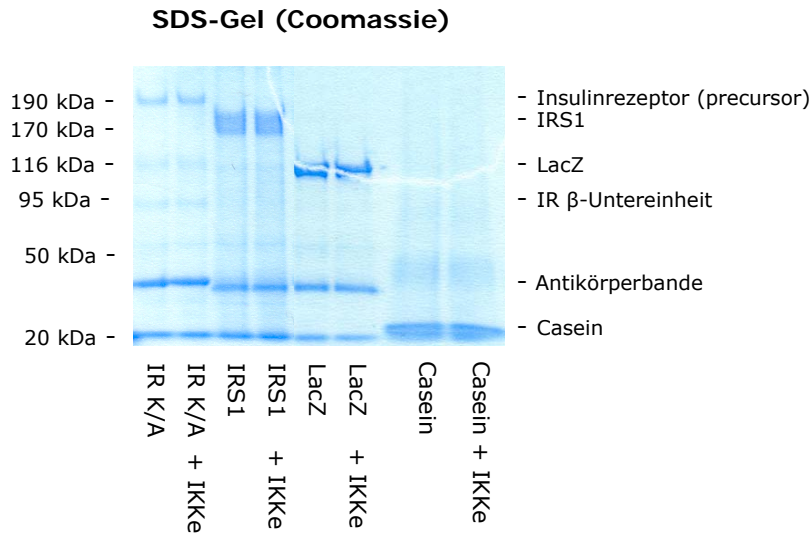


Abbildung 14: Coomassie-gefärbtes SDS-Gel des IRS1-Kinase-Assays

HEK293rapid-Zellen wurden mit der kinase-inaktiven Form des Insulinrezeptors (IR K/A) bzw. IRS1 oder LacZ transfiziert und lysiert. Mit den entsprechenden Antikörpern wurde je eine Immunpräzipitation (IP) gemacht, die anschließend aufgeteilt wurde. Mit den einzelnen Ansätzen der IPs sowie zusätzlich rekombinantes Casein als Positivkontrolle wurde jeweils ein Kinase-Assay mit radioaktivem ^{33}P -ATP durchgeführt, je einmal mit und einmal ohne rekombinantes IKKe. Die Ansätze wurden danach über ein SDS-Gel aufgetrennt, das im Anschluss Coomassie-gefärbt und getrocknet wurde. Zu sehen ist, dass in den jeweils 2 Spuren von IR K/A, IRS2, LacZ und Casein gleiche Mengen an Protein aufgetragen wurden.

Das Coomassie-gefärbte SDS-Gel des IRS1-Kinase-Assays diente dazu, um zu kontrollieren, ob die IP funktioniert hat und Protein präzipitiert wurde, und des Weiteren, um zu zeigen, dass in den je 2 Spuren der einzelnen Kinase-Assays die gleiche Menge an Protein aufgetragen wurde, damit die einzelnen Spuren später im Autoradiogramm miteinander verglichen werden können (Abbildung 14). Die Transfektion mit LacZ diente der Transfektionskontrolle. Die Negativkontrolle des Kinase-Assays ist die Transfektion mit der kinase-inaktiven Form des Insulinrezeptors (IR K/A), da in Abbildung 12 und Abbildung 13 keine IKKe-vermittelte Phosphorylierung von IR K/A festzustellen war. Als Positivkontrolle wurde Casein in rekombinanter Form eingesetzt.

Die Proteinmengen in den 2 Spuren der jeweiligen Kinase-Assays sind je gleich groß. In den Spuren, in denen die IR K/A-Immunpräzipitation aufgetragen wurde, sind der Precursor und die β -Untereinheit des Insulinrezeptors zu erkennen. In den anderen

Spuren sieht man die Banden von IRS1, LacZ und Casein. In allen Spuren, in denen eine IP aufgetragen wurde, ist die entsprechende Antikörperbande zu sehen.

Anschließend wurde von dem getrockneten Gel ein Autoradiogramm erstellt. Dabei werden die vom IKK ϵ mit ^{33}P phosphorylierten Proteine detektiert. Beim Autoradiogramm wird das getrocknete Gel, das das radioaktive ^{33}P enthält, über Nacht in einer Filmkassette auf einen so genannten „storage phosphor screen“ aufgelegt, der durch die Strahlung des ^{33}P je nach Intensität minimal seine Struktur verändert. Diese Deformation wird mittels eines Lasers gelesen und bildlich dargestellt. Je höher die Strahlung ist, desto dunkler sind die entsprechenden Bereiche.

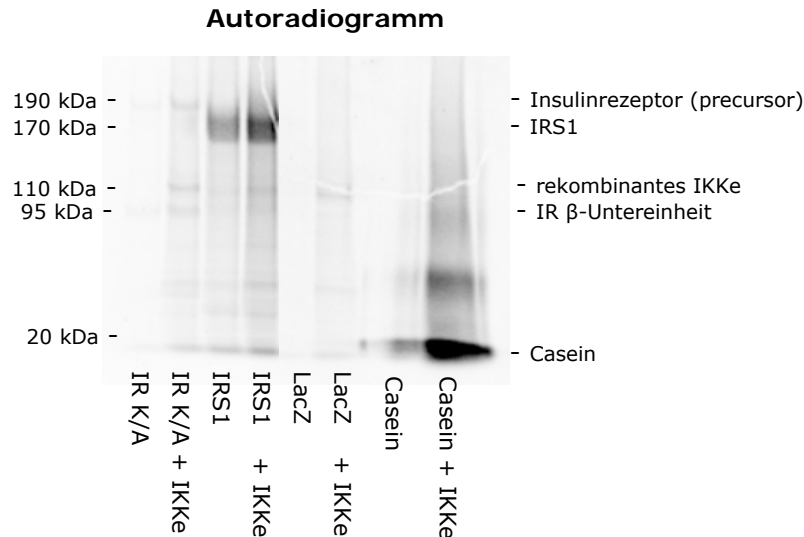


Abbildung 15: Autoradiogramm des IRS1-Kinase-Assays

Die Phosphorylierung der Proteine mit ^{33}P durch IKK ϵ kann mittels eines Autoradiogramms detektiert werden. Dazu wird das SDS-Gel des radioaktiven Kinase-Assays auf einen „storage phosphor screen“ aufgelegt, der später mit einem Laser gelesen wird. Je höher die Strahlung an den entsprechenden Bereichen ist, und damit je stärker diese von IKK ϵ phosphoryliert wurden, desto dunkler werden sie dargestellt. Deutlich ist eine stärkere Phosphorylierung von IRS1 und Casein bei Vorhandensein von IKK ϵ im Kinase-Assay zu sehen.

Das Autoradiogramm des IRS1 Kinase-Assays zeigt in der Spur, in der die Casein-Positivkontrolle mit rekombinatem IKK ϵ aufgetragen wurde, deutlich eine dunkle Bande auf der Laufhöhe des Caseins (Abbildung 15). Diese repräsentiert eine starke ^{33}P -Phosphorylierung des Substrates durch IKK ϵ . In den Spuren der LacZ-Transfektionskontrollen und der Negativkontrolle (IR K/A) sind keine Phosphorylierungen nachweisbar. Deutlich zu erkennen ist die dunklere Bande von

IRS1 in der Spur, in der IRS1 mit IKK ϵ inkubiert wurde. IKK ϵ hat demnach IRS1 direkt phosphoryliert.

Aufgrund der vorherigen Kontrolle der Proteinmengen im Coomassie-gefärbten Gel ist diese Phosphorylierung eindeutig, dennoch soll sie quantitativ ausgewertet werden. Dazu werden jeweils die 2 Banden des Precursors des Insulinrezeptors, von IRS1 und des Caseins miteinander verglichen.

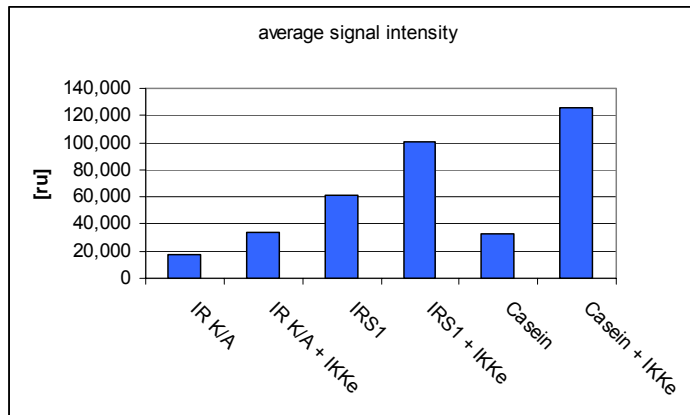


Abbildung 16: Quantifizierung des Autoradiogramms des IRS1-Kinase-Assays

Die Banden der phosphorylierten Proteine wurden quantifiziert und als durchschnittliche Signalintensität in relativen Einheiten (ru) dargestellt. Bei der Casein-Positivkontrolle ist das Signal bei Vorhandensein von IKK ϵ im Assay 4-mal höher. Beim IR K/A ist nahezu eine Verdopplung festzustellen und bei IRS1 erhöhen sich die Werte um den Faktor 1,7.

Die Quantifizierung der IKK ϵ -vermittelten Phosphorylierung ist in relativen Werten (relative Einheiten, ru) dargestellt (Abbildung 16). Die Phosphorylierung des Caseins ist nach Inkubation mit IKK ϵ 4-mal so hoch wie in dem Kinase-Assay, dem kein IKK ϵ zugesetzt wurde. Beim Precursor des IR K/A ist nahezu eine Verdopplung der Phosphorylierung festzustellen und bei IRS1 erhöhen sich die Werte um den Faktor 1,7.

Ebenfalls sollte die Phosphorylierung von IRS2 durch IKK ϵ untersucht werden. Dazu wurde derselbe radioaktive Kinase-Assay wie im vorangehenden Experiment durchgeführt. Wiederum wurde von den Lysaten der in diesem Fall mit IRS2 bzw. IR K/A und LacZ-transformierten HEK293rapid-Zellen mit dem jeweiligen Antikörper zunächst eine IP gemacht. Diese wurde dann mit rekombinatem IKK ϵ (als Basiswert ohne IKK ϵ) und radioaktivem ^{33}P -ATP inkubiert und über ein SDS-Gel aufgetrennt. Die im SDS-Gel enthaltenen Proteine wurden angefärbt (Coomassie-Färbung).

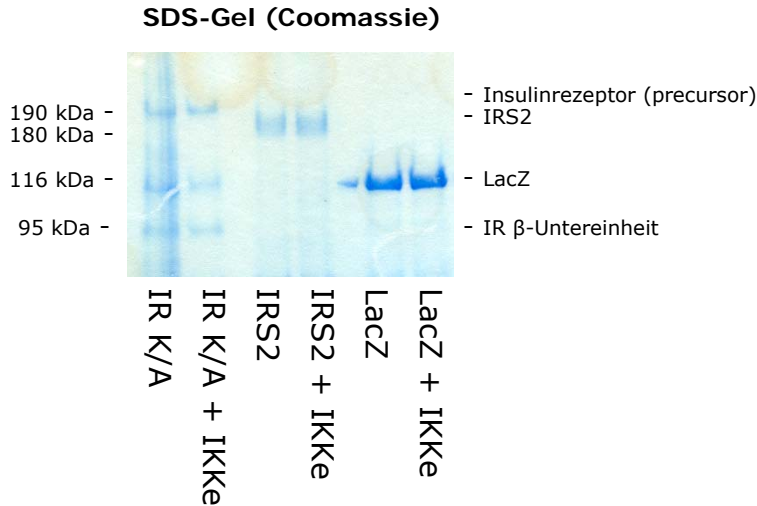


Abbildung 17: Coomassie-gefärbtes SDS-Gel des IRS2-Kinase-Assays

HEK293rapid-Zellen wurden mit der kinase-inaktiven Form des Insulinrezeptors (IR K/A) bzw. IRS2 oder LacZ transfiziert und lysiert. Mit den entsprechenden Antikörpern wurde je eine Immunpräzipitation durchgeführt, die anschließend aufgeteilt wurde. Mit den einzelnen Ansätzen der IPs sowie zusätzlich rekombinantes Casein als Positivkontrolle wurde jeweils ein Kinase-Assay mit radioaktivem ^{33}P -ATP durchgeführt, je einmal mit und einmal ohne rekombinantes IKKe. Die Ansätze wurden danach über ein SDS-Gel aufgetrennt, das im Anschluss Coomassie-gefärbt und getrocknet wurde. Zu sehen ist, dass in den jeweils 2 Spuren von IR K/A, IRS2 und LacZ gleiche Mengen an Protein aufgetragen wurden.

Die Transfektion mit LacZ diente der Transfektionskontrolle, diejenige mit der kinase-inaktiven Form des Insulinrezeptors (IR K/A) als Negativkontrolle des Kinase-Assays. Das gefärbte SDS-Gel diente wiederum dazu, um zu kontrollieren, dass die IP funktioniert hat und Protein präzipitiert wurde, und des Weiteren, um zu zeigen, dass in den jeweils 2 Spuren der unterschiedlichen Transfektionsansätze gleich viel Protein vorhanden ist. In den je 2 Spuren des Kinase-Assays mit dem Insulinrezeptor K/A, von IRS2 und von LacZ sind vergleichbare Mengen an Protein aufgetragen (Abbildung 17).

Um die IKKe-vermittelte Phosphorylierung der Proteine sichtbar zu machen, wurde wiederum ein Autoradiogramm erstellt. Je höher die Strahlung ist, d. h. je mehr ^{33}P eingebaut wurde, desto dunkler sind die entsprechenden Bereiche.

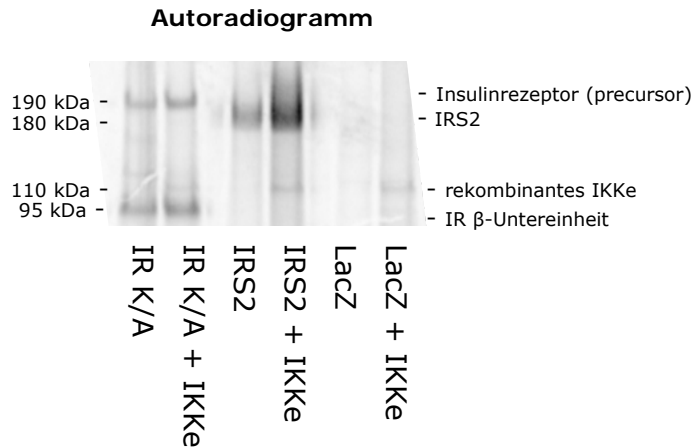


Abbildung 18: Autoradiogramm des IRS2-Kinase-Assays

Die Phosphorylierung der Proteine mit ^{33}P durch $\text{IKK}\epsilon$ können mittels eines Autoradiogramms detektiert werden. Deutlich ist eine stärkere Phosphorylierung von IRS2 bei Vorhandensein von $\text{IKK}\epsilon$ im Kinase-Assay zu sehen.

Das Autoradiogramm zeigt eine deutlich dunklere Bande von IRS2 in der Spur, in der der Kinase-Assay, dem $\text{IKK}\epsilon$ zugesetzt war, aufgetragen wurde (Abbildung 18). IRS 2 wurde demzufolge direkt von $\text{IKK}\epsilon$ phosphoryliert. In den jeweiligen Spuren der LacZ- und IR K/A-Kinase-Assays sind keine Unterschiede in der Phosphorylierung der Proteine zu sehen, hier kann keine $\text{IKK}\epsilon$ -vermittelte Phosphorylierung nachgewiesen werden.

Die im Autoradiogramm zu sehende Phosphorylierung von IRS2 durch $\text{IKK}\epsilon$ soll auch quantitativ ausgewertet werden. Dazu werden jeweils die 2 Banden des Precursors des Insulinrezeptors als Negativkontrolle und die von IRS2 untereinander verglichen.

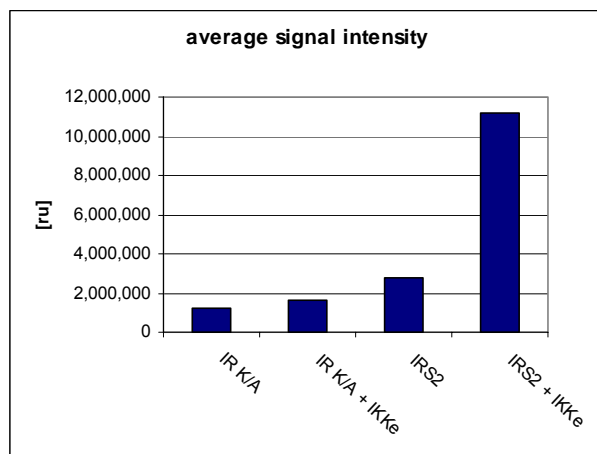


Abbildung 19: Quantifizierung des Autoradiogramms des IRS2-Kinase-Assays

Die Banden der phosphorylierten Proteine wurden quantifiziert und als durchschnittliche Signalintensität in relativen Einheiten (ru) dargestellt. Der Precursor des Insulinrezeptors K/A wird von $\text{IKK}\epsilon$ nur minimal phosphoryliert, die Intensität des Signals bei IRS2 hingegen erhöht sich um mehr als das 4-fache.

Dargestellt ist die quantitative Auswertung der IKK ϵ -vermittelten Phosphorylierung des Precursors des Insulinrezeptors K/A und von IRS2 (Abbildung 19). Die Werte (relative Einheiten; ru) des IR K/A steigen bei Vorhandensein von IKK ϵ im Assay lediglich um Faktor 1,3. Bei IRS2 erhöhen sich die Werte um mehr als das 4-fache.

In den radioaktiven Kinase-Assays konnte jeweils eine direkte Phosphorylierung von IRS1 sowie IRS2 durch IKK ϵ nachgewiesen werden.

Wie das vorherige Experiment zeigte, scheint IKK ϵ IRS1 und IRS2 zu phosphorylieren. Daher soll eine Phosphopeptidanalyse durchgeführt werden, um nach Möglichkeit konkrete Phosphorylierungsstellen zu bestimmen. Dazu wurden HEK293rapid Zellen mit IRS1 bzw. IRS2 transfiziert. Nach der Lyse wurde eine Immunpräzipitation mit dem IRS1- bzw. IRS2-Antikörper gemacht. Die IPs wurden im Kinase-Assay in Gegenwart von IKK ϵ eingesetzt. Anschließend wurden die Proteine über ein SDS-Gel aufgetrennt, das Coomassie-gefärbt wurde, damit die entsprechenden Banden ausgeschnitten und zur weiteren Analyse an die PROTEOME FACTORY, Berlin, geschickt werden konnten. Dort wurde eine Phosphopeptidanalyse von IRS1 durchgeführt. Aufgrund zu geringer Proteinmengen konnten die IRS2-Proben nicht analysiert werden.

Die Untersuchung von IRS1 zeigte eine deutliche Phosphorylierung der Serin-Reste 636 und 639. In der Sequenz von IRS2 ist ein sehr ähnliches Motiv zu finden, es unterscheidet sich lediglich durch 2 Aminosäuren. Dabei handelt es sich um Asparaginsäure statt Glycin und Alanin anstelle von Lysin (in der Sequenz unterstrichen).

```
601 nlhtddgymp mspgvapvps nrkgngdymp mspksvsapq qiinpirrhp qrvdpngymm  
Ausschnitt aus der Aminosäuresequenz von IRS1 (ACCESSION CAA41264)  
  
661 alagsgsgsc rsddympmsp asvsapkqil qpraaaaaaa avpsagpagp aptsaagrtf  
Ausschnitt aus der Aminosäuresequenz von IRS2 (ACCESSION NP_003740)
```

Abbildung 20: Sequenzausschnitt von IRS1 und IRS2 mit Ser636/639-Motiv

Abgebildet ist der Ausschnitt der IRS1- und der IRS2-Sequenz, der die Ser636/639-Phosphorylierungsstelle enthält (rote Schrift, Serin-Reste fett geschrieben). Unterstrichen sind die Aminosäuren, die in den beiden Sequenzen unterschiedlich sind.

3.1.4 Einfluss von IKK ϵ auf die Insulinsignaltransduktion in insulinsensitiven Zellmodellen

Für die Untersuchungen von IKK ϵ in verschiedenen Säugerzelllinien (HEK293rapid und FAO) sollte die cDNA von IKK ϵ und die der kinase-inaktiven Mutante IKK ϵ K38A in einem geeigneten Transfektionsvektor bereitgestellt werden.

Die humane IKK ϵ -cDNA lag kloniert im Expressionsvektor pCMV6-XL4 von ORIGENE vor. Für Klonierungen wurde der pcDNA3.1A-Vektor aus dem INVITROGEN Vektor-System verwendet.

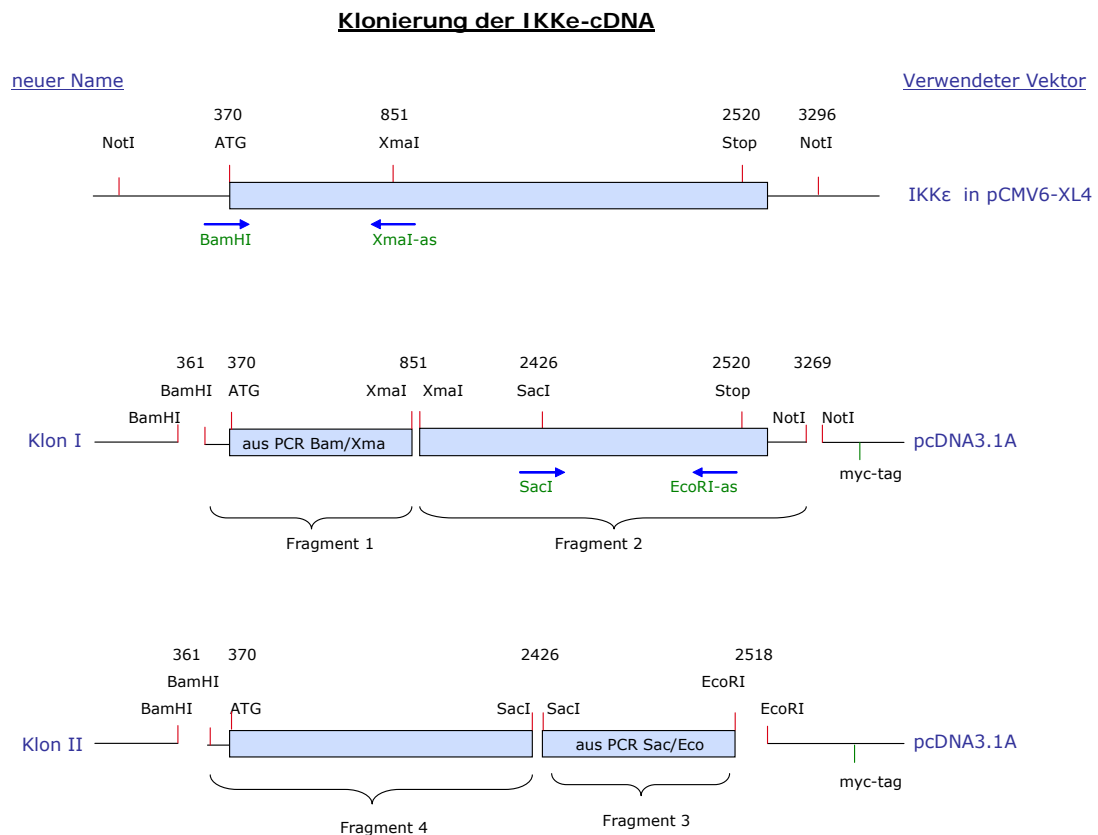


Abbildung 21: Schematische Darstellung der IKK ϵ -Klonierungsstrategie

Die hellblauen Bereiche stellen die IKK ϵ -cDNA dar. Aus dem Ursprungsmaterial (IKK ϵ in pCMV6-XL4) wird mit den Primern „BamHI“ und „XmaI-as“ (grüne Schrift) das Fragment 1 amplifiziert, welches eine BamHI-Schnittstelle beinhaltet. Mit den Restriktionsenzymen XmaI und NotI wird das Fragment 2 aus dem Ursprungsmaterial geschnitten. Fragment 1 und 2 werden in den mit BamHI und NotI geöffneten Vektor pcDNA3.1A ligiert, es entsteht „Klon I“. Fragment 3 entsteht durch eine PCR in Klon I mit den Primern „SacI“ und „EcoRI-as“, es beinhaltet eine EcoRI-Schnittstelle, die für die spätere Overlap-PCR benötigt wird. Aus Klon I wird mit BamHI und SacI Fragment 4 geschnitten. Fragment 3 und 4 werden in den mit BamHI und EcoRI geöffneten Vektor pcDNA3.1A ligiert, es entsteht „Klon II“.

Die cDNA des humanen IKK ϵ lag im Expressionsvektor pCMV6-XL4 vor. Für die geplanten Experimente sollte die cDNA in einen für Transfektionen in Säugerzelllinien geeigneten Vektor umkloniert werden. Als Vektor wurde pcDNA3.1A ausgesucht, in den die cDNA ohne frameshift kloniert werden kann. Er enthält die Schnittstellen, die für die Generierung der kinase-inaktiven Mutante IKK ϵ K38A notwendig sind. Des Weiteren verfügt der Vektor über einen myc-His-tag am N-Terminus der Multiple cloning site.

Im ersten Schritt der Klonierung der IKK ϵ -cDNA wurde aus dem Ursprungsplasmid (IKK ϵ in pCMV6-XL4) eine PCR mit dem fw-Primer „BamHI“ und dem Rev-Primer „XmaI-as“ durchgeführt (Abbildung 21). Der fw-Primer „BamHI“ umfasst die Sequenz der *BamHI*-Schnittstelle (G’GATC_C), die im Zuge der PCR vor dem Startcodon (ATG) eingefügt wurde (Fragment 1). Fragment 2 wurde aus dem Ursprungsplasmid mit den Restriktionsenzymen *XmaI* und *NotI* geschnitten. Anschließend wurden die beiden Fragmente in den mit *BamHI* und *NotI* geöffneten Vektor pcDNA3.1A ligiert. Der entstandene Zwischenklon trägt die Bezeichnung „Klon I“.

Als Nächstes sollte zum einen der myc-His-Tag in frame gebracht werden, sowie für die folgende Generierung der kinase-inaktiven Mutante IKK ϵ K38A eine *EcoRI*-Schnittstelle eingefügt werden. Dazu wurde eine PCR in Klon I mit den Primern „*SacI*“ und „*EcoRI*-as“ durchgeführt. Das Amplifikat wird als Fragment 3 bezeichnet. Fragment 4 wurde aus „KlonI“ mit *BamHI* und *SacI* geschnitten. Abschließend wurden die Fragmente 3 und 4 in den mit *BamHI* und *EcoRI* geöffneten Klon I ligiert. Das entstandene Produkt wird als „Klon II“ bzw. 296 hIKK ϵ pcDNA3.1hismycA bezeichnet.

Als Negativkontrolle zum intakten IKK ϵ -Genprodukt sollte eine Mutante generiert werden, bei der die Funktionalität des Gens ausgeschaltet ist. Hierfür wurde mit Hilfe der Overlap-PCR aus dem IKK ϵ -Klon die kinase-inaktive Mutante IKK ϵ K38A erzeugt. Dazu wird das sich an Position 38 der Aminosäuresequenz befindende Lysin (AAG) durch einen zweifachen Basenaustausch in Alanin (GCG) umgewandelt. Dieser Lysinrest befindet sich in der ATP-Bindungsdomäne der Kinase. Ist er mutiert, kann kein ATP mehr gebunden werden, was zum Verlust der Kinaseaktivität führt. (PETERS, 2000) Aus den Abkürzungen der Aminosäuren (K für Lysin und A für Alanin) sowie der Position der mutierten Aminosäure ergibt sich der Name der Mutante (IKK ϵ K38A).

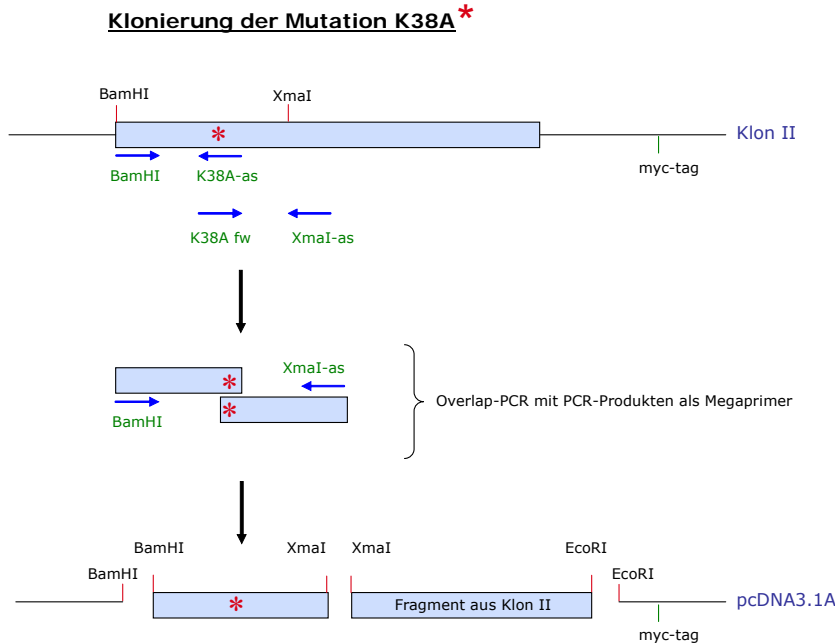


Abbildung 22: Schematische Darstellung der Overlap-PCR

Mit den Primern „BamHI“ und „K38A-as“ sowie „K38A fw“ und „XmaI-as“ werden die beiden Fragmente amplifiziert, in die jeweils über die K38A-Primer, die die mutierte Sequenz enthalten, im Zuge der PCR die Mutation eingebaut wird. Die Produkte haben einen komplementären Abschnitt, so dass sie in der Overlap-PCR als Megaprimer eingesetzt werden können. Das Produkt der Overlap-PCR wird zusammen mit dem *XmaI/EcoRI* geschnittenen Fragment aus Klon II in den mit *BamHI* und *EcoRI* geschnittenen pcDNA3.1A-Vektor ligiert.

Die Mutation im IKK ϵ -Gen, die zur Inaktivierung der Kinaseaktivität führt, wird bei der Overlap-PCR über die Primer eingebaut. Die Primer „K38A fw“ und „K38A-as“ enthalten die mutierte Sequenz (siehe

Tabelle 1). Zunächst müssen die beiden DNA-Fragmente, die miteinander fusioniert werden sollen, amplifiziert werden (Abbildung 22). In der ersten PCR wird das N-terminale Fragment mit den Primern „BamHI“ und „K38A-as“ amplifiziert, in der zweiten PCR das C-terminale Fragment mit den Primern „K38A fw“ und „XmaI-as“. Da die beiden K38A-Primer die komplementäre Sequenz haben, entsteht bei den Produkten ein identischer Abschnitt, der als Überlappungsbereich dient. Auf diese Weise ist es möglich, die Fragmente bei der Overlap-PCR so miteinander zu verbinden, dass sie basengenau aufeinander folgen, damit es zu keiner Leserasterverschiebung kommt und das Gen intakt bleibt. Bei der Overlap-PCR dienen die beiden Produkte als Megaprimer, d. h., dass die PCR zunächst ohne die Aussenprimer „BamHI“ und

„XmaI-as“ gestartet wird und nach einigen Zyklen, in denen die Megaprimer zum neuen Template amplifiziert werden, zugegeben werden.

Das Produkt der Overlap-PCR wird für die folgende Ligation mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Xma*I geschnitten. Ein weiteres Fragment wird mit *Xma*I und *Eco*RI aus dem Klon II geschnitten. Diese beiden Fragmente werden in den *Bam*HI/*Eco*RI-geöffneten pcDNA3.1A-Vektor ligiert. Das Produkt ist die kinase-inaktive Mutante von IKKε (312 hIKKε K38A pcDNA3.1hismycA), sie wird im weiteren Verlauf zur Vereinfachung als „IKKε K38A“ bezeichnet.

Der IKKε-cDNA Klon sowie die IKKε K38A-Mutante wurden sequenziert, um sicherzustellen, dass es zu keiner Verschiebung des Leserasters gekommen ist, und dass die Basenaustausche korrekt stattgefunden haben. Des Weiteren wird das Konstrukt auf mögliche Basensubstitutionen hin untersucht, die zu einer „missense“- oder „nonsense“-Mutation führen könnten (Sequenzen siehe Anhang). Die entstandenen Vektoren sehen wie folgt aus:

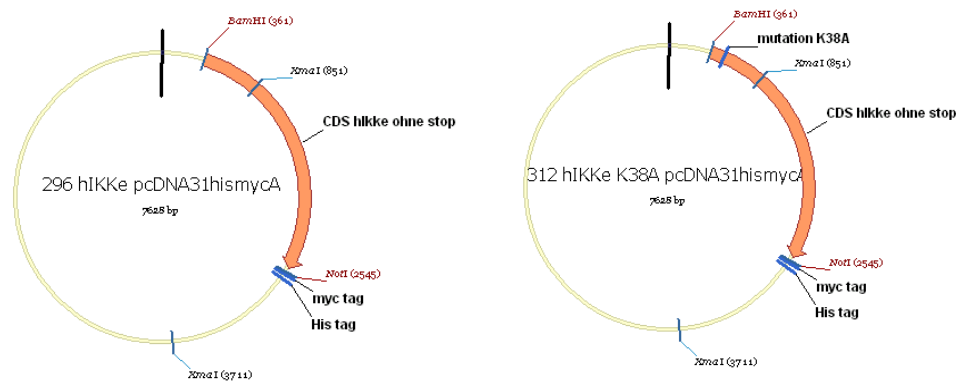


Abbildung 23: Vektorkarten des IKKε-Klones sowie des IKKε K38A-Klones

Die Vektorkarten zeigen in Gelb dargestellt den Vektorbackbone und in Orange die CDS (coding sequence). Des Weiteren sind für die Klonierung essentielle Schnittstellen eingezeichnet (*Bam*HI, *Xma*I und *Not*I), His- und myc-tag, und im Falle der Mutante ist die Position der Mutation markiert (mutation K38A). Die Namen der Klone setzen sich aus interner Klonnummer (296 bzw. 312), dem Namen des klonierten Gens (hIKKε bzw. hIKKε K38A), sowie dem Namen des verwendeten Vektors (pcDNA3.1A) zusammen. Beide Vektoren sind 7628 bp groß.

Die Sequenzierung bestätigte, dass die Klonierung wie gewünscht funktioniert hat. Die Konstrukte „296hIKKε pcDNA3.1hismycA“ und „312hIKKε K38A pcDNA3.1hismycA“ werden im weiteren Verlauf zur Vereinfachung als IKKε bzw. IKKε K38A bezeichnet.

Im weiteren Verlauf der Arbeit sollte der Einfluss von IKK ϵ auf die Insulinsignaltransduktion in insulinresistenten Zelllinien untersucht werden. Dazu wurde in FAO-Zellen eine erhöhte IKK ϵ -Expression durch TNF α -Stimulierung induziert. In den HEK293rapid-Zellen wurde IKK ϵ bzw. IKK ϵ K38A nach Transfektion mit den zuvor generierten Plasmiden transient exprimiert.

Um den Einfluss von IKK ϵ auf die Insulinsignaltransduktion in FAO-Zellen zu untersuchen, wurden diese mit TNF α stimuliert, um die endogene Expression von IKK ϵ zu induzieren (AUPPERLE et al., 2001). Um eine deutliche Expressionssteigerung sehen zu können, wurde dazu zunächst die benötigte Dauer der TNF α Stimulation ermittelt. Dafür wurden FAO-Zellen unterschiedlich lange (0 min bis 24 h) mit 20 ng/ml TNF α stimuliert. Da im Anschluss mit den TNF α -stimulierten Zellen Versuche zur Insulinsignaltransduktion durchgeführt werden sollen, wurde je die Hälfte der Zellen vor der Lyse für 15 min mit 10 nM Insulin stimuliert, um einen möglichen Einfluss der Insulinstimulation auf die IKK ϵ -Expression auszuschließen.

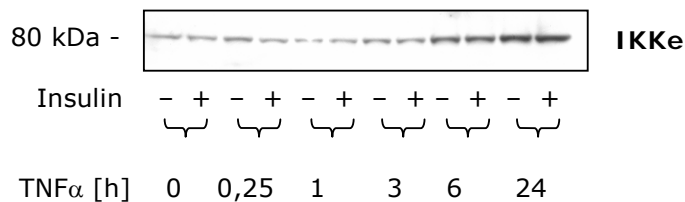


Abbildung 24: Zeitverlauf der IKK ϵ -Expression nach TNF α -Stimulation

Die Abbildung zeigt den Anstieg der IKK ϵ -Expression in FAO-Zellen nach TNF α -Stimulation (20 ng/ml) nach 0 min, 15 min, 1 h, 3 h, 6 h und 24 h. Nach 24 h ist die Expression von IKK ϵ am höchsten. Die 15-minütige Insulinstimulation (10 nM) hat keinen Einfluss auf die Expression von IKK ϵ .

Der Zeitverlauf der TNF α -Stimulation zeigt nach 6 Stunden bereits einen deutlichen Anstieg der IKK ϵ -Expression in den FAO-Zellen. Nach 24 Stunden ist die IKK ϵ -Expression maximal. Die Insulinstimulation hat keinen Einfluss auf die Expression von IKK ϵ .

Basierend auf diesem Ergebnis wurden in den folgenden Experimenten FAO-Zellen für 24 Stunden mit 20 ng/ml TNF α sowie zum Vergleich (KRAVCHENKO et al., 2003) mit 10 ng/ml PMA bzw. 1 μ g/ml LPS stimuliert (als Kontrolle dient ein Ansatz ohne Stimulation). Vor der Lyse wurde jeweils die Hälfte der Zellen für 15 min mit 10 nM Insulin stimuliert.

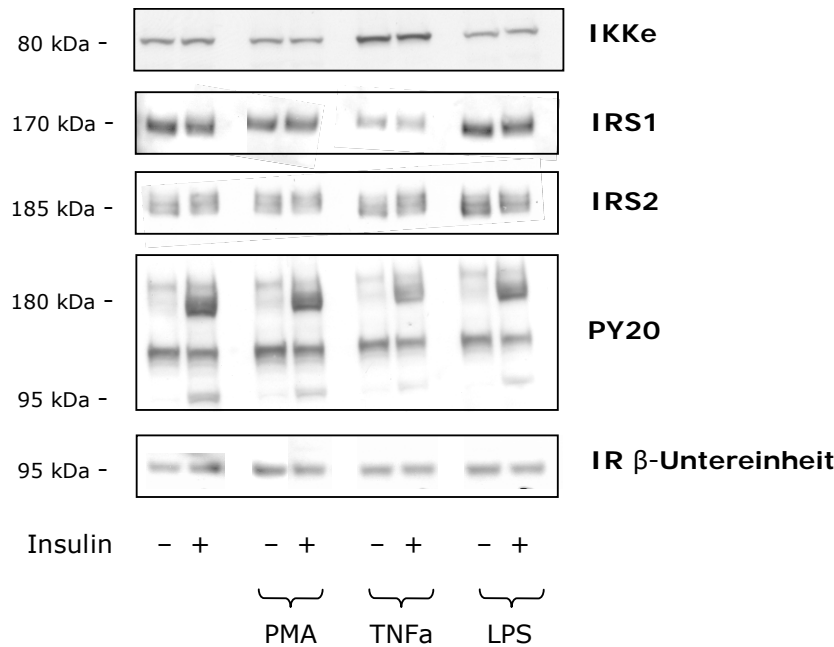


Abbildung 25: TNF α -vermittelte Induktion der IKK ϵ -Expression in FAO-Zellen

Die Abbildung zeigt verschiedene Western Blots von den Lysaten der für 24 Stunden mit 10 ng/ml PMA bzw. 20 ng/ml TNF α oder 1 μ g/ml LPS stimulierten FAO-Zellen. Zusätzlich wurde ein Kontrollansatz ohne Stimulation durchgeführt. Je eine Hälfte der Zellen wurde für 15 min mit 10 nM Insulin behandelt. Der IKK ϵ -Blot zeigt lediglich nach der TNF α -Stimulation insulinunabhängig eine deutlich erhöhte Expression von IKK ϵ . Beim PY20-Blot sieht man jeweils eine starke Zunahme der Phosphorylierung nach Insulinstimulation. Diese ist jedoch in den mit TNF α behandelten Spuren schwächer. IRS1 wird unter TNF α Stimulus schwächer exprimiert, Insulin zeigt keinen Einfluss auf die IRS1-Expression. Bei IRS2 ist weder durch Insulin noch durch einen anderen Stimulus eine Veränderung zu sehen.

Bei den Western Blots ist lediglich beim PY20-Blot ist die typische erhöhte Phosphorylierung der Proteine nach Insulinstimulus zu sehen (Abbildung 25). In den anderen Western Blots zeigen sich keine Unterschiede in der Expression der Proteine nach Insulinstimulation. Beim IKK ϵ -Blot sieht man deutlich die erhöhte Expression von IKK ϵ nach TNF α -Stimulation. LPS und PMA hingegen haben keine Auswirkung auf die Stärke der Expression. Beim PY20-Blot ist eine weniger starke Phosphorylierung der Proteine nach TNF α -Stimulation festzustellen. Ebenso ist die Expression von IRS1 nach TNF α -Behandlung deutlich erniedrigt. Auf IRS2 scheint kein Stimulus einen Einfluss zu haben.

Um zu zeigen, dass die verminderte Phosphorylierung in den TNF α -stimulierten FAO-Zellen durch die erhöhte Expression von IKK ϵ zustande kommt, müsste man die Expression von IKK ϵ gezielt ausschalten. Das kann mithilfe von siRNA (small interfering RNA) gemacht werden. Dazu wird die dem Zielgen entsprechende siRNA in FAO-Zellen transfiziert. Die siRNA verbindet sich mit einem Proteinkomplex, in Folge

dessen die Ziel-mRNA abgebaut wird und es zu einem „Gen-Knockdown“ kommt. Die FAO-Zellen wurden mit zwei verschiedenen siRNAs (QIAGEN) transfiziert, zur Kontrolle wurde ein Ansatz untransfiziert gelassen. In jeder Gruppe erfolgte in einem Ansatz eine 24-stündige Stimulation mit 20 ng/ml TNF α , um die Expression von IKK ϵ zu induzieren, der andere Teil der Zellen blieb unstimuliert. Vor der Lyse wurde jeweils die Hälfte der Zellen für 15 min mit 10 nM Insulin stimuliert.

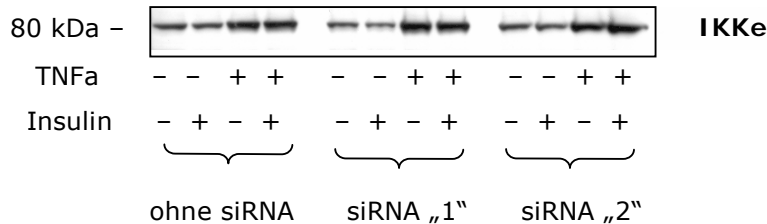


Abbildung 26: IKK ϵ -Gen-Knockdown mit siRNA

Zu sehen ist der IKK ϵ -Western Blot der mit TNF α stimulierten und verschiedenen siRNAs transfizierten FAO-Zellen. IKK ϵ wird unter TNF α Stimulus insulinunabhängig erhöht exprimiert. Es ist kein siRNA-vermittelter Gen-Knockdown von IKK ϵ zu erkennen.

Der Western Blot mit dem IKK ϵ -spezifischen Antikörper läßt keinen Gen-Knockdown von IKK ϵ durch die siRNAs erkennen (Abbildung 26). Nach TNF α -Stimulation ist in allen Zellen eine deutlich erhöhte Expression von IKK ϵ zu erkennen. Bei den mit siRNA1 bzw. siRNA2 transfizierten und mit TNF α stimulierten Zellen sollte die Expression auf dem gleichen Niveau sein wie bei den unstimulierten Zellen. Als Transfektionskontrolle wurde GFP-gekoppelte siRNA in FAO-Zellen transfiziert, diese war unter dem Fluoreszenzmikroskop nicht zu sehen (Abbildung 27). Abbildung 28 zeigt die erfolgreiche Transfektion von FAO-Zellen mit einem Plasmid, das das GFP-Gen enthält. Nach 48 h war deutlich die Fluoreszenz der mit GFP transfizierten Zellen zu beobachten. Weitere Protokolle und Methoden (CLAMPIT, 2003) (unterschiedliche Transfektionsreagenzien sowie Elektroporation) zur siRNA-Transfektion führten nicht zum IKK ϵ -Gen-Knockdown.

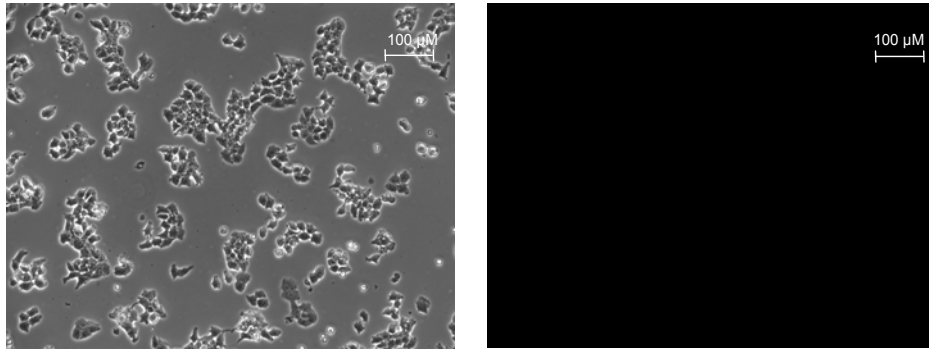


Abbildung 27: mit GFP-markierter siRNA transfizierte FAO-Zellen

Als Transfektionskontrolle wurden FAO-Zellen mit GFP-markierter siRNA transfiziert. In der linken Abbildung sind die FAO-Zellen im Durchlicht zu sehen. Nach 48 h war unter dem Fluoreszenzmikroskop (rechte Abbildung) kein GFP-Signal zu erkennen.

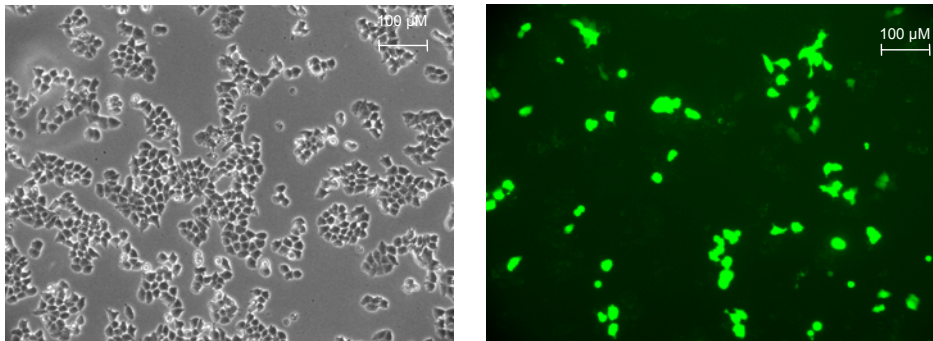


Abbildung 28: mit GFP transfizierte FAO-Zellen

FAO-Zellen wurden mit einem Plasmid transfiziert, das das GFP-Protein exprimiert. Links zu sehen sind die FAO-Zellen im Durchlicht. Die rechte Abbildung zeigt die Zellen nach 48 h unter dem Fluoreszenzmikroskop. Deutlich zu erkennen sind die einzelnen Zellen, die GFP erfolgreich exprimieren.

Da sich die FAO-Zellen mit Plasmiden nur mit geringer Effizienz und schlecht reproduzierbar und mit siRNA gar nicht transfizieren ließen, wurden mit ihnen keine weiterführenden Versuche zum Einfluss auf die Insulinrezeptor-vermittelte Signaltransduktion durchgeführt.

HEK293rapid-Zellen eignen sich für Untersuchungen der Insulinsignaltransduktion und sind sowohl effektiv als auch reproduzierbar zu transfizieren. In den folgenden Experimenten wurde diese Zelllinie verwendet.

Da der Einfluss von IKK ϵ auf die Insulinsignaltransduktion untersucht werden sollte, und bei dieser der Insulinrezeptor eine essentielle Rolle spielt, wurde im Folgenden die Auswirkung der Überexpression von IKK ϵ auf die Insulinsignaltransduktion untersucht. Dazu wurden HEK293rapid-Zellen mit ansteigenden Mengen des IKK ϵ -Plasmides (50 ng, 250 ng, 1000 ng und 2000 ng) sowie 100 ng des Insulinrezeptor-Plasmides transfiziert und vor der Lyse für 15 min mit 10 nM Insulin stimuliert. Zur Kontrolle wurde ein Ansatz weder transfiziert noch mit Insulin stimuliert. Von den Lysaten wurde mit dem IR-Antikörper eine Immunpräzipitation durchgeführt.

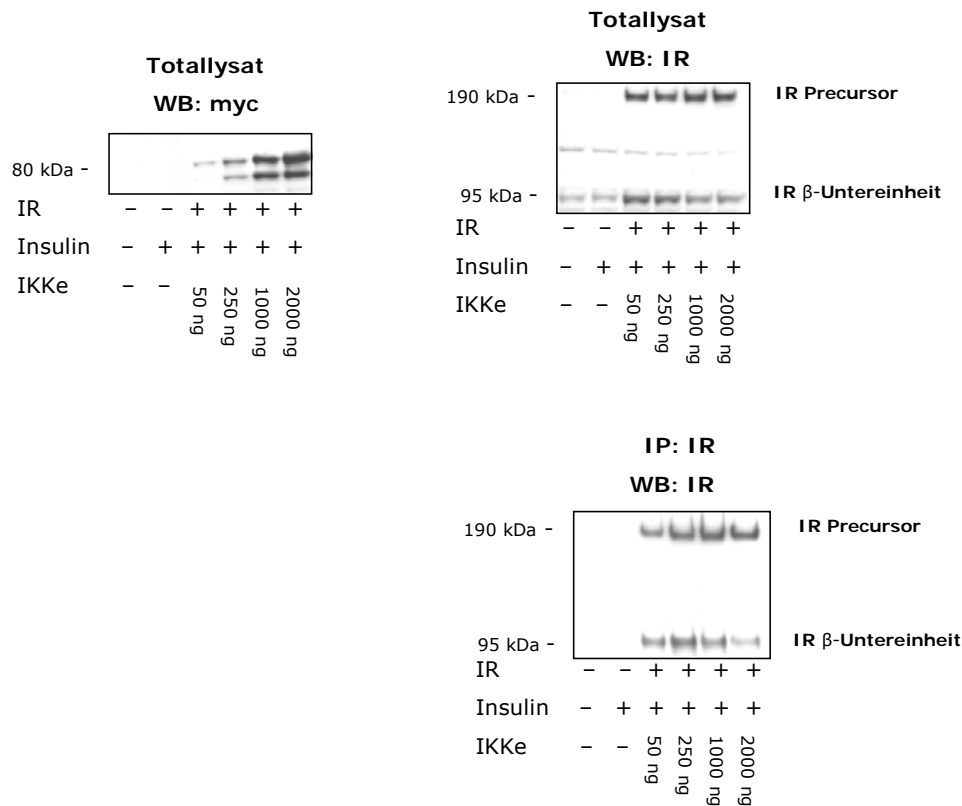


Abbildung 29: Einfluss ansteigender Mengen von transfizierten IKK ϵ auf die IR-Expression

Die Abbildungen zeigen Western Blots von HEK293rapid-Zellen, die mit ansteigenden Mengen IKK ϵ (50 ng, 250 ng, 1000 ng und 2000 ng) und dem Insulinrezeptor transfiziert wurden. Zur Kontrolle wurde ein Ansatz untransfiziert gelassen und einer nur mit dem Insulinrezeptor transfiziert. Alle transfizierten Zellen wurden vor der Lyse für 15 min mit 10 nM Insulin stimuliert. Links ist der myc-Blot der Totallysate zu sehen, er dient der Transfektionskontrolle des myc-getagten IKK ϵ . Man sieht deutlich, dass mit zunehmender Menge an transfiziertem IKK ϵ seine Expression in den Zellen zunimmt. Rechts oben befindet sich der IR-Blot der Totallysate. Zu sehen ist, dass die Expression des Insulinrezeptors (untere Bande) mit steigender IKK ϵ -Menge abnimmt. Entgegensetzt dazu steigt die Menge des Precursors an. Unten ist der Western Blot der IR-Immunpräzipitation abgebildet, sie zeigt dasselbe Ergebnis wie der IR-Blot des Totallysates.

Links abgebildet ist der Western Blot der Totallysate mit dem myc-Antikörper (Abbildung 29). Er dient der Transfektionskontrolle, da IKK ϵ einen myc-tag trägt. Deutlich lässt sich die ansteigende Menge an exprimiertem IKK ϵ abhängig von der Menge des transfizierten Plasmides erkennen. Im Insulinrezeptor-Western Blot des Totallysates (rechts oben) sieht man, dass mit steigender Menge an transfiziertem IKK ϵ die Menge des IR-Precursors zunimmt und die Menge der fertig prozessierten β -Untereinheit des Insulinrezeptors abnimmt. Dieselbe Beobachtung ist im Insulinrezeptor-Blot (rechts unten) der IR-IP zu machen.

Da bei steigender Menge an transfiziertem IKK ϵ die Prozessierung der β -Untereinheit des Insulinrezeptors beeinträchtigt ist, sollte untersucht werden, ob sich daraus Auswirkungen auf die Insulinsignaltransduktion ergeben. Die Phosphorylierung von AKT (auch PKB, Proteinkinase B) ist insulinabhängig und damit abhängig von der Funktionalität des Insulinrezeptors.

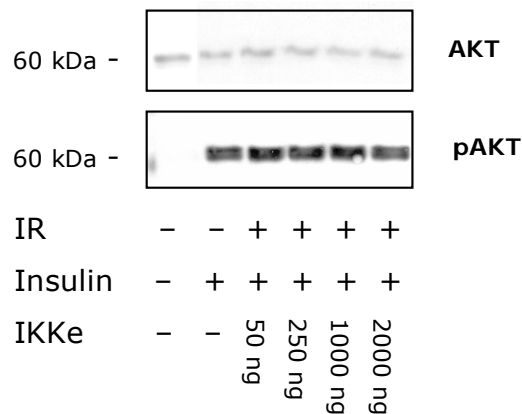


Abbildung 30: AKT Western Blot

Zu sehen sind Western Blots der HEK293rapd-Zellen, die mit ansteigenden Mengen IKK ϵ (50 ng, 250 ng, 1000 ng und 2000 ng) und dem Insulinrezeptor transfiziert wurden. Zur Kontrolle wurde ein Ansatz untransfiziert gelassen und einer nur mit dem Insulinrezeptor transfiziert. Alle transfizierten Zellen wurden vor der Lyse für 15 min mit 10 nM Insulin stimuliert. Oben ist der AKT-Blot abgebildet, die Mengen sind in allen Spuren gleich. Unten ist der phospho-AKT Blot zu sehen. Ohne Insulinstimulus findet keine Phosphorylierung statt, in allen mit Insulin stimulierten Proben sind trotz unterschiedlicher Mengen an transfiziertem IKK ϵ keine Unterschiede in der Phosphorylierung zu erkennen.

Oben ist der AKT-Blot abgebildet, die Mengen an AKT sind in allen Proben gleich (Abbildung 30). Unten ist der phospho-AKT Blot zu sehen. Trotz abnehmender Menge an exprimiertem Insulinrezeptor bei steigender Menge an transfiziertem IKK ϵ , ist die Phosphorylierung von AKT stets genauso hoch wie bei den nicht mit IKK ϵ transfizierten Zellen. Die Insulinsignaltransduktion scheint durch geringere Menge an verfügbarer β -Untereinheit des Insulinrezeptors nicht beeinflusst zu sein.

Wenngleich in den vorherigen Versuchen kein Einfluss von IKK ϵ auf die Insulinrezeptor-Aktivität festzustellen war, so scheint die Überexpression von IKK ϵ die Prozessierung des Insulinrezeptors zu beeinträchtigen.

Die Überexpression von IKK ϵ könnte zu ER-Stress führen, infolgedessen die Proteinsynthese des Insulinrezeptors gehemmt wird. Am und im ER (Endoplasmatisches Retikulum) finden Translation, Proteinfaltung, posttranslationale Modifikationen von Proteinen und der Proteintransport von Transmembranproteinen statt. Unter ER-Stress können diese Vorgänge verlangsamt oder komplett gehemmt sein (KANETO et al., 2005). Als ER-Stress-Marker bietet sich eIF2 α an (eukaryotischer Initiationsfaktor 2). eIF2 α initiiert im unphosphorylierten Zustand die Proteinsynthese. Seine Phosphorylierung korreliert mit der Inhibition der Translationsinitiierung und damit der Gesamtgeschwindigkeit der Proteinsynthese.

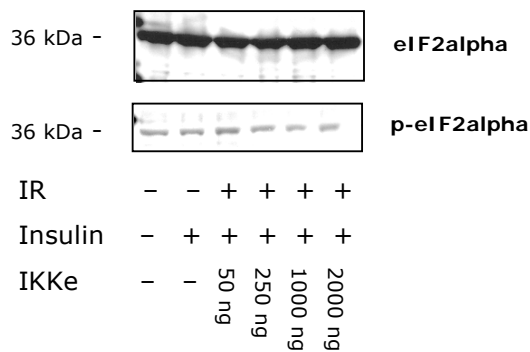


Abbildung 31: eIF2 α als ER-Stress-Marker

Zu sehen sind Western Blots der HEK293rapd-Zellen, die mit ansteigenden Mengen IKK ϵ (50 ng, 250 ng, 1000 ng und 2000 ng) und dem Insulinrezeptor transfiziert wurden. Zur Kontrolle wurde ein Ansatz untransfiziert gelassen und einer nur mit dem Insulinrezeptor transfiziert. Alle transfizierten Zellen wurden vor der Lyse für 15 min mit 10 nM Insulin stimuliert. Oben ist der eIF2 α -Blot zu sehen, der Initiationsfaktor ist in allen Proben gleichmäßig exprimiert. Der untere Blot zeigt die phosphorylierte Form von eIF2 α , in allen Spuren ist der Grad der Phosphorylierung gleich und somit kein Zusammenhang zwischen überexprimiertem IKK ϵ und der Hemmung der Proteinsynthese feststellbar.

Der obere, eIF2 α -Blot, zeigt, dass die Mengen an eIF2 α in allen Proben gleich sind (Abbildung 31). Führt die Überexpression von IKK ϵ zu ER-Stress, erwartet man bei den Proben mit mehr transfiziertem IKK ϵ eine stärkere Phosphorylierung von eIF2 α (unterer Blot, p-eIF2 α). Dies ist hier jedoch nicht der Fall, alle Proben sind gleich hoch phosphoryliert.

Die Überexpression von IKK ϵ in den HEK293rapd-Zellen hatte eine verminderte Prozessierung des Insulinrezeptor-Precursors und der β -Untereinheit des

Insulinrezeptors zur Folge. Jedoch konnte daraus resultierend weder ein negativer Einfluss auf das Insulinsignaltransduktion festgestellt noch ER-Stress als Ursache für die nicht vollständige Prozessierung des Insulinrezeptors nachgewiesen werden.

Die Überexpression von IKK ϵ nach TNF α -Stimulation in den FAO-Zellen zeigte insbesondere einen Einfluss auf die Expression von IRS1. IRS1 und IRS2 haben neben dem Insulinrezeptor eine wichtige Funktion bei der Insulinsignaltransduktion. Daher sollte der Einfluss von IKK ϵ auf die beiden Proteine untersucht werden. Dazu wurden HEK293rapid-Zellen zum einen mit der Kinase-inaktiven Form von IKK ϵ (IKK ϵ K38A) bzw. IKK ϵ sowie IRS1 bzw. IRS2 transfiziert. Vor der Lyse wurde je die Hälfte der Zellen für 15 min mit 10 nM Insulin stimuliert.

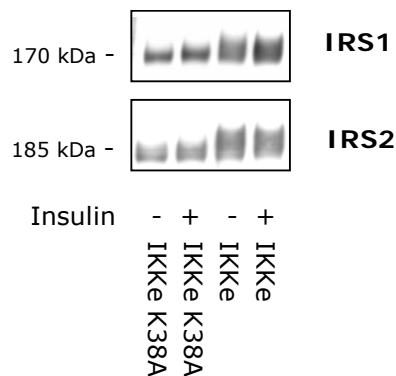


Abbildung 32: Einfluss von IKK ϵ auf IRS1 und IRS2

Abgebildet sind Western Blots von HEK293rapid Zellen, die mit IKK ϵ bzw. IKK ϵ K38A und IRS1 bzw. IRS2 transfiziert wurden und von denen vor der Lyse je die Hälfte für 15 min mit 10 nM Insulin stimuliert wurde. Oben zu sehen sind die zusätzlich mit IRS1, unten die mit IRS2 transfizierten Zellen. Deutlich zu erkennen ist eine Größenverschiebung der Proteinbande (Shift) von IRS1 und IRS2 unter Transfektion von IKK ϵ , unabhängig von der Insulinstimulation.

Oben abgebildet ist der Western Blot der zusätzlich mit IRS1, unten der mit IRS2 transfizierten Zellen (Abbildung 32). Insulinunabhängig ist jeweils bei den mit IKK ϵ transfizierten Zellen im Gegensatz zu den mit IKK ϵ K38A-transfizierten Zellen eine deutliche Größenverschiebung der Proteinbande (Shift) im SDS-Gel zu erkennen.

Des Weiteren wurde die durch die Peptidanalyse ermittelte Phosphorylierung von Ser636/639 in IRS1 und IRS2 durch IKK ϵ im Zellsystem untersucht. Dazu wurden die Lysate aus Abbildung 32 mit dem Ser636/639-phosphospezifischen Antikörper detektiert. Zusätzlich wurde jeweils eine IP mit dem IRS1- bzw. IRS2-Antikörper durchgeführt, um wiederum die Phosphorylierung an Ser636/639 zu untersuchen. Aufgrund der hohen Homologie der IRS1- und IRS2-Sequenzen erkennt der phospho-IRS1Ser636/639-Antikörper auch die entsprechende Serin-Phosphorylierungsstelle bei IRS2.

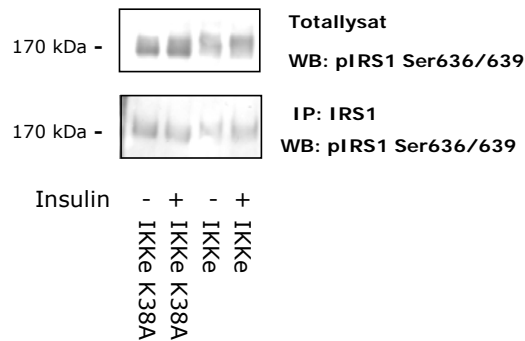


Abbildung 33: phospho-IRS1Ser636/639-Western Blots der IRS1-Lysate

Oben sind die Totallysate der mit IRS1 und IKK ϵ bzw. IKK ϵ K38A transfizierten Zellen abgebildet, unten die entsprechenden IPs. Insulinunabhängig ist die Phosphorylierung von IRS1 an Ser636/639 in den Totallysaten sowie in den IPs der mit IKK ϵ K38A transfizierten Zellen stärker.

In der oberen Abbildung sind die Totallysate der mit IRS1 und IKK ϵ bzw. IKK ϵ K38A transfizierten Zellen aufgetragen, unten die entsprechenden IPs (Abbildung 33). Die Insulinstimulation hat beide Male keinen Einfluss auf den Grad der Phosphorylierung. Die IRS1-Proteine der mit IKK ϵ transfizierten Zellen sind schwächer phosphoryliert als die der mit IKK ϵ K38A transfizierten Zellen.

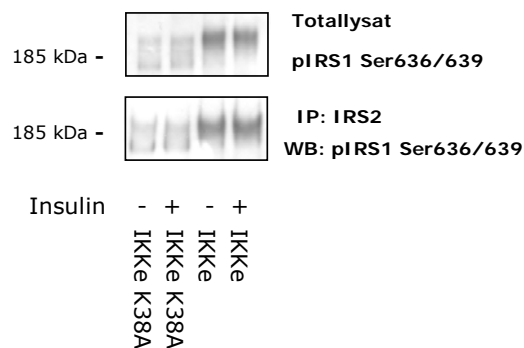


Abbildung 34: phospho-IRS1Ser636/639-Western Blots der IRS2-Lysate

Oben sind die Totallysate der mit IRS2 und IKK ϵ bzw. IKK ϵ K38A transfizierten Zellen abgebildet, unten die entsprechenden IPs. Insulinunabhängig ist die Phosphorylierung von IRS2 an Ser636/639 der mit IKK ϵ transfizierten Zellen deutlich höher als bei den mit IKK ϵ K38A transfizierten Zellen

Oben abgebildet sind die Totallysate der mit IRS2 und IKK ϵ bzw. IKK ϵ K38A transfizierten Zellen, unten die entsprechenden IPs (Abbildung 34). Auf beiden Abbildungen ist insulinunabhängig eine deutlich stärkere Phosphorylierung von IRS2 der mit IKK ϵ transfizierten Zellen zu sehen als bei den IRS2-Proteinen der mit IKK ϵ K38A transfizierten Zellen.

Bei den mit IRS1 transfizierten Zellen ist eine verminderte Phosphorylierung an Ser636/639 bei Überexpression von IKK ϵ festzustellen. Bei IRS2 hingegen ist die Phosphorylierung an Ser636/639 bei Überexpression von IKK ϵ deutlich erhöht.

In Abbildung 32 war zu sehen, dass IRS1 und IRS2, wenn sie zusammen mit IKK ϵ in HEK293rapid-Zellen überexprimiert wurden, einen signifikanten Größenshift erfahren haben. Um zu überprüfen, ob der auf den Western Blots zu sehende Shift von IRS1 bzw. IRS2 auf der in den Autoradiogrammen beobachteten Phosphorylierung durch IKK ϵ beruht (Abbildung 15 und Abbildung 18), wurden HEK293rapid Zellen mit IRS1 bzw. IRS2 und IKK ϵ bzw. IKK ϵ K38A transfiziert. Die Transfektionen mit IKK ϵ K38A dienten als Negativkontrolle. Nach der Lyse wurde mit den entsprechenden IRS-Antikörpern eine Immunpräzipitation (IP) durchgeführt. Anschließend wurde eine Hälfte der IRS1/2 + IKK ϵ -IP mit Alkalischer Phosphatase (CIAP) dephosphoryliert. Beruht der Größenshift der Banden auf Phosphorylierung, so sollte nach der CIAP-Behandlung die Höhe der Banden etwa auf dem Niveau der mit IKK ϵ K38A transfizierten Zellen liegen.

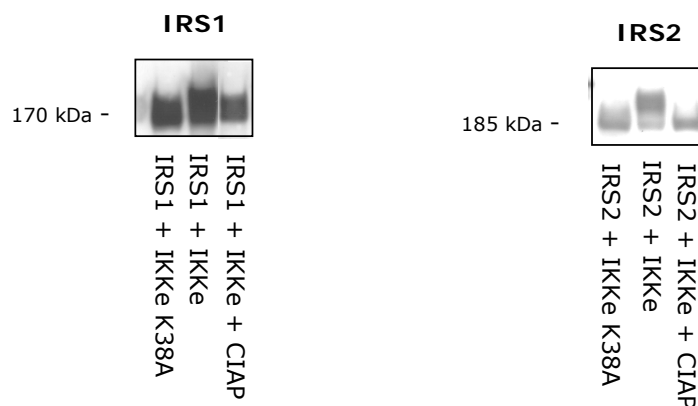


Abbildung 35: CIAP-Behandlung von IRS1 bzw. IRS2

HEK293rapid Zellen wurden mit IRS1 bzw. IRS2 und IKK ϵ bzw. IKK ϵ K38A transfiziert, lysiert und anschließend wurde mit den entsprechenden IRS-Antikörpern eine Immunpräzipitation (IP) durchgeführt. Die beiden IRS1/2 + IKK ϵ -IPs wurden mit Alkalischer Phosphatase (CIAP) dephosphoryliert. Es ist zu sehen, dass nach der CIAP-Behandlung die Phosphorylierung von IRS1 und IRS2 in etwa auf das Niveau der Phosphorylierung von IRS1 und IRS2 der mit IKK ϵ K38A transfizierten Zellen zurückgegangen ist.

Links sind die Western Blots der IPs der mit IRS1 transfizierten Zellen zu sehen, rechts die der mit IRS2 transfizierten Zellen (

Abbildung 35). In den mit IKK ϵ K38A transfizierten Zellen kann es aufgrund der fehlenden Kinaseaktivität des mutierten IKK ϵ nicht zur IKK ϵ -vermittelten Phosphorylierung von IRS1 bzw. IRS2 kommen. Dieser Ansatz (linke Spur; IRS1 bzw. IRS2 + IKK ϵ K38A) repräsentiert daher den Basalwert. In der mittleren Spur (IRS1 bzw. IRS2 + IKK ϵ) wurde jeweils die IP der mit intaktem IKK ϵ transfizierten Zellen aufgetragen. Im Vergleich zur IKK ϵ K38A-IP ist ein deutlicher Shift der Banden zu erkennen. Nach der CIAP-Behandlung (rechte Spur; IRS1 bzw. IRS2 + IKK ϵ + CIAP) läuft die Bande wieder auf der Höhe des nicht durch IKK ϵ phosphoryliertem IRS1 bzw. IRS2.

Der Größenshift der IRS1- und IRS2- Banden nach gleichzeitiger Transfektion mit IKK ϵ scheint auf der IKK ϵ -vermittelten Phosphorylierung zu beruhen.

Da in den vorangegangenen Experimenten deutliche Unterschiede in der Laufhöhe von IRS1 und IRS2 bei Überexpression von IKK ϵ und IRS1 bzw. IRS2 zu beobachten waren, sollten im Folgenden weitere an der Insulinsignaltransduktion beteiligte Proteine untersucht werden, die in der Insulin-vermittelten Signalkaskade unterhalb von IRS1 und IRS2 liegen. Ziel war es herauszufinden, ob aufgrund des Shifts von IRS1 und IRS2 bei Überexpression von IKK ϵ das Insulinsignaltransduktion beeinträchtigt wird.

Dazu wurden HEK293rapid-Zellen mit IKK ϵ bzw. IKK ϵ K38A und zur Kontrolle mit LacZ transfiziert. Ein Ansatz wurde untransfiziert gelassen. Vor der Lyse wurde je die Hälfte der Zellen jeweils für 15 min mit 10 nM Insulin stimuliert. Vom Totallysat wurde eine Immunpräzipitation mit dem IRS1- sowie mit dem IRS2-Antikörper durchgeführt.

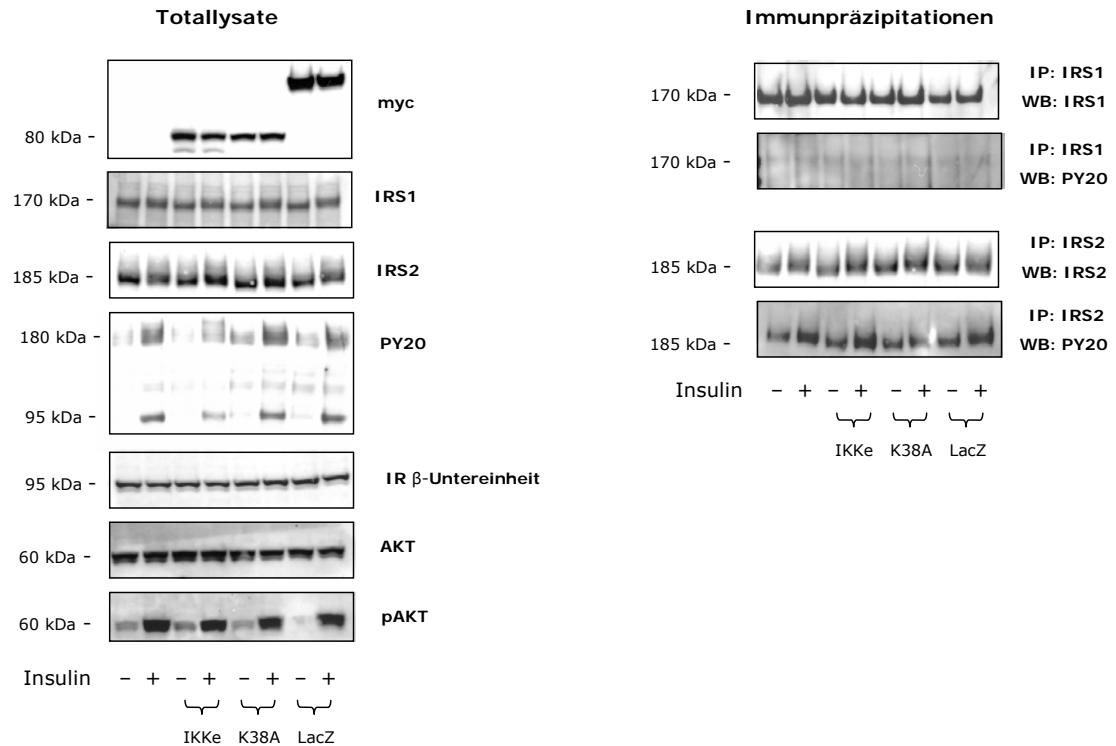


Abbildung 36: IKKε in HEK293rapid-Zellen

Links abgebildet sind die Western Blots der Totallysate und rechts die der IPs. Linke Abbildung: Der myc-Blot dient der Transfektionskontrolle, alle drei transfizierten Konstrukte werden gleichmäßig exprimiert. Die IRS1- und IRS2-Blots zeigen die endogenen Level der Proteine, nach Insulinstimulation ist ein geringer Shift zu erkennen. Im PY20 Blot erkennt man nach Insulinstimulus eine schwächere Phosphorylierung der Proteine (IRS, IR) bei den mit IKKε transfizierten Zellen. Die β-Untereinheit des Insulinrezeptors wird in allen Transfektionsansätzen gleichmäßig exprimiert. Die Menge an AKT ist in allen Spuren gleich und die unter Insulinstimulus zu beobachtende Phosphorylierung von AKT ist unabhängig von der Transfektion der Zellen, d. h., dass IKKε bezüglich des pAKT-Readouts keinen Einfluss zeigt. Rechts sind die Western Blots der Immunpräzipitationen mit IRS1 bzw. IRS2 und deren PY20 Blots abgebildet. Der IRS1- und IRS2-Blot korrelieren mit den entsprechenden Blots der Totallysate. Der PY20 Blot der IRS1-IP lässt aufgrund eines schwachen Signals keine insulinabhängige Phosphorylierung erkennen. Die IRS2 Proteine hingegen sind nach Insulinstimulation etwas stärker phosphoryliert als die Unstimulierten.

Die Western Blots auf der linken Seite wurden mit den Totallysaten der Zellen gemacht, die auf der rechten Seite mit den Immunpräzipitationen (

Abbildung 36). Linke Abbildung: Der myc-Blot dient der Transfektionskontrolle, IKKε, IKKε K38A und LacZ werden insulinunabhängig gleichmäßig exprimiert. Der IRS1- sowie der IRS2-Blot zeigen die endogenen Level der IRS-Proteine. Auch sie zeigen

unabhängig von den Transfektionen eine einheitliche Expression. Lediglich unter Insulinstimulierung ist jeweils ein kleiner Shift zu erkennen. Der IR-Blot zeigt eine gleichmäßige Expression der β -Untereinheit des Insulinrezeptors in allen Transfektionsansätzen. Auf dem PY20-Blot sind die Proteine der Zellen, die mit Insulin stimuliert wurden, an Tyrosin-Resten stärker phosphoryliert. Bei den mit IKK ϵ transfizierten Zellen ist eine deutlich geringere Phosphorylierung zu erkennen. Der AKT-Blot zeigt, dass die Menge an AKT in allen Ansätzen identisch ist. Der Grad der Phosphorylierung von AKT in den Insulin-stimulierten Zellen wird nicht durch die unterschiedlichen Transfektionen beeinflusst. Rechts abgebildet sind die Western Blots der IRS1- bzw. IRS2-Immunpräzipitation. Die Proteine werden gleichmäßig exprimiert, unter Insulinstimulus ist jeweils ein leichter Größenshift zu erkennen. Der PY20-Blot der IRS1-Immunpräzipitation zeigt nur schwache Signale, eine insulininduzierte Phosphorylierung ist hier nicht zu erkennen. Die IRS2-Proteine sind nach Insulinstimulus etwas stärker phosphoryliert als bei den unstimulierten Ansätzen. Die Intensität der Phosphorylierung ist unabhängig vom transfizierten Konstrukt.

Die vorangehenden Experimente zeigen einen Effekt von IKK ϵ auf die Phosphorylierung von IRS1 und IRS2, jedoch wird die Insulin-abhängige Signaltransduktion nicht beeinträchtigt. Deswegen soll im Weiteren untersucht werden, ob die IKK ϵ -vermittelte Phosphorylierung der Insulinrezeptorsubstrate Auswirkungen auf die Interaktion mit dem im Signalweg unterhalb liegenden Element, PI3K, hat. Die PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase) setzt sich aus der regulatorischen p85- und der katalytischen p110-Untereinheit zusammen. Die p85-Untereinheit enthält zwei SH2-Domänen (scr homology 2), die für die Interaktion mit Tyrosin-phosphorylierten Enzymen, in diesem Fall IRS1 und IRS2, notwendig sind (BALTENSBERGER et al, 1994). IRS1 und IRS2 werden im Zuge der Insulinantwort an mehreren Tyrosinresten phosphoryliert, die als Bindestellen für die SH2-Domäne der p85-Untereinheit der PI3K dienen. Diese Bindung führt zur Aktivierung von PI3K, die essentiell ist für Insulin-vermittelte metabolische Effekte wie die erhöhte Glucose-Aufnahme und die Glycogen-Synthese (SHEPHERD, P.R. et al, 1998; AVRUCH, J, 1998). Aktiviertes PI3K führt zur Aktivierung von AKT und damit zur Translokation des Glukosetransporters (GLUT4) an die Zelloberfläche und damit zur Glucoseaufnahme der Zelle (JIANG et al., 2002). Hier sollte untersucht werden, ob die Interaktion zwischen IRS1 bzw. IRS2 und der p85-Untereinheit von PI3K durch die Überexpression von IKK ϵ in HEK293rapid-

Zellen gestört ist. Dazu wurden HEK293rapid-Zellen mit IRS1 und IKK ϵ bzw. IKK ϵ K38A transfiziert. Eine weitere Transfektion wurde mit IRS2 durchgeführt. Vor der Lyse wurde je ein Teil der Zellen für 15 min mit 10 nM Insulin stimuliert. Anschließend wurde eine Immunpräzipitation mit dem IRS1- bzw. IRS2-Antikörper sowie eine IP mit dem p85-Antikörper durchgeführt.

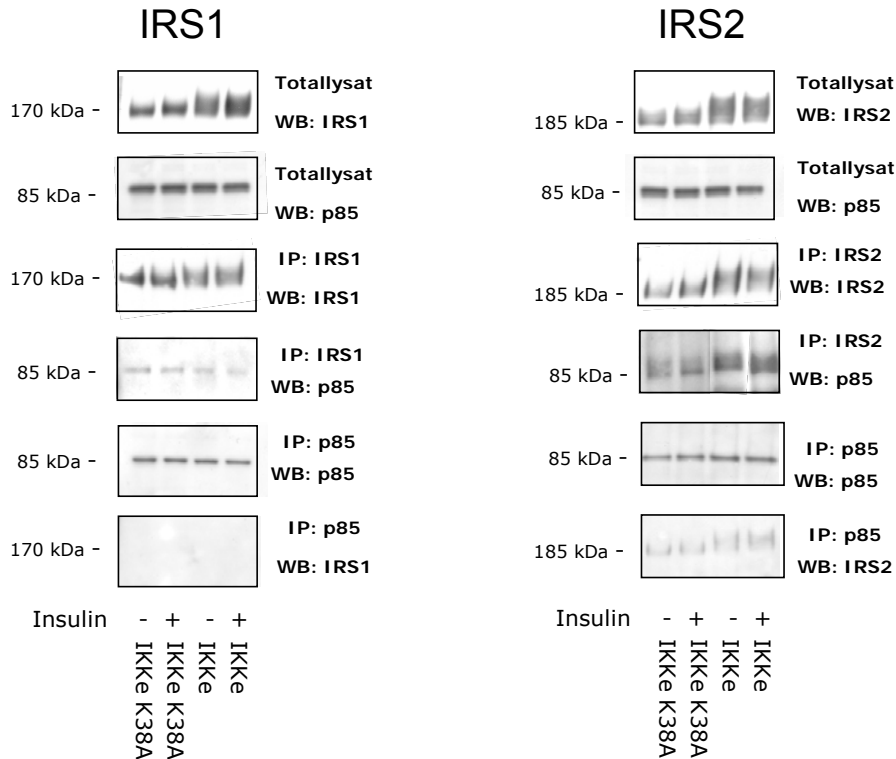


Abbildung 37: Co-Immunpräzipitation p85 und IRS1 bzw. IRS2

HEK293rapid-Zellen wurden mit IRS1 bzw. IRS2 und IKK ϵ bzw. IKK ϵ K38A transfiziert. Je ein Teil der Zellen wurde vor der Lyse für 15 min mit 10 nM Insulin stimuliert. Mit den mit IRS1 bzw. IRS2 transfizierten Zellen wurde eine IP mit dem IRS1- bzw. IRS2 Antikörper durchgeführt sowie je eine IP mit dem p85-Antikörper. Von den IPs wurden jeweils mit IRS1 bzw. IRS2 und p85 Western Blots gemacht. Bei keinem der Western Blots sind Unterschiede nach bzw. ohne Insulinstimulus zu erkennen. Links zu sehen sind die mit IRS1 transfizierten Zellen, rechts die mit IRS2 Transfizierten. Die Western Blots der Totallysate zeigen beim IRS1- und IRS2-Blot den typischen Shift bei den zusätzlich mit IKK ϵ transfizierten Zellen, p85 wird in allen Proben gleichmäßig exprimiert. Die mit IRS1 bzw. IRS2 geblohteten IRS1- und IRS2-IPs zeigen wie in den Totallysaten den Shift bei gleichzeitiger Transfektion der Zellen mit IKK ϵ . Beim p85-Blot der IRS1-IP sind in allen Spuren in etwa gleich hohe Proteinmengen zu sehen. Im p85-Blot der IRS2-IP hingegen sind die Banden bei den mit IKK ϵ transfizierten Zellen deutlich stärker als bei den mit IKK ϵ K38 transfizierten Zellen. Die p85-Blots der p85-IPs zeigen in allen Spuren gleich viel Protein. Im IRS1-Western Blot der p85 IP konnte kein Protein nachgewiesen werden. Beim IRS2-Blot der entsprechenden p85-IP ist sind deutliche, aber recht schwache Banden (mit Shift bei den mit IKK ϵ transfizierten Zellen) zu erkennen.

Auf keinem der Western Blots ist ein Einfluss der Insulinstimulation auf die untersuchten Proteine zu sehen (Abbildung 37). Bei gleichzeitiger Transfektion von

IKK ϵ und IRS1 bzw. IRS2 ist sowohl bei den Totallysaten als auch bei den entsprechenden Immunpräzipitationen ein deutlicher Shift der IRS-Proteine zu sehen. p85 wird in allen Transfektionsansätzen gleichmäßig exprimiert, die p85-Proteinmengen sind auch in der entsprechenden Immunpräzipitation identisch. Bei der Immunpräzipitation mit dem IRS1-Antikörper kann jeweils eine geringe, aber gleichmäßige Menge von p85 nachgewiesen werden. Bei der Immunpräzipitation mit dem IRS2-Antikörper hingegen wird bei den mit IKK ϵ transfizierten Ansätzen eine deutlich größere Menge an p85 detektiert. Bei den Immunpräzipitationen, die mit p85 durchgeführt wurden, kann im Fall der mit IRS1 transfizierten Ansätze kein IRS1 nachgewiesen werden. IRS2 wird schwach aber deutlich detektiert.

3.2 Einfluss von IKK ϵ auf die Entstehung der Insulinresistenz *in vivo*

Um die Bedeutung von IKK ϵ *in vivo* zu untersuchen, wurde zum einen die Expression von IKK ϵ in verschiedenen murinen Geweben aus C57/Bl6-Mäusen, die eine normalkalorische bzw. eine Insulinresistenz-induzierende, hochkalorische Diät erhalten haben, mittels quantitativer PCR bestimmt. Des Weiteren wurden diese Fütterungsstudien mit IKK ϵ -Knockout-Mäusen wiederholt, um deren Insulinsensitivität im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen zu analysieren.

3.2.1 IKK ϵ -Expression in Wildtyp- und insulinresistenten C57BL/6-Mäusen

Zur Untersuchung der IKK ϵ -Expression in verschiedenen murinen Geweben wurden Tiere aus der sog. DIM22-Studie (diet induced mouse study No. 22, LILLY) verwendet. Dabei handelt es sich um C57BL/6-Mäuse, die nach Absetzen vom Muttertier in 3 Gruppen aufgeteilt wurden und unterschiedliche Diäten bekommen haben.

Fütterungsschema der 3 Gruppen der DIM22-Mäuse

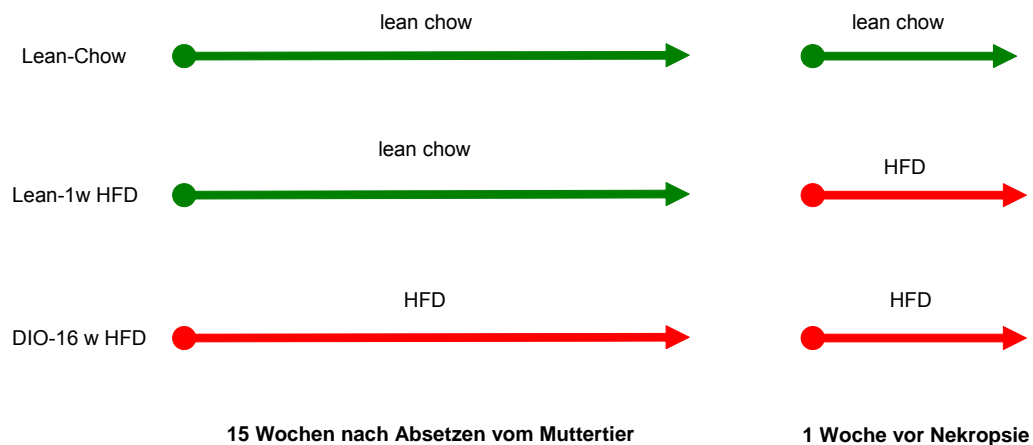


Abbildung 38: Übersicht der Fütterung der DIM22-Mäuse

Die Abbildung zeigt das Fütterungsschema der drei Maus-Gruppen der DIM22-Studie. Die Tiere der ersten Gruppe, „Lean-Chow“, haben für 16 Wochen normales Futter bekommen, die „Lean-HFD“-Mäuse während der letzten Woche eine hochkalorische Diät und die „DIO“- (diet induced obesity) Tiere erhielten über den gesamten Zeitraum das HFD (high fat diet)-Futter

Die Tiere der ersten Gruppe, „Lean-Chow“, erhielten für 16 Wochen normales Futter (Abbildung 38). Im Unterschied dazu wurden die „Lean-HFD“-Mäuse in der letzten Woche mit einer hochkalorischen Diät gefüttert, um mögliche Kurzzeiteffekte der HFD zu untersuchen. Die „DIO“- (diet induced obesity) Gruppe hat über den gesamten Zeitraum das HFD (high fat diet)-Futter bekommen.

Für die Expressions-Analyse mittels TaqMan wurde aus der Leber, dem epididymialen weißen Fettgewebe (epiWAT), dem Muskel und der Niere der drei Maus-Gruppen RNA gewonnen. Die RNA wurde in cDNA transkribiert und mittels TaqMan quantifiziert.

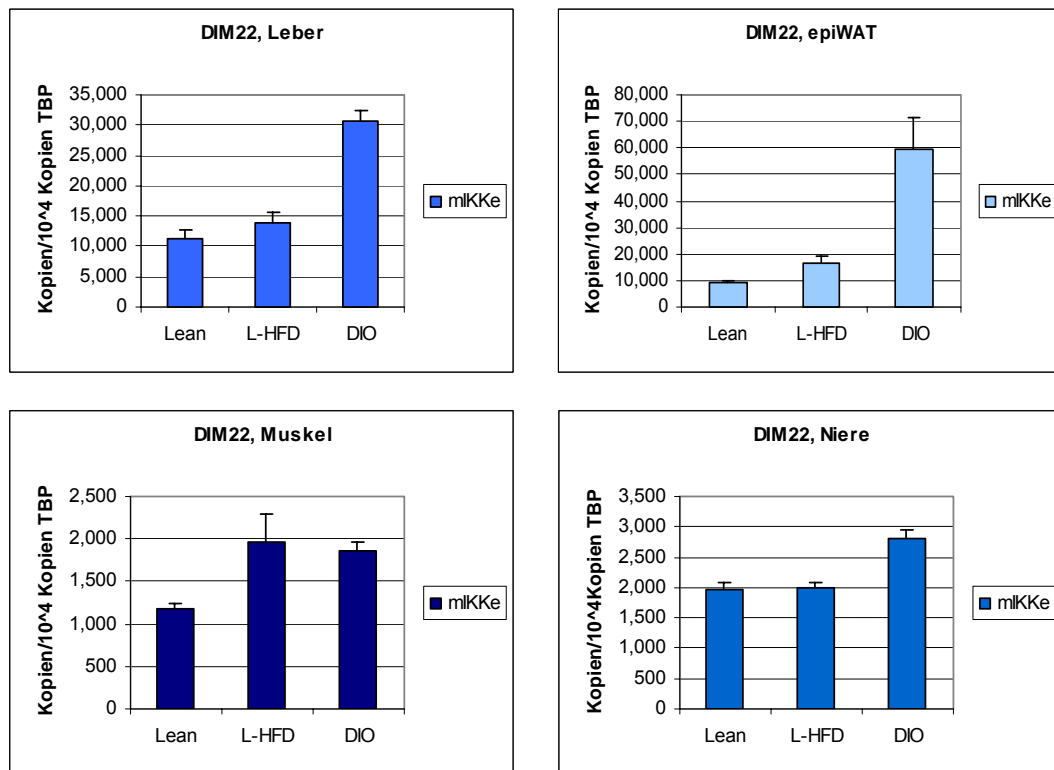


Abbildung 39: IKKε-Expression in murinem Gewebe

Die Abbildungen zeigen die IKKε-Expressionen in verschiedenen Geweben (Leber, epididymiales weißes Fettgewebe, Muskel und Niere) in Abhängigkeit unterschiedlicher Diäten der Mäuse (Lean, Lean-High Fat Diet und Diet Induced Obesity). Im Muskel steigt die Expression leicht an, in den anderen Geweben ist sie unter anhaltender HFD stark erhöht.

Abbildung 39 zeigt die Quantifizierung der RNAs in den vier Geweben (Leber, epiWAT, Muskel und Niere) der Mäuse aus der DIM22-Studie. Die im TaqMan Assay gemessenen Daten zeigen allgemein die höchste Expression von IKKε im weißen Fettgewebe (epiWAT), gefolgt von der Leber. In Niere und Muskel ist sie

vergleichsweise gering. Im Fettgewebe, der Leber und der Niere ist ein deutlicher Anstieg der IKK ϵ -Expression unter 16-wöchiger hochkalorischer Diät (DIO, diet induced obesity) zu beobachten. Im Muskel erhöht sich die Expression nur geringfügig. Der Anstieg unter HFD beträgt in der Niere etwa $\frac{1}{4}$, in der Leber etwa das 3-fache und im epiWAT - dessen basale Werte mit denen der Leber vergleichbar sind - sogar um das 4- bis 5-fache. Die IKK ϵ -Expression wird in allen Geweben – unterschiedlich stark - unter HFD induziert.

3.2.2 *in vivo*-Expressionsunterschiede in Wildtyp- und IKK ϵ -Knockout-Mäusen

Um die Bedeutung von IKK ϵ *in vivo* zu untersuchen, wurden IKK ϵ -Knockout-Mäuse im C57BL/6-Background generiert. Die Tiere waren phänotypisch unauffällig. Um die Auswirkungen des IKK ϵ -Knockouts im Zusammenhang mit Insulinsignaltransduktion, Insulinresistenz und Diabetes Typ 2 zu untersuchen, wurden Wildtyp- und die IKK ϵ -Knockout-Tiere in je 2 Gruppen unterteilt und mit unterschiedlichem Futter gefüttert. Eine Gruppe bekam eine hochkalorische Diät (HFD, high fat diet), die bei C57BL/6-Mäusen eine Insulinresistenz verursacht. Die andere Gruppe erhielt eine Kontrolldiät. Die Tiere bekamen die jeweilige Diät für 19 Wochen nach Absetzen vom Muttertier. Die Hälfte der Tiere aller vier Gruppen wurde über Nacht vor der Tötung gehungert und eine Stunde vorher mit 400 μ g/kg LPS stimuliert, der Rest der Tiere hat zur Kontrolle physiologische Kochsalzlösung (Saline) bekommen.

Gruppe 1	wt	lean	saline
Gruppe 2	wt	lean	LPS
Gruppe 3	wt	HFD	saline
Gruppe 4	wt	HFD	LPS
Gruppe 5	KO	lean	saline
Gruppe 6	KO	lean	LPS
Gruppe 7	KO	HFD	saline
Gruppe 8	KO	HFD	LPS

Abbildung 40: Übersicht der verschiedenen Maus-Gruppen

Die in dieser Studie verwendeten Mäuse teilen sich in folgende Gruppen auf: Die Wildtyp- (wt) und IKK ϵ Knockout (KO)-Tiere wurden jeweils in zwei Gruppen aufgeteilt, die eine Gruppe bekam lean-Futter, die andere HFD-Futter. Diese Gruppen wurden weiter in Untergruppen aufgeteilt, die eine Hälfte wurde mit LPS stimuliert, die andere nicht.

Die obige Abbildung zeigt die Aufteilung der verschiedenen Mäuse in die 8 Gruppen. Wenn nicht anders vermerkt, ist in diesem Kapitel immer diese Gruppeneinteilung gemeint.

3.2.3 Genotypisierung der IKK ϵ -Knockout Mäuse

Die Wildtyp- und die IKK ϵ -Knockout-Mäuse wurden genotypisiert, um den vollständigen Knockout des IKK ϵ -Gens nachzuweisen.

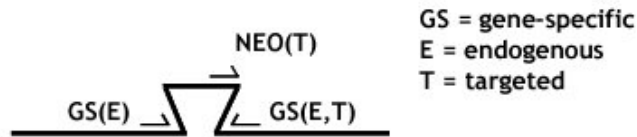


Abbildung 41: Genotypisierungsprimer des IKK ϵ -Knockouts

Beim Knockout kommt es zur Disruption des IKK ϵ -Gens durch Insertion einer NEO-Kassette. Sie zerstört ebenfalls den vor dem Knockout liegenden Bereich. Die Primer zur Genotypisierung der IKK ϵ -Knockout Mäuse sind so ausgewählt, dass im Falle eines Knockouts nicht mehr der den endogenen Abschnitt des Gens erkennende forward-Primer binden kann (GS(E)), sondern nur noch der NEO(T) Primer, der die NEO-Kassette erkennt. Dieser amplifiziert mit dem reverse-Primer (GS(E,T)) ein Produkt, das im Vergleich zum PCR-Produkt einer im Wildtyp durchgeführten PCR deutlich größer ist (siehe Abbildung 42).

Der Knockout wurde durch Insertion einer NEO-Kassette in das IKK ϵ -Gen durchgeführt. Liegt das Gen im Wildtyp vor, binden die beiden genspezifischen (GS) Primer an der DNA (Abbildung 41). Durch das Einbringen der NEO-Kassette wird zum einen das Zielgen zerstört und zusätzlich die Bindungsstelle für den genspezifischen, endogenen forward-Primer GS(E) deletiert. In diesem Fall bindet der Primer, der die eingefügte Kassette erkennt NEO(T).

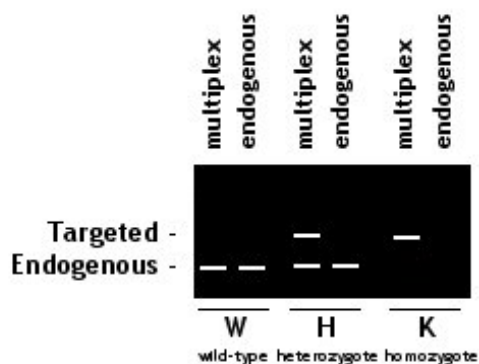


Abbildung 42: Erwartete Fragmente bei der Genotypisierung des IKK ϵ -Knockouts

In der „multiplex“-PCR werden alle 3 Primer eingesetzt, in der „endogenous“-PCR lediglich die genspezifischen Primer GS(E) und GS(E,T)). Im Wildtyp (W) kann nur das kleinere Fragment entstehen, da der NEO(T)-Primer nicht binden kann. Im heterozygoten Knockout (H) entstehen bei der „multiplex“-PCR beide Fragmente, da sowohl ein Wildtyp- wie auch ein Knockout-Allel vorhanden sind. Die endogenen Primer amplifizieren hier wiederum nur das kleinere Wildtypprodukt. Im homozygoten Knockout (K) kann nur das größere, durch Insertion der NEO-Kassette entstandene, Fragment amplifiziert werden.

Abbildung 42 zeigt die erwarteten Fragmente bei der Genotypisierung der IKK ϵ -Knockoutmäuse. Im Wildtyp (W) entsteht das intakte IKK ϵ -Genprodukt (Endogenous), das durch die Primer GS(E) und GS(E,T) amplifiziert wird. Durch Insertion der NEO-Kassette im Knockout entsteht ein größeres Fragment (Targeted). Ist der Knockout heterozygot, entstehen das „Targeted“ und das „Endogenous“-Produkt, liegt er jedoch homozygot vor, entsteht lediglich das größere „Targeted“-Produkt.

In den mit „multiplex“ beschrifteten Spuren wird die PCR mit allen drei Primern durchgeführt, so dass im Falle eines heterozygoten Knockouts zwei Fragmente entstehen, im Wildtyp lediglich das Produkt (Endogenous) der genspezifischen, endogenen Primer (GS(E) und GS(E,T)) und im homozygoten Knockout nur das durch die Insertion der NEO-Kassette größere Fragment (Targeted).

Wird die PCR lediglich mit den endogenen Primern durchgeführt (GS(E) und GS(E,T)), kann nur das dem Wildtyp entsprechende Fragment entstehen, da die NEO-Kassette nicht vorhanden ist. Ist der Knockout homozygot, kann der endogene forward-Primer (GS(E)) nicht binden und es entsteht gar kein Produkt.

Aus den Schwanzspitzen von 12 Mäusen wurde zur Genotypisierung genomische DNA gewonnen. Je 6 der Tiere gehörten der wt- bzw. Knockout-Gruppe an, wovon wiederum jeweils 3 Tiere unter normaler Diät (lean) und 3 unter high fat diet (HFD) gehalten wurden.

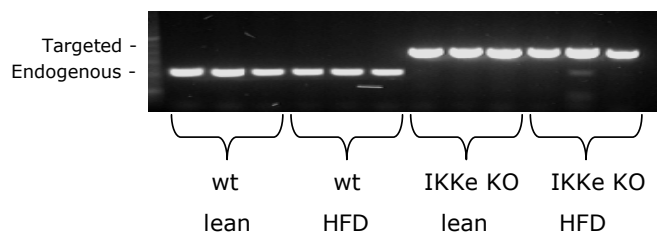


Abbildung 43: Genotypisierung der wt- und IKK ϵ -Knockout-Mäuse auf DNA-Ebene

Zur Genotypisierung wurde aus den Schwanzspitzen der Mäuse gDNA gewonnen, die mittels PCR analysiert wurde. Alle 3 Primer (GS(E), GS(E,T) und NEO(T)) wurden für die PCR eingesetzt. Bei den Wildtyptieren wurde unabhängig von der Diät (lean bzw. HFD) nur das Wildtyp-spezifische Fragment (Endogenous) amplifiziert. In den Knockouttieren konnte ebenfalls diätunabhängig nur das größere, knockout-spezifische Produkt (Targeted) nachgewiesen werden.

Anhand des Größenunterschiedes der PCR-Produkte lässt sich erkennen, in welchen Tieren die NEO-Kassette vorhanden ist und damit ein Knockout vorliegt (Abbildung

43). Bei allen untersuchten Knockouttieren ist nur die größere Bande zu erkennen. Demnach liegt der Knockout homozygot vor. Bei den Wildtyptieren wurde ausschließlich das Wildtyp-spezifische, kleinere Fragment amplifiziert.

Nachdem der Knockout des $IKK\epsilon$ -Gens auf DNA-Ebene erfolgreich nachgewiesen werden konnte, sollte er ebenfalls auf RNA-Ebene gezeigt werden. So soll ausgeschlossen werden, dass trotz der Insertion der NEO-Kassette in das $IKK\epsilon$ -Gen ein Genprodukt gebildet wird. Dazu wurde aus den Lebern und dem epiWAT der Wildtyp- (WT) und Knockout- ($IKK\epsilon$ KO) Mäuse RNA isoliert und für die Expressionsanalyse mittels TaqMan in cDNA transkribiert.

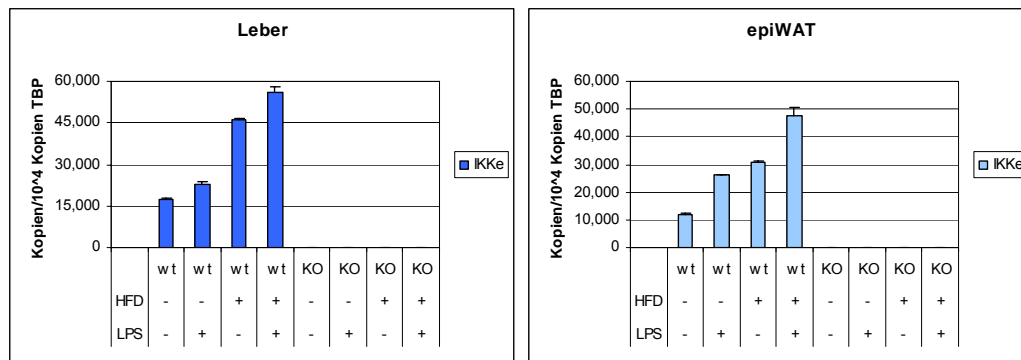


Abbildung 44: Genotypisierung der wt- und $IKK\epsilon$ -Knockout-Mäuse auf RNA-Ebene

Aus den Lebern und dem epiWAT der Wildtyp- (wt) und der $IKK\epsilon$ -Knockout- (KO) Mäuse wurde RNA isoliert und für die Expressionsanalyse mittels TaqMan in cDNA transkribiert. In beiden Geweben konnte unabhängig von Diät (lean bzw. HFD) und LPS-Stimulation lediglich in den Wildtyp-Tieren $IKK\epsilon$ gemessen werden.

Die Ergebnisse der TaqMan-Analyse zeigen bei den wt-Tieren ist die Expression des $IKK\epsilon$ -Gens (Abbildung 44). In den Knockout-Tieren hingegen – unabhängig von Diät und LPS-Behandlung - wird keine $IKK\epsilon$ -RNA exprimiert. (Auf die unterschiedliche Stärke der Expression von $IKK\epsilon$ im Wildtyp wird an anderer Stelle eingegangen.)

Als letzter Schritt sollte der Knockout des $IKK\epsilon$ -Gens auf Proteinebene nachgewiesen werden, um zu zeigen, dass kein Genprodukt mehr gebildet wird. Aus den Lebern der Wildtyp- (WT) und Knockout- ($IKK\epsilon$ KO) Mäuse wurden Proteine gewonnen, um mittels eines Western Blots und dem $IKK\epsilon$ -spezifischen Antikörper den Knockout des $IKK\epsilon$ -Gens zu bestätigen.

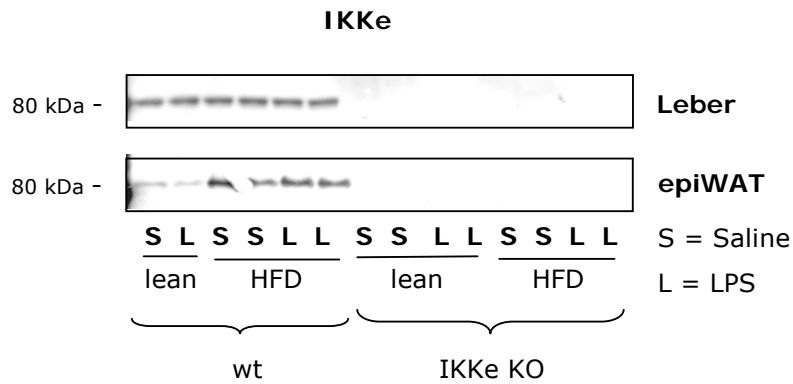


Abbildung 45: Genotypisierung der wt- und IKK ϵ -Knockout-Mäuse auf Protein-Ebene

Aus den Lebern der Wildtyp- (wt) und Knockout- (IKK ϵ KO) Mäuse wurden Proteine gewonnen, um mittels Western Blots den Knockout von IKK ϵ nachzuweisen. Unabhängig von Diät (lean bzw. HFD) und LPS-Stimulation wurde lediglich in den Wildtyptieren IKK ϵ detektiert. Im epiWAT der wt-Tiere ist IKK ϵ in den Tieren, die die Kontrolldiät erhalten haben, schwächer exprimiert.

Bei den Western Blots der Leber- und der epiWAT-Lysate wird bei den wt-Tieren das IKK ϵ -Protein vom IKK ϵ -spezifischen Antikörper erkannt (Abbildung 45). In den Knockout-Tieren hingegen ist kein IKK ϵ nachweisbar. Die wt-Tiere, die die Kontrolldiät bekommen haben, exprimieren im epiWAT IKK ϵ weniger stark als die Tiere, die mit der hochkalorischen Diät gefüttert wurden.

3.2.4 Untersuchungen der IKK ϵ -Knockout-Mäuse auf Proteinebene

Die IKK ϵ -Knockout-Mäuse sollen auf Proteinebene hinsichtlich möglicher Unterschiede in der Insulinsignaltransduktion im Vergleich zu den Wildtyptieren untersucht werden. Von den Leber- und epiWAT-Lysaten der IKK ϵ KO- sowie der wt-Tiere wurde zur weiteren Untersuchung die Expression verschiedener an der Insulinsignaltransduktion beteiligter Proteine untersucht. So sollten mögliche Auswirkungen des IKK ϵ -Knockouts und der unterschiedlichen Diäten der Tiere auf die entsprechenden Proteine festgestellt werden.

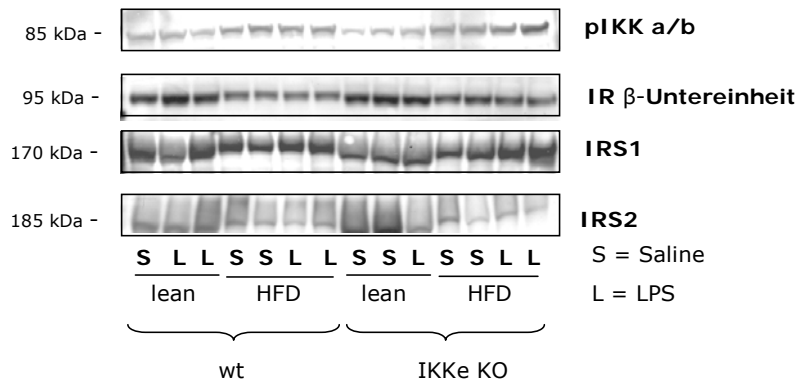


Abbildung 46: Analyse der Leberlysate von wt- und IKKε-Knockout-Mäusen auf Proteinebene

Aus den Lebern der Wildtyp- (wt) und Knockout- (IKKε KO) Mäuse wurden Proteine gewonnen, um sie mittels Western Blots zu analysieren und ihre Expression zu untersuchen. Unabhängig von Knockout und LPS-Stimulation wurde in den HFD-Tieren mehr pIKKa/b detektiert. Der Insulinrezeptor ist in den lean-Tieren unabhängig von Knockout und LPS-Stimulation stärker exprimiert. Bei IRS1 und IRS2 ist unabhängig von LPS-Stimulation und Knockout ein Shift der HFD-Banden zu sehen. IRS2 wird in den lean KO Tieren ohne LPS-Stimulation erhöht exprimiert.

Abgebildet sind die verschiedenen Western Blots der Leberlysate (

Abbildung 46). Es sind lediglich beim IRS2-Blot Unterschiede zwischen Wildtyp- und Knockout-Tieren sowie LPS und Saline zu sehen. IRS2 wird in den Knockout-Tieren, die die Kontrolldiät erhalten haben und nicht mit LPS stimuliert wurden, erhöht exprimiert.

Der IKKa/b-Blot zeigt eine erhöhte Phosphorylierung des Proteins unter HFD. Die Menge an Insulinrezeptor ist jeweils unter HFD niedriger als bei den Tieren, die die Kontrolldiät erhalten haben. Bei IRS1 und IRS2 ist jeweils unter HFD ein Shift der Banden zu erkennen.

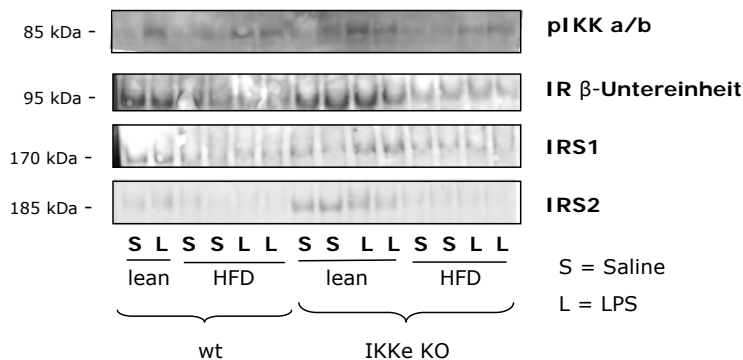


Abbildung 47: Analyse der epiWAT-Lysate von wt- und IKKε-Knockout-Mäusen auf Proteinebene

Aus dem epiWAT der Wildtyp- (wt) und Knockout- (IKKε KO) Mäuse wurden Proteine gewonnen, um sie mittels Western Blots zu analysieren. Unabhängig von Knockout und LPS-Stimulation wurde in den HFD-Tieren mehr pIKKa/b detektiert. Der Insulinrezeptor ist in den lean-Tieren unabhängig von

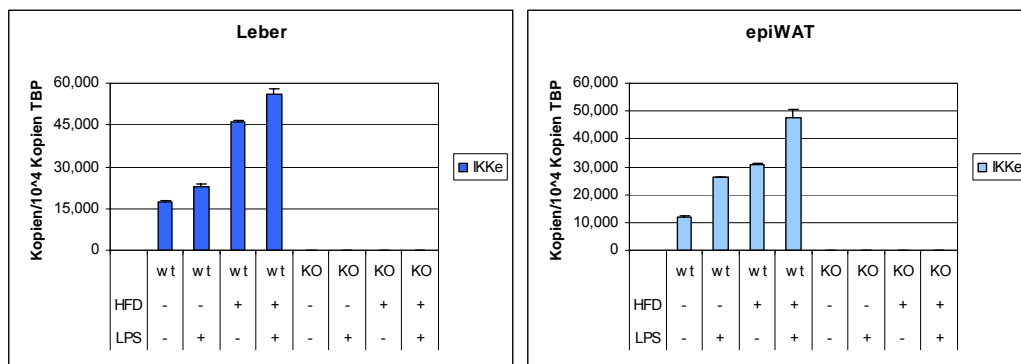
Knockout und LPS-Stimulation stärker exprimiert. IRS1 und IRS2 werden im Wildtyp sowie im Knockout bei den lean Tieren stärker exprimiert.

Bei den Western Blots der epiWAT Lysate kann mit allen Antikörpern (pIKK a/b; IR β -Untereinheit; IRS1 und IRS2) sowohl bei den Wildtyptieren als auch bei den IKK ϵ Knockouttieren jeweils mehr Protein bei den mit der Kontrolldiät gefütterten Tieren nachgewiesen werden (Abbildung 47). Die Expression von IRS1 ist dabei unter LPS-Stimulus verstärkt.

3.2.5 mRNA-Expressionsunterschiede in wt- und IKK ϵ -Knockout-Mäusen

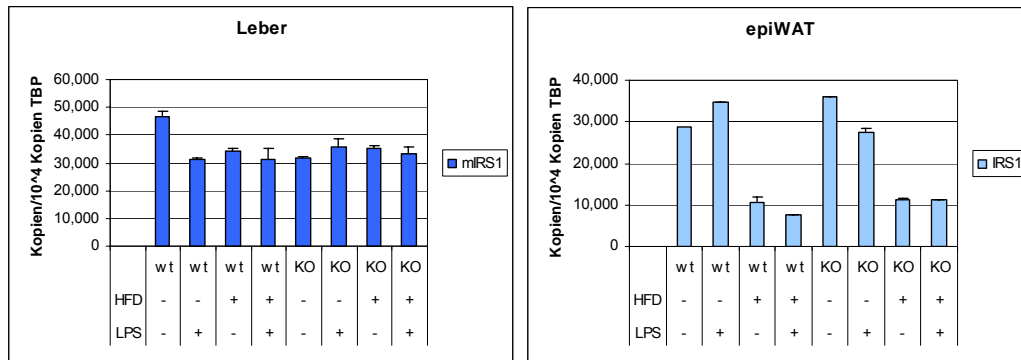
Die RNA-Expressionsanalyse mittels TaqMan-Assay erlaubt eine schnelle Analyse verschiedener Marker. Zum einen wurde die Expression verschiedener an der Insulinsignaltransduktion beteiligter Proteine untersucht (IKK ϵ , IR, IRS1, IRS1, IKK β). Des Weiteren wurde die Expression der Serum-Ameloid-A-Proteine (SAA) gemessen. Bei den weiteren verwendeten Markern handelt es sich zum einen um sogenannte Makrophanenmarker (CD11b, Emr1, CD68) und inflammatorische Marker (IL1b, IL10, IL6, Cox2, CD40, TNF α). Dazu wurde aus den Lebern und dem epiWAT von je 2 Tieren der Wildtyp- (WT) und Knockout- (IKK ϵ KO) Mäuse RNA isoliert und für die Expressionsanalyse mittels TaqMan-Assay in cDNA transkribiert. Die Hälfte der Tiere wurde vor der Nekropsie für eine Stunde mit LPS stimuliert.

IKK ϵ



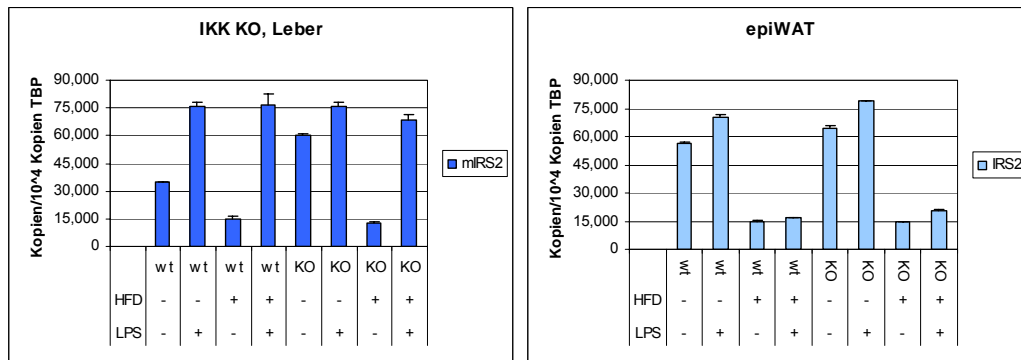
Bei den Knockouttieren ist in keinem der Gewebe IKK ϵ nachweisbar. Unter HFD wird IKK ϵ vermehrt exprimiert, eine leichte Erhöhung ist jeweils unter LPS-Stimulation zu beobachten (siehe Abbildung 44).

IRS1



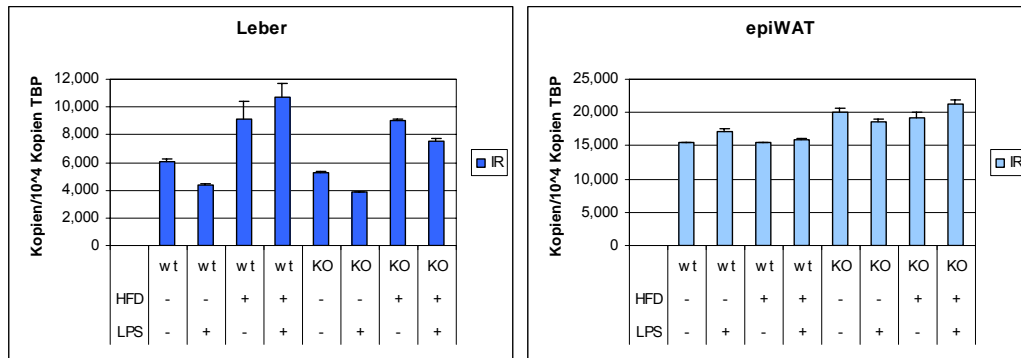
Der IKK ϵ -Knockout hat keinen Einfluss auf die IRS1-Expression. In der Leber ändert sich die Expression nicht signifikant, im epiWAT hingegen ist die IRS1-Expression der lean-Tiere ca. 3-mal höher als bei den HFD-Tieren.

IRS2



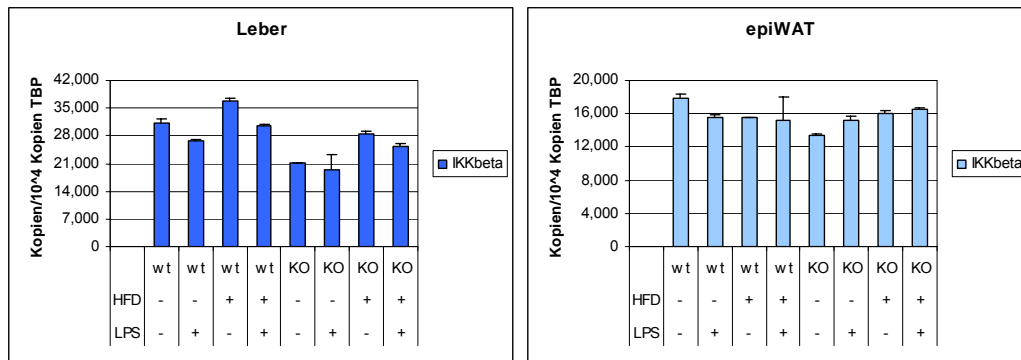
Die Expression von IRS2 ist sowohl in der Leber als auch im epiWAT unter HFD deutlich reduziert. Unter LPS-Stimulation ist in der Leber eine starke Erhöhung der Expression von IRS2 zu sehen. In der Leber wird IRS2 bei den IKK ϵ -Knockout Tieren der Kontrolldiät deutlich höher exprimiert als in den Wildtyp-tieren. Im epiWAT ist kein Unterschied zwischen den Wildtyp- und den Knockout-Tieren festzustellen.

Insulinrezeptor



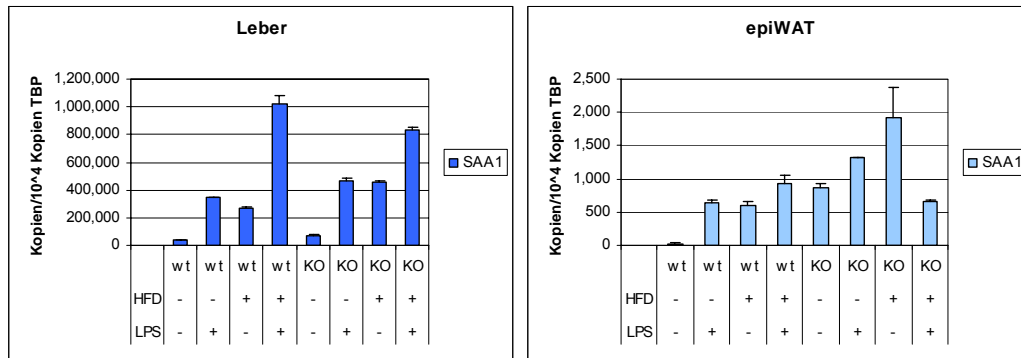
In der Leber wird der Insulinrezeptor unabhängig vom IKK ϵ Knockout unter HFD stärker exprimiert. Im epiWAT ist der Insulinrezeptor in den Knockouttieren minimal höher exprimiert als in den Wildtyp-Tieren.

IKK β



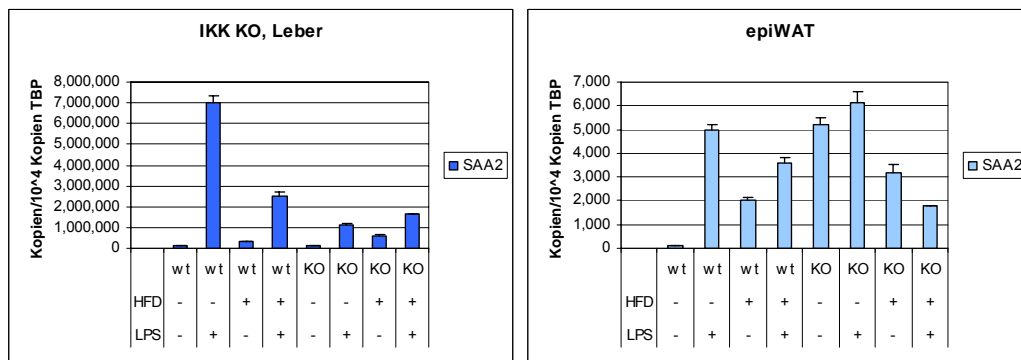
Die IKK β -Expression ist im IKK ϵ -Knockout in der Leber leicht reduziert, die Diät hat keinen signifikanten Einfluss auf die mRNA-Mengen von IKK β .

SAA1



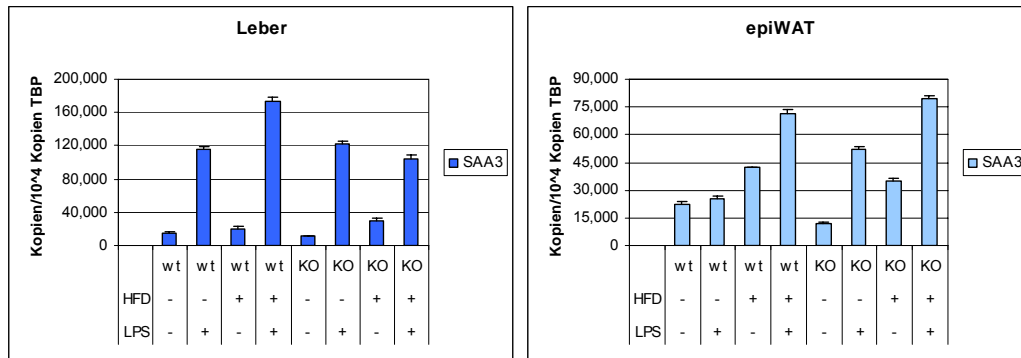
SAA1 wird unter HFD stärker exprimiert. Im IKKε-Knockout ist die SAA1-Expression in beiden Geweben erhöht. Im epiWAT wird SAA1 im Gegensatz zur starken Expression in der Leber nur schwach exprimiert.

SAA2



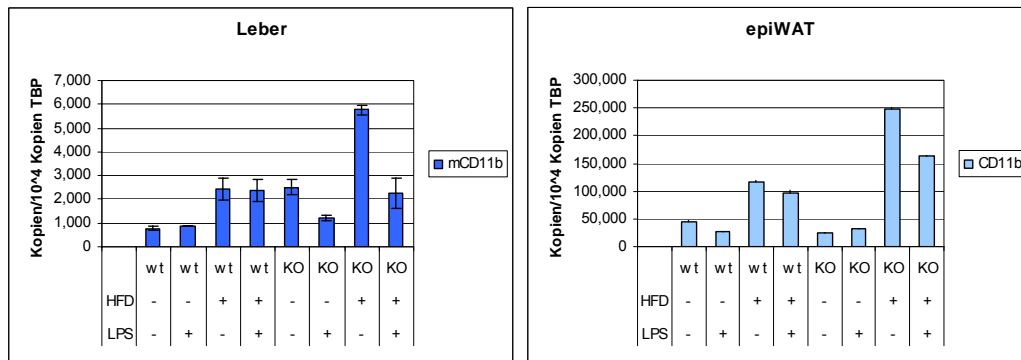
Die Expression von SAA2 ist unter HFD erhöht. Im epiWAT spielt die SAA2-Expression eine untergeordnete Rolle, das zeigt sich in der niedrigen Kopienzahl. Im IKKε Knockout der LPS-unbehandelten Tiere wird SAA2 jeweils stärker exprimiert als in den Wildtyp Tieren.

SAA3



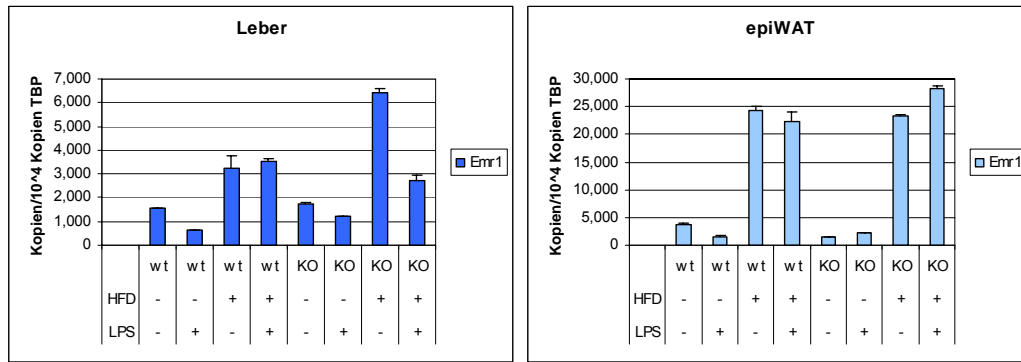
SAA3 wird in beiden Geweben etwa gleich stark exprimiert. Die Expression ist unter HFD leicht erhöht. Im IKKε Knockout wird SAA3 etwas schwächer exprimiert.

CD11b



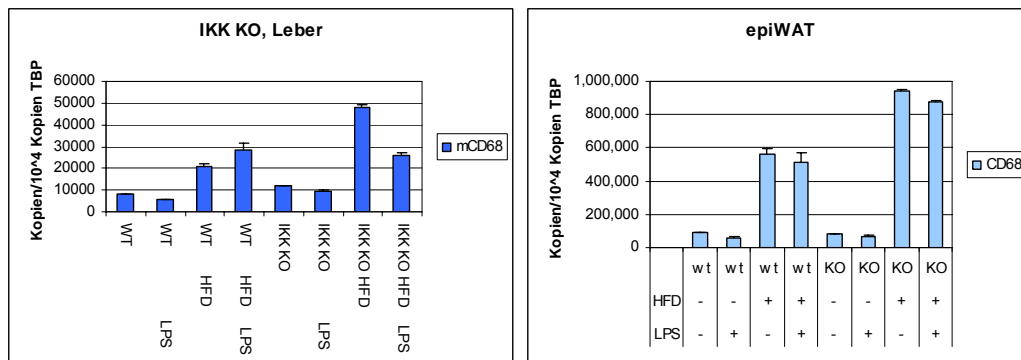
Die CD11b-Expression ist in beiden Geweben unter HFD erhöht. Die Knockout-Tiere exprimieren mehr CD11b als die Wildtyp-Tiere.

Emr1



Emr1 wird unter HFD stärker exprimiert. In der Leber ist die Emr1-Expression in den IKKε-Knockout Tieren höher, im epiWAT geringfügig niedriger als in den Wildtyp-Tieren.

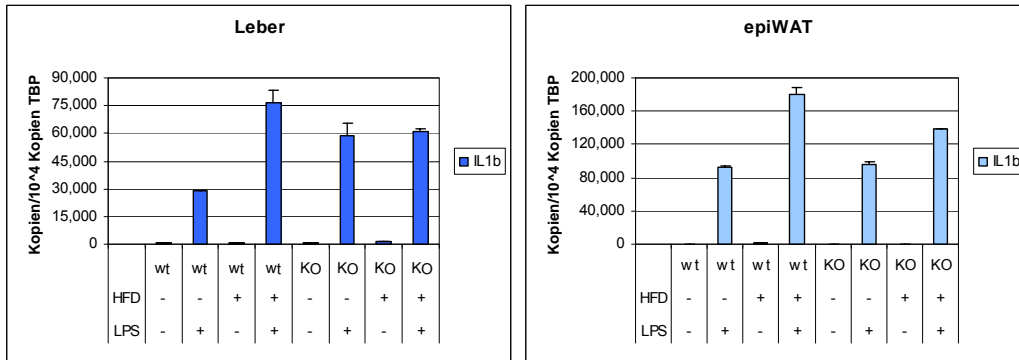
CD68



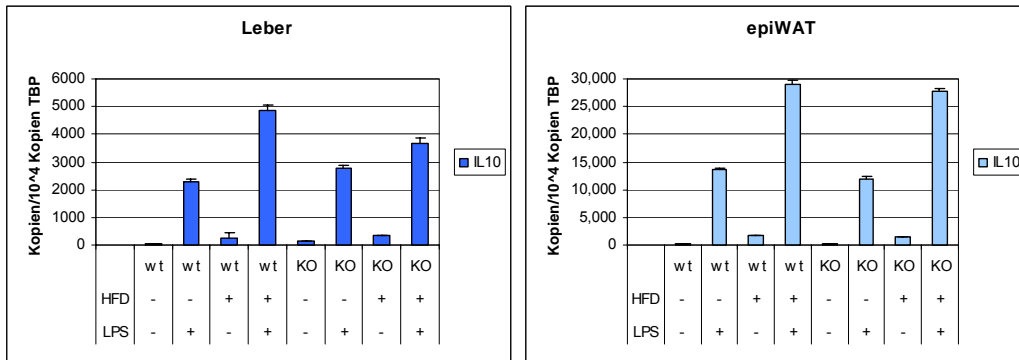
Die Expression von CD68 ist unter HFD erhöht. Im IKKε Knockout wird CD68 stärker exprimiert als im Wildtyp.

Die Expression der inflammatorischen Marker (IL1b, IL10, IL6, Cox2, CD40, TNF α) wird mit LPS stark induziert. Das Expressionsmuster ist bei allen inflammatorischen Markern gleich. Unter HFD sind die Marker etwas stärker exprimiert. Unter den Tieren der Kontrolldiät ist die Expression der Zytokine im IKK ϵ Knockout etwas stärker.

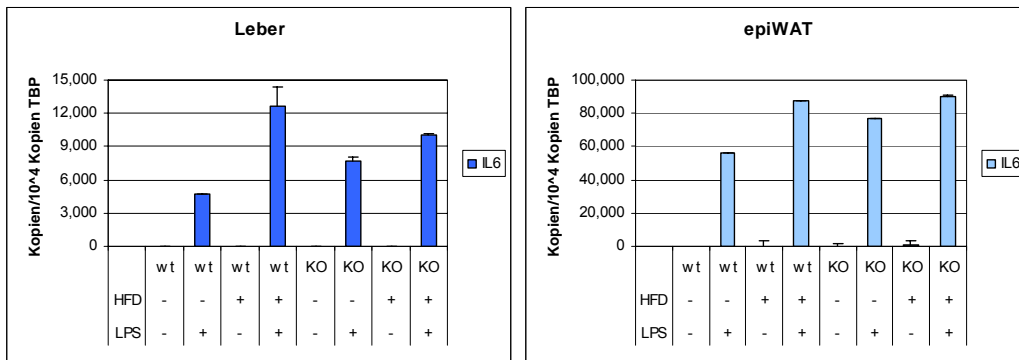
IL1b



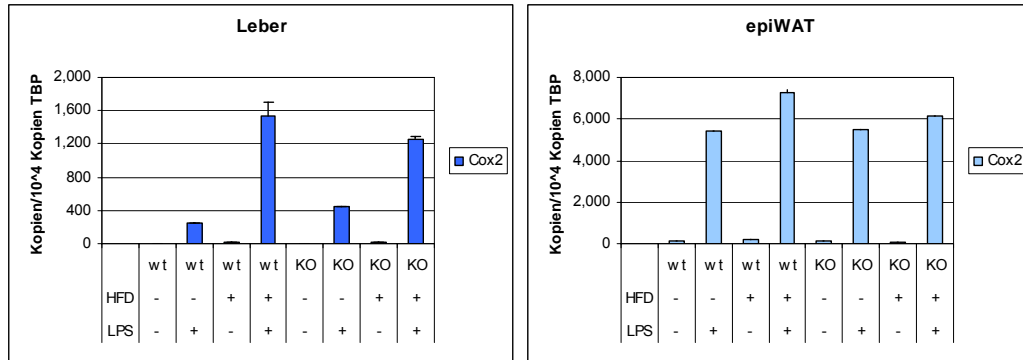
IL10



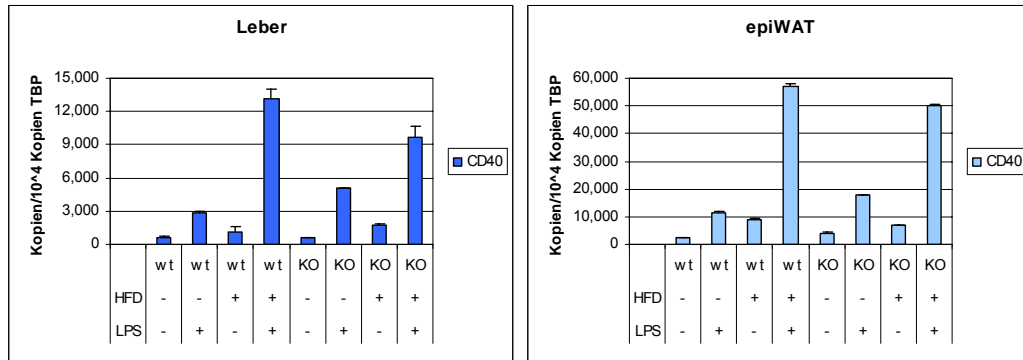
IL6



Cox2



CD40



TNF α

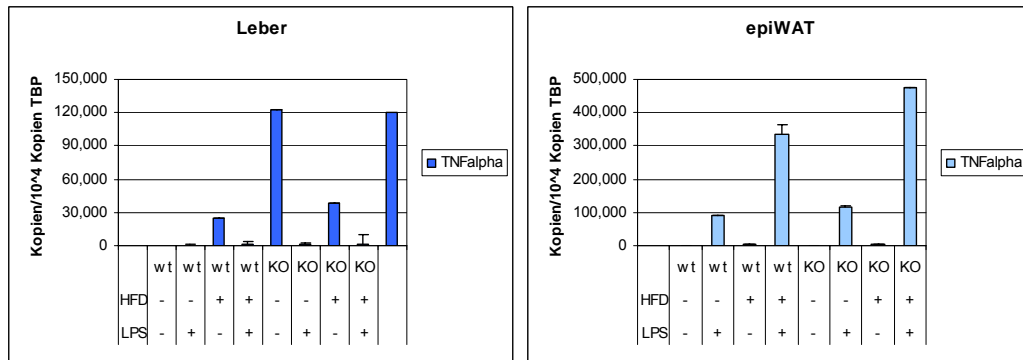


Abbildung 48: mRNA-Expression verschiedener Marker in Leber und epiWAT

Dargestellt sind die mRNA-Expressionsdaten verschiedener Marker der IKK ϵ -Knockout- sowie Wildtyp-Tiere in Leber und epiWAT.

3.2.6 NFκB-Aktivitätsmessung

Da IKKε in den NFκB-Pathway eingebunden ist, sollte untersucht werden, ob der IKKε-Knockout im Vergleich zum Wildtyp einen Einfluss auf die NFκB-Aktivität hat. Dazu wurden die Lebern von je 3 Tieren pro Gruppe aufgearbeitet. Als Positivkontrolle wurde das im Kit „TransAM Flexi NFκB Family“ von ACTIVE MOTIV enthaltene Raji (Human Burkitt's lymphoma cell line)-Zellextrakt verwendet. Die jeweiligen Antikörper (c-Rel wurde nicht gemessen, da dieser Antikörper nicht das murine c-Rel detektiert) wurden nach Standardprotokoll mit bzw. ohne Rajilysat inkubiert und die gebundene Antikörpermenge photometrisch bestimmt. Bei p65 ist der Hintergrund sehr hoch (Abbildung 49).

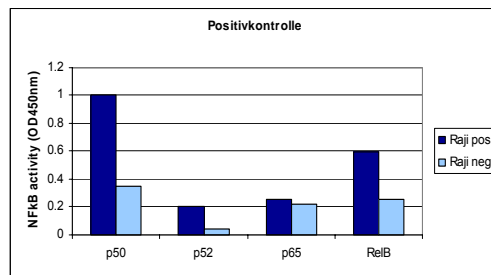


Abbildung 49: Positivkontrollen NFκB-Aktivitätsmessung

Das Raji-Zellextrakt wurde als Positivkontrolle verwendet. Die einzelnen Antikörper (p50, p52, p60 und RelB) wurden mit bzw. ohne Raji inkubiert und die gebundene Antikörpermenge photometrisch bestimmt. Die Raji-negativen Ansätze repräsentieren den Background.

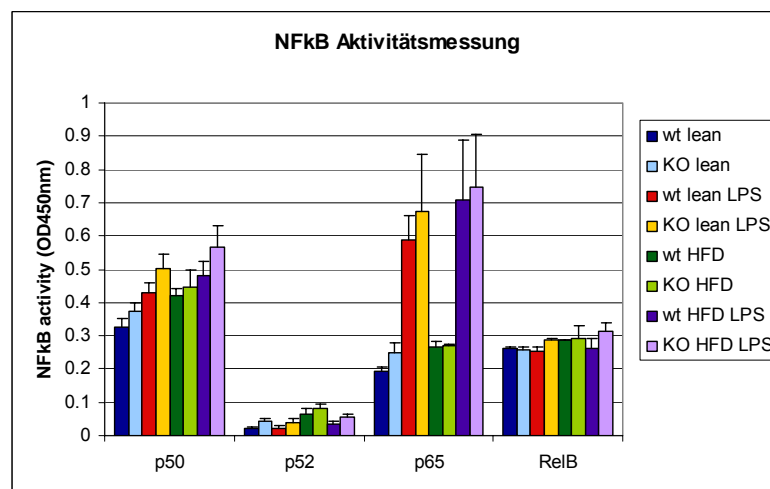


Abbildung 50: NFκB Aktivitätsmessung

Dargestellt sind die Ergebnisse der NFκB-Aktivitätsmessung der Antikörper p50, p52, p60 sowie RelB. Dazu wurden die Lebern von je 3 Tieren pro Gruppe aufgearbeitet. Bei p65 ist die Aktivität bei den LPS-behandelten Tieren erhöht, ansonsten sind keine signifikanten Unterschiede der NFκB-Aktivität festzustellen.

Es wurden aus den Lebern der verschiedenen Gruppen (lean und HFD, LPS-stimuliert) von Wildtyp- und IKK ϵ -Knockout-Mäusen Lysate aufgearbeitet, die dann mit den p50, p52, p65 bzw. RelB-Antikörpern inkubiert wurden. Abgesehen von den KO lean Tieren bei p65 ist jeweils eine marginal erhöhte Aktivität der Knockouttiere im Gegensatz zu den Wildtyptieren zu beobachten (Abbildung 50). Bei p50 und insbesondere bei p65 ist eine Erhöhung nach LPS-Stimulation in allen Tieren zu erkennen. Bei p52 und RelB ist keine signifikante Änderung nach LPS-Stimulus zu beobachten.

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung von IKK ϵ und dessen Rolle bei der Entstehung von Insulinresistenz und Typ 2 Diabetes. Für die Untersuchungen wurden *in vitro*-Versuche zur Interaktion zwischen IKK ϵ und dem Insulinrezeptor sowie den Insulinrezeptorsubstraten (IRS) durchgeführt. Des Weiteren wurde die IKK ϵ Wildtyp cDNA sowie eine kinase-inaktive Version von IKK ϵ (IKK ϵ K/A) in Zelllinien, die insulinsensitive Gewebe repräsentieren, transient exprimiert, um den Einfluss von IKK ϵ und IKK ϵ K/A auf die Insulinrezeptorautophosphorylierung und die Substratphosphorylierung zu untersuchen. Zur Charakterisierung der Funktion von IKK ϵ *in vivo* wurden C57/BL6-Mäuse untersucht, die eine normalkalorische Diät bzw. eine Insulinresistenz-induzierende, hochkalorische Diät erhalten haben. Dieses Fütterungsschema wurde mit IKK ϵ Knockout-Mäusen wiederholt, dies diente der Evaluierung der Auswirkung des IKK ϵ Gen-Knockouts auf die Ausbildung der Insulinresistenz. Die Genexpression verschiedener Markerproteine des Insulinsignalweges wurde quantitativ mittels RT-PCR (TaqMan) gemessen.

4.1 *Interaktion von IKK ϵ mit dem Insulinrezeptor und seinen Substraten in vitro*

Für *in vitro*-Versuche wurde rekombinantes IKK ϵ verwendet. Es sollte getestet werden, ob es unter den späteren Versuchsbedingungen aktiv ist. Dazu wurde ein Kinase-Assay mit radioaktivem ^{33}P -ATP etabliert. (

Abbildung 9) Casein diente als Substrat und sollte von dem rekombinanten IKK ϵ mit ^{33}P phosphoryliert werden. Zur Inhibierung der Kinaseaktivität wurden drei unterschiedliche Inhibitoren (LILLY intern) in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Bei einer Inhibitorkonzentration von 0,01 μM ist die Inhibierung der Kinaseaktivität minimal, bei einer Konzentration von 100 μM hingegen ist sie fast 100%-ig. Diese Versuche zeigten, dass das rekombinante IKK ϵ unter den Versuchsbedingungen aktiv ist und im Kinase-Assay eingesetzt werden kann.

4.1.1 Einfluss von IKK ϵ auf die Insulinrezeptorautophosphorylierung

Von WERNER et al. (2005) durchgeführte Versuche deuten darauf hin, dass eine IKK ϵ -vermittelte Phosphorylierung des Insulinrezeptors innerhalb dessen Aktivierungsdomäne (Ser 964 und Thr1148) sich negativ auf die Insulinsignaltransduktion auswirkt. Die Phosphorylierung durch IKK ϵ führte zu einer verminderten Autophosphorylierung des Insulinrezeptors. Dieser Effekt wurde in Tiermodellen bei Adipositas, Insulinresistenz, Typ 2 Diabetes und anhaltender Insulineinwirkung beobachtet (WERNER et al, 2005). Diese Ergebnisse wurden bei der „Keystone Conference“ 2005 vorgestellt, aber bislang noch nicht in einem Journal publiziert. Aufgrund dieser Daten und persönlicher Kommunikation mit Eric Werner und Steve Shoelson wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von IKK ϵ auf den Insulinrezeptor untersucht.

Dazu wurde ein ELISA durchgeführt, bei dem die Insulinrezeptor-vermittelte Phosphorylierung eines Peptids, das die katalytische Domäne der β -Untereinheit des Insulinrezeptors umfasst, gemessen wird. Nach Insulinstimulation ist eine deutlich höhere Phosphorylierung des Peptids im Gegensatz zum unstimulierten Kontrollansatz festzustellen (Abbildung 10). Als Negativkontrolle wurde der Insulinrezeptor in kinase-inaktiver Form eingesetzt. Zur Bestätigung der von WERNER et al. (2005) generierten Daten würde man in Gegenwart von IKK ϵ im ELISA aufgrund seiner Beeinträchtigung der Autophosphorylierung des Insulinrezeptors eine deutlich erniedrigte Phosphorylierung des eingesetzten Peptids erwarten. Nach vorheriger Inkubation des Insulinrezeptors mit dem rekombinanten IKK ϵ war jedoch keine Abnahme der Phosphorylierung des Peptids nachzuweisen. IKK ϵ zeigt unter diesen Versuchsbedingungen keinen Einfluss auf die Aktivität des Insulinrezeptors.

Da im vorherigen Versuch kein Einfluss von IKK ϵ auf die Aktivität des Insulinrezeptors festgestellt werden konnte, wurde diese Interaktion auf eine andere Weise untersucht. Dabei wurde der Insulinrezeptor in HEK293rapid-Zellen überexprimiert, mittels einer Immunpräzipitation isoliert und anschließend in einem radioaktiven Kinase-Assay mit rekombinanten IKK ϵ inkubiert. Deutlich zu erkennen ist die Autophosphorylierung des Precursors des Insulinrezeptors sowie der β -Untereinheit des Insulinrezeptors (Abbildung 12). Es konnte gezeigt werden, dass die kinase-inaktive Variante des Insulinrezeptors von IKK ϵ nicht phosphoryliert wird. Auch

hat IKK ϵ keinen Einfluss auf die Autophosphorylierung des intakten Insulinrezeptors (Abbildung 13).

4.1.2 IKK ϵ -vermittelte Phosphorylierung von IRS1 und IRS2

Da es sich bei IKK ϵ um eine Kinase handelt, sollte untersucht werden, ob die Insulinrezeptorsubstrate (IRS) *in vitro* direkt von IKK ϵ phosphoryliert werden können. Anhand der durchgeführten radioaktiven *in vitro*-Assays konnte eine direkte Phosphorylierung von IRS1 sowie IRS2 durch IKK ϵ nachgewiesen werden.

In ähnlichen Versuchen konnte gezeigt werden, dass IKK α und IKK β IRS1 *in vitro* direkt phosphorylieren (GAO et al., 2002). Es wurde des Weiteren gezeigt, dass die IRS-Proteine Substrate für IKK β darstellen und aufgrund spezifischer Phosphorylierung zur Entstehung der Insulinresistenz beitragen könnten. IKK β wurde in zahlreichen Studien als Kinase identifiziert, die direkt an der Entstehung der Insulinresistenz beteiligt ist (BASHAN et al., 2007; KAMON et al., 2004; SHOELSON et al., 2003). Da IKK ϵ innerhalb der Kinasedomäne eine relative große Homologie zu IKK α und IKK β aufweist (HUYNH et al., 2002), wäre es möglich, dass auch IKK ϵ die Insulinrezeptorsubstrate an Serin-Resten phosphoryliert (WERNER et al., 2005), was zu einer Beeinträchtigung der Insulinsignaltransduktion führen kann.

Die Ser/Thr-Phosphorylierung an IRS-Proteinen dient im physiologischen Zustand im Gegensatz zur Tyrosin-Phosphorylierung-vermittelten positiven Insulinsignaltransduktion als Rückkopplungshemmung (ZICK, 2001). Unter pathologischen Bedingungen werden IRS-Kinasen aktiviert, was zur verstärkten Phosphorylierung von Ser/Thr-Resten führt und letztendlich zur Entstehung der Insulinresistenz beiträgt. Deswegen könnte die Ser/Thr Phosphorylierung von IRS1 bzw. IRS2 ein genereller Mechanismus der Insulinresistenz sein (PAZ et al., 1999).

Die Phosphopeptidanalyse ergab, dass IRS1 von IKK ϵ an Ser636/639 phosphoryliert wird. Da die Sequenz von IRS2 am Ser636/639-Motiv fast identisch mit der von IRS1 ist (Abbildung 20), kann davon ausgegangen werden, dass auch IRS2 von IKK ϵ an diesen Serin-Resten phosphoryliert wird. In HEK293rapid-Zellen, die mit IRS2 transfiziert wurden, war im Western Blot eine deutlich stärkere Ser636/639-Phosphorylierung zu sehen, wenn gleichzeitig IKK ϵ transfiziert wurde (Abbildung 34). Die Serin-Reste 636/639 wurden als ein Grund der Entstehung von Insulinresistenz im Menschen identifiziert (TREMBLAY et al., 2005). Es wurde bereits gezeigt, dass die Reduktion der S6-Kinase-vermittelten Phosphorylierung von IRS1 an Ser636/639 deutlich zu einer verbesserten Insulinsensibilität beiträgt (WANG et al., 2007). Diese

Parallele zwischen der in der vorliegenden Arbeit ermittelten IKK ϵ -Phosphorylierungsstelle und den Untersuchungen zur Verbindung zwischen der Ser636/639-Phosphorylierung und der Entstehung der Insulinresistenz deutet auf einen möglichen Einfluss von IKK ϵ auf die Aktivität der Insulinrezeptorsubstrate hin. Des Weiteren phosphoryliert IKK ϵ I κ B α an Ser32/36 (SHIMADA et al., 1999). Das I κ B α Phosphorylierungs-Motiv (DDRHDSGLDSMKDE) (GOOD et al., 1996) ist in der Sequenz von IRS1 6 weitere Male, bei IRS2 3 weitere Male zu finden. Auch dies könnten potentielle Phosphorylierungsstellen für IKK ϵ sein.

Es konnte *in vitro* eine direkte Phosphorylierung von IRS1 sowie IRS2 durch IKK ϵ nachgewiesen werden. Da die Aktivität der Insulinrezeptorsubstrate sowohl unter physiologischen als auch pathologischen Bedingungen durch Tyrosin-, Serin- und Threonin-Phosphorylierungen gesteuert wird (ZICK, 2001; PAZ et al., 1999), ist dies eine interessante Beobachtung und stellt eine mögliche Verbindung zwischen IKK ϵ und den molekularen Mechanismen der Insulinresistenz dar.

4.1.3 Einfluss von IKK ϵ auf die Insulinsignaltransduktion in Zelllinien

Für Klonierungsarbeiten ist die restriktionsvermittelte Klonierung die klassische Methode. Dabei wird ein gewünschtes Fragment, z. B. ein Gen, über geeignete Schnittstellen aus einem Plasmid isoliert und über seine kompatiblen Enden in den Zielvektor ligiert. Bei dieser Methode lassen sich einzelne Fragmente leicht absichern und der Klonierungserfolg durch Restriktionsverdauung ermitteln. Der Nachteil dieser Methode ist, dass man auf bestimmte Schnittstellen angewiesen ist, die nicht unbedingt vorhanden sind. Das Einfügen geeigneter Schnittstellen ist mit einem hohen Arbeits- und Zeitaufwand verbunden (AMBERG et al., 1995).

Die Methode der Overlap-PCR bietet die Möglichkeit, zwei oder mehr Fragmente basengenau zu fusionieren (HO et al., 1989). Sie ist schnell und man benötigt keine Subklonierungsschritte. Außerdem ist man auf kein spezielles Plasmid angewiesen, und kann genomische DNA als Template einsetzen (AMBERG et al., 1995). Durch geeignete Primer erhält man eine hohe Fusionseffizienz und die Außenbereiche des Fusionsproduktes lassen sich bei Bedarf mit geeigneten Schnittstellen versehen. Ein weiterer Vorteil ist, dass die PCR-amplifizierten Zwischenprodukte über die Gelelektrophorese leicht zu überprüfen sind.

Für diese Arbeit wurde ein IKK ϵ -cDNA enthaltendes Plasmid benötigt, um verschiedene Zelllinien zu transfizieren und damit das IKK ϵ -Genprodukt in ihnen zu

exprimieren. Des Weiteren wurde eine kinase-inaktive Mutante des IKK ϵ generiert. Dazu wurde das sich in der ATP-Bindedomäne an Position 38 der Aminosäuresequenz befindende Lysin (AAG) durch einen zweifachen Basenaustausch in Alanin (GCG) umgewandelt. Ist er mutiert, kann kein ATP mehr gebunden werden, was zum Verlust der Kinaseaktivität führt (PETERS, 2000). Aus den Abkürzungen der Aminosäuren (K für Lysin und A für Alanin) sowie der Position der mutierten Aminosäure ergibt sich der Name der Mutante (IKK ϵ K38A).

Die Klone wurden sequenziert und mit der zuvor am Computer ermittelten Sequenz verglichen (siehe Anhang). Die Sequenz des IKK ϵ -Klones und des IKK ϵ K38A-Klones wiesen mit Ausnahme der vorgenommenen Mutationen keine weiteren Basenaustausche auf.

Es sollte untersucht werden, ob die Überexpression von IKK ϵ in verschiedenen Zellmodellen (FAO bzw. HEK293rapid) Auswirkungen auf die Insulinsignaltransduktion hat. Besonderes Augenmerk wurde dabei neben dem Insulinrezeptor auf die Phosphorylierung der Insulinrezeptorsubstrate und der im Insulinsignalweg unterhalb von IRS1 und IRS2 liegenden Elemente (PI3K, AKT) gelegt (MIURA et al., 2001).

Um den Einfluss von IKK ϵ auf die Insulinsignaltransduktion im Zellmodell zu untersuchen, wurden insulin-sensitive Rattenhepatomzellen (FAO) ausgewählt (CLAMPIT et al., 2003). Die IKK ϵ -Expression lässt sich in verschiedenen Zelllinien durch TNF α -Stimulation steigern (AUPPERLE et al., 2001). In MEFs wurde eine erhöhte IKK ϵ -Expression nach LPS-Stimulus festgestellt (KRAVCHENKO et al., 2003).

Nach 24-stündiger TNF α -Stimulation der FAO-Zellen war eine deutliche Erhöhung der IKK ϵ -Expression zu sehen (Abbildung 24). Die Stimulation mit PMA und LPS hatte keinen Einfluss auf die Expression von IKK ϵ . Bei den mit TNF α behandelten Zellen war die Protein-Expression von IRS1 deutlich vermindert. Dieser Effekt nach TNF α -Stimulation wurde bereits in 3T3-L1 Adipocyten beobachtet (SUN et al., 1999). Da IKK ϵ die Aktivierung von NF κ B und damit eine verstärkte TNF α -Synthese stimulieren kann (WIETEK et al., 2006; SWEENEY et al., 2005), wäre ein Einfluss durch die Erhöhung des IKK ϵ -Spiegels auf die Transkription von IRS1 denkbar. Kürzlich konnte in 3T3-L1 Adipocyten eine 80%ige Reduktion der IRS1-mRNA nach andauernder TNF α -Stimulation gezeigt werden (STEPHENS et al., 1997). Um zu überprüfen, ob auch in den FAO-Zellen die geringere IRS1-Menge durch eine fehlerhafte oder reduzierte

Transkription bedingt ist, könnte eine RT-PCR Aufschluss geben. Wird die Transkription des IRS1-Gens durch die erhöhte Menge an IKK ϵ beeinträchtigt, müsste sich weniger IRS1-mRNA nachweisen lassen. Weiterhin könnte die Ursache posttranskriptional zu finden sein. Es ist möglich, dass die Prozessierung des IRS1-Proteins beeinträchtigt wird. Dies könnte z. B. durch ER-Stress verursacht sein (URANO et al., 2000), der entweder durch die TNF α -Stimulation oder IKK ϵ -vermittelte JNK-Aktivierung bedingt sein kann (WAETZIG et al., 2005). Ist dies nicht der Fall, könnte der Grund posttranslational zu finden sein. Es wäre denkbar, dass IKK ϵ einen Einfluss auf die Degradation von IRS1 hat. Der häufigste proteolytische Abbauweg in Säugerzellen ist der Abbau über die Proteasomen. Sie degradieren die meisten kurzlebigen zellulären sowie fehlerhaften Proteine und werden bei vielen biologischen Funktionen wie z. B. der Kontrolle des Zellzyklus und dem programmierten Zelltod eingesetzt (CIECHANOVER, 1994). Es konnte gezeigt werden, dass IRS1 infolge einer chronischen Insulinbehandlung abgebaut wird (SUN et al., 1999). Es wäre also denkbar, dass IRS1 nicht nur aufgrund dauerhafter Insulinstimulation abgebaut wird, sondern auch eine erhöhte IKK ϵ -Expression Signalwege beeinflusst, die zur Degradation von IRS1 führen. Im Modell inflammatorisch induzierter Insulinresistenz konnte gezeigt werden, dass die SOCS-Proteine (suppressors of cytokine signaling) an der Ubiquitylierung und proteasomalen Degradation von IRS1 beteiligt sind (RUI et al., 2002). Da im Experiment die Zellen mit TNF α stimuliert wurden, liegt eine ähnliche Situation wie bei einer inflammatorischen Antwort vor.

In HepG2-Zellen wurde die Reduktion der IRS1-Totalproteinmenge sowie eine verstärkte Phosphorylierung von IRS1 am Serin-Rest 307 durch die Aktivierung von IKK β hervorgerufen (GAO et al., 2002). Als Ursache wurde zum einen die tatsächliche Abnahme der Proteinmenge vermutet, oder aber eine verminderte Antikörperaffinität zum IRS1-Protein bedingt durch den veränderten Phosphorylierungsstatus (Ser307). In der vorliegenden Arbeit ist nach TNF α Stimulation der FAO-Zellen keine erhöhte Tyrosin-Phosphorylierung festzustellen. Es ist daher wahrscheinlicher, dass die Menge an IRS1 tatsächlich vermindert ist. Um diese Vermutung zu untermauern, könnte man zum einen verschiedene Antikörper, die IRS1 an unterschiedlichen Domänen erkennen, testen, oder die pIRS1-enhaltenden Lysate zunächst dephosphorylieren und anschließend den Western Blot mit dem IRS1-Antikörper wiederholen.

IKK ϵ ist in die Immunantwort nach viralen Infektionen involviert. Seine Expression wird nach einer Hepatitis C Virus Infektion erhöht (VILASCO et al., 2006; TENOEVER et al., 2007). Bei einer Hepatitis C Infektion wird in den Leberzellen SOCS 3 (suppressors

of cytokine signaling) hochreguliert, was zur vermehrten Ubiquitynylierung von IRS1 und dessen anschließendem Abbau führt (KAWAGUCHI et al., 2004). Des Weiteren konnte bei Patienten mit einer Hepatitis C Infektion stark erhöhte Spiegel an TNF α nachgewiesen werden (ELSAMMAK et al., 2005, GIANELLI et al., 2006). Im durchgeführten Experiment waren ebenfalls ein erhöhter TNF α - sowie IKK ϵ -Spiegel vorhanden, was die Vermutung nahe legt, dass diese Faktoren zur Degradation von IRS1 führen können.

Neben der verminderten IRS1-Expression nach TNF α -Stimulation in den FAO-Zellen war im Western Blot eine weniger starke Tyrosin-Phosphorylierung auf Höhe der Insulinrezeptorsubstrate zu beobachten (Abbildung 25). Dies kann zum einen auf die Reduktion der Menge von IRS1 zurückzuführen sein, was bedeuten würde, dass nicht der Grad der Tyrosin-Phosphorylierung verändert ist, sondern die geringere Proteinmenge Ursache für das schwächere Signal ist. Denkbar wäre jedoch auch ein Einfluss auf, oder eine Interaktion von IKK ϵ mit dem Insulinrezeptor oder IRS1 (WERNER et al., 2005). Der veränderte Phosphorylierungsstatus der Proteine kann zu einer veränderten Konformation führen, wodurch die Insulinrezeptor-vermittelte Tyrosin-Phosphorylierung von IRS1 erschwert wird (GAO et al., 2002). Eine weitere Möglichkeit ist, dass IRS1 von IKK ϵ an Serin-Resten phosphoryliert wird, deren Phosphorylierung zu einer Hemmung der Interaktion zwischen IRS1 und dem Insulinrezeptor führen (ZICK, 2001).

Als Nachweis, dass die in den FAO-Zellen nach TNF α -Stimulation verminderte Tyrosin-Phosphorylierung sowie die verringerte Expression von IRS1 von der erhöhten Menge an IKK ϵ beeinflusst wird, müsste man die durch TNF α stimulierte Expression von IKK ϵ hemmen. Eine geeignete Methode dazu ist der gezielte Gen-Knockdown mithilfe von siRNA (SCHERR et al., 2007). Die FAO-Zellen wurden mit der entsprechenden siRNA transfiziert und mit TNF α stimuliert. Es wurde parallel eine Transfektionskontrolle mit GFP-gekoppelter siRNA durchgeführt, bei der keine erfolgreiche Transfektion nachzuweisen war (Abbildung 27). Daher muss davon ausgegangen werden, dass der erwünschte Effekt des Gen-Knockdowns aufgrund einer zu geringen Transfektionseffizienz ausblieb. FAO-Zellen sind relativ schwierig zu transfizieren (MEUNIER-DURMORT et al., 1996). Weitere Protokolle und Methoden (CLAMPIT, 2003) - unterschiedliche Transfektionsreagenzien sowie Elektroporation - zur siRNA-Transfektion der FAO-Zellen führten nicht zum gewünschten Erfolg.

Eine andere Möglichkeit zur Untersuchung des Einflusses von IKK ϵ auf die Insulinsignaltransduktion in den FAO-Zellen wäre, die Zellen zum einen mit IKK ϵ zu transfizieren, um die erhöhte Expression nach TNF α -Stimulation zu simulieren und als Negativkontrolle kinase-inaktives IKK ϵ (IKK ϵ K38A) zu transfizieren. Jedoch ließen sich die FAO-Zellen auch mit Plasmiden nicht zufrieden stellend reproduzierbar transfizieren. Der Versuch, eine stabil exprimierende FAO-IKK ϵ sowie FAO-IKK ϵ K38A-Zelllinie zu generieren, blieb erfolglos.

Die Untersuchungen der TNF α -vermittelten Induktion der IKK ϵ -Expression in FAO-Zellen zeigten sowohl eine verringerte IRS1-Expression als auch eine verminderte Tyrosin-Phosphorylierung der Insulinrezeptorsubstrate.

Ein weiteres Zellmodell, das sich für die Untersuchung der Insulinsignaltransduktion eignet, sind HEK293rapid-Zellen (KELLERER et al., 2001). Diese Zellen sind leicht und reproduzierbar zu transfizieren und exprimieren die CMV-Promotor getriebene Expressionsplasmide sehr effizient (LOUIS et al., 1997). Eine erhöhte Expression von endogenem IKK ϵ nach TNF α -Stimulation war in den HEK293rapid-Zellen nicht nachweisbar, deswegen wurden die Gen-Knockdown-Versuche in diesem Zellmodell nicht durchgeführt.

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss von IKK ϵ auf die Insulinsignaltransduktion untersucht werden. Dabei spielt der Insulinrezeptor als erstes Glied der Insulin-vermittelten Signaltransduktionskette eine entscheidende Rolle, da er das Insulinsignal an die IRS-Proteine weiterleitet (TANIGUCHI et al., 2006). Zunächst wurde die Auswirkung der Überexpression von IKK ϵ auf den Insulinrezeptor untersucht. Zu beobachten war, dass mit steigender Menge an transfiziertem IKK ϵ die Menge des Insulinrezeptor Precursors zu- und die Menge der β -Untereinheit des Insulinrezeptors abnimmt (Abbildung 29). Eine mögliche Schlussfolgerung wäre hier, dass durch die reduzierte Menge an verfügbarer β -Untereinheit das Weiterleiten des Insulinsignals nur in abgeschwächter Form stattfindet. Um diese These zu überprüfen, wurde die AKT-Phosphorylierung nach Insulinstimulus der mit IKK ϵ überexprimierenden Zellen mit denen von IKK ϵ -untransfizierten Zellen verglichen (Abbildung 30). Die Phosphorylierung von AKT, (auch Proteinkinase B) ist insulinabhängig und damit abhängig von der Funktionalität des Insulinrezeptors (KOBAYASHI et al., 2005; KOHN et al., 1995). Es stellte sich heraus, dass der Grad der

Phosphorylierung bei beiden Versuchsansätzen identisch ist, was nicht auf eine verminderte Insulinsignaltransduktion schließen lässt. Die Menge des fertig prozessierten Insulinrezeptors scheint hier nicht der limitierende Schritt der Insulinsignaltransduktion zu sein. Der Grund dafür liegt wahrscheinlich darin, dass die Zellen zusätzlich zum IKK ϵ auch mit dem Insulinrezeptor transfiziert wurden. Bei den Ansätzen, die untransfiziert waren, genügte die endogene Menge des Insulinrezeptors bereits für eine starke AKT-Phosphorylierung nach Insulinstimulierung. Daher ist davon auszugehen, dass selbst wenn IKK ϵ einen negativen Einfluss auf die Insulinsignaltransduktion hat, dieser Effekt bei diesen Versuchsbedingungen nicht zu sehen ist, da der endogen vorhandene Insulinrezeptor bereits ausreicht, um das Insulinsignal vollständig weiterzuleiten.

In einem weiteren Experiment wurden HEK293rapid-Zellen nur mit IKK ϵ und nicht zusätzlich dem Insulinrezeptor transfiziert (Abbildung 36). Auch unter diesen Versuchsbedingungen war kein Einfluss auf die Phosphorylierung von AKT nach Insulinstimulation zu sehen. Jedoch ist die Tyrosin-Phosphorylierung der β -Untereinheit des Insulinrezeptors bei 95 kDa sowie des Insulinrezeptor-Precursors deutlich verringert.

Obwohl durch die verminderte Prozessierung der β -Untereinheit des Insulinrezeptors nach Überexpression mit IKK ϵ kein negativer Einfluss auf die Insulinsignaltransduktion nachzuweisen war, ist dies eine interessante Beobachtung. Eine mögliche Erklärung für die verminderte Prozessierung der β -Untereinheit des Insulinrezeptors könnte sein, dass die Transkriptionsmaschinerie der Zelle mit derart großen Mengen an transfiziertem Plasmid überlastet ist, und die transfizierten Konstrukte in Konkurrenz treten. Es könnte aber auch sein, dass die erhöhte Menge an IKK ϵ ER-Stress auslöst und dadurch die Prozessierung beeinträchtigt wird (KANETO et al., 2005; RON, 2002). ER-Stress wird als ein Faktor, der zur Entstehung von Diabetes beiträgt, angesehen (YE, 2007; LIPSON et al., 2006) Am und im Endoplasmatischen Retikulum finden Translation, Proteinfaltung, posttranslationale Modifikationen und der Proteintransport von Transmembranproteinen statt. ER-Stress führt dazu, dass diese Vorgänge verlangsamt oder komplett gehemmt werden (OZCAN et al., 2004). Ein gut untersuchter ER-Stressmarker ist eIF2 α (eukaryotischer Initiationsfaktor), der im unphosphorylierten Zustand die Proteinsynthese initiiert. Seine Phosphorylierung korreliert mit der Inhibition der Translationsinitiierung und damit der Gesamtgeschwindigkeit der Proteinsynthese (BOYCE et al., 2005). Beruht im Fall der Überexpression von IKK ϵ die verminderte Prozessierung der β -Untereinheit des Insulinrezeptors auf ER-Stress, so würde man im

Western Blot eine stärkere Phosphorylierung von eIF2a erwarten. Dieser Marker zeigte in diesen Versuchen jedoch keinerlei Unterschiede im Grad der Phosphorylierung von eIF2a (Abbildung 31).

Chaperone sind innerhalb des Endoplasmatischen Retikulums für die Faltung vieler Signalmoleküle, darunter insbesondere Kinasen, und damit deren Konformation, Stabilität und Funktion zuständig (MALONEY et al., 2002). In diabetischen Zellen wurde eine verminderte Proteinprozessierung aufgrund reduzierter Chaperonmengen beobachtet (YAN et al., 2003). Der native Insulinrezeptor-Precursor durchläuft einen komplexen intrazellulären Weg, um seine definierte Struktur, Funktion und Lokalisation an der Zelloberfläche zu erhalten (MAGGI et al., 1999). Im ER-Lumen wird der Insulinrezeptor-Precursor zum fertigen Insulinrezeptor prozessiert (OLSON et al., 1988). Daran sind insbesondere drei Chaperone beteiligt, sie katalysieren die einzelnen Schritte. Dabei handelt es sich um Hsp70 (Heat shock Protein), GRP78 (Glucose related Protein) und Calnexin (ROUARD et al., 1999). Im Skelettmuskel von Diabetes Typ 2-Patienten konnte eine erniedrigte Expression von Hsp72, einer Isoform von Hsp70, ermittelt werden, die direkt mit dem Grad der Schwere der Insulinresistenz korreliert (KURUCZ et al., 2002). GRP78 ist für die Qualitätskontrolle der Proteine zuständig. Es hält missgefaltete Proteine zurück (RUDDON et al., 1997). In Lebern diabetischer Ratten wurde eine Verminderung der GRP78 mRNA-Menge festgestellt (SZANTO et al., 1995). Führt die erhöhte Expression von IKK ϵ in den HEK293rapid Zellen zu einem diabetischen Zustand, so wäre es möglich, dass dadurch die GRP78- oder Hsp70-Expression gesenkt und somit die Prozessierung des Insulinrezeptors beeinträchtigt ist.

Da die Induktion der Expression von IKK ϵ nach TNF α Stimulation in den FAO-Zellen einen Einfluss auf die Expression von IRS1 zeigte, war dieses Insulinrezeptorsubstrat sowie IRS2 Ziel weiterer Untersuchungen. Nach Transfektion der HEK293rapid Zellen mit IKK ϵ ist bei gleichzeitiger Überexpression von IRS1 bzw. IRS2 ein deutlicher Shift (Größenverschiebung der Proteinbande im SDS-Gel) dieser Proteine zu beobachten (Abbildung 32). Da der Shift parallel zur Überexpression der Kinase IKK ϵ zu beobachten ist, ist es wahrscheinlich, dass er durch Phosphorylierungen zustande kommt. In HepG2-Zellen wurde die Erhöhung der IRS1-Phosphorylierung an Serin- und Threonin-Resten durch die Aktivierung von IKK β verursacht (SUN et al., 1995). Die verstärkte Phosphorylierung von IRS1 resultierte in einer verringerten Mobilität des Proteins im Gel, was zu der Detektion von zwei Banden mit dem phosphospezifischen

Antikörper führte (GAO et al., 2002). Da im Experiment der vorliegenden Arbeit ein Total-IRS1-Antikörper benutzt wurde, und nicht wie bei GAO et al. (2002) der Serin307-phosphospezifische IRS1-Antikörper, stellt der Shift wahrscheinlich eine Reihe verschieden phosphorylierter Proteine dar.

Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden HEK293rapid Zellen mit IRS1 bzw. IRS2 und IKK ϵ bzw. IKK ϵ K38A transfiziert und jeweils das Insulinrezeptorsubstrat über eine Immunpräzipitation angereichert. Eine Hälfte der Ansätze wurde mit Alkalischer Phosphatase dephosphoryliert (

Abbildung 35). Zu beobachten war zum einen der typische Shift der IRS-Proteine bei gleichzeitiger Überexpression von IKK ϵ im Gegensatz zu den mit der kinase-inaktiven Form von IKK ϵ überexprimierenden Ansätzen. Des Weiteren war nach der Dephosphorylierung das Niveau von IRS1 und IRS2 wieder auf die Lauflänge der Insulinrezeptorsubstrate gefallen, die parallel mit IKK ϵ K38A exprimiert wurden. Die Größenverschiebung der Proteinbande im SDS-Gel beruhte demnach auf einer verstärkten Phosphorylierung von IRS1 und IRS2.

Die von WERNER et al. (2005) beschriebene IKK ϵ -vermittelte Inhibierung der Insulinrezeptor-Tyrosinphosphorylierung konnte nicht bestätigt werden, jedoch zeigte sich im Zellmodell (HEK293rapid) eine verringerte Insulinrezeptor-Prozessierung bei Überexpression von IKK ϵ sowie eine Größenverschiebung der Proteinbanden von IRS1 und IRS2, die anscheinend durch IKK ϵ -vermittelte Phosphorylierungen verursacht wird.

Die PI3K setzt sich aus der regulatorischen p85- und der katalytischen p110-Untereinheit zusammen. Die p85-Untereinheit enthält zwei SH2-Domänen, die für die Interaktion mit Tyrosin-phosphorylierten Enzymen, in diesem Fall IRS1 bzw. IRS2, notwendig sind (BALTENSBERGER et al., 1994). Die IRS-Proteine werden im Zuge der Insulinantwort an mehreren Tyrosin-Resten phosphoryliert, die als Bindestellen für die SH2-Domäne der p85-Untereinheit dienen. In diesem Experiment sollte untersucht werden, ob IKK ϵ einen Einfluss auf die Interaktion zwischen p85 und IRS1 bzw. IRS2 hat. Nach Insulinstimulation war weder bei IRS1 noch bei IRS2 eine verstärkte Interaktion mit p85 nachzuweisen (Abbildung 37). Dies wäre jedoch zu erwarten gewesen, da die Interaktion von PI3K mit den Insulinrezeptorsubstraten insulinabhängig ist (VIRKAMÄKI et al., 1999). Es konnte jeweils endogenes p85 im Immunpräzipitat von

IRS1 bzw. IRS2-transfizierten Zellen detektiert werden. Andersherum konnte zumindest bei den IRS2-transfizierten Zellen nach Immunpräzipitation mit dem p85-Antikörper das IRS2-Protein nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse bestätigen eine Protein-Protein-Assoziation zwischen p85 und IRS2 (SALTIEL et al., 2001). Bei den mit IRS2 transfizierten Zellen scheint der Effekt der Protein-Protein-Assoziation bei gleichzeitiger transienter Transfektion von IKK ϵ noch verstärkt zu werden. Eine Verbesserung der Interaktion zwischen IRS1 bzw. IRS2 und PI3K ist in Leptin-behandelten FAO- und C2C12-Zellen sowie bei Leptin-behandelten Ratten festgestellt worden (KELLERER et al., 1997; SZANTO et al., 2000; SINGH et al., 2003), wobei der Mechanismus bislang unbekannt ist. Möglicherweise führt die Phosphorylierung von IRS2 durch IKK ϵ zu einer höheren Affinität zwischen IRS2 und p85 oder einer Stabilisierung des Komplexes.

4.2 Funktion von IKK ϵ bei der Entstehung der Insulinresistenz in vivo

Zur Charakterisierung der Funktion von IKK ϵ in vivo wurde die Expression von IKK ϵ in murinen Geweben mit und ohne Insulinresistenz untersucht. Dazu wurden Fütterungsexperimente mit C57/BL6-Mäusen durchgeführt, die eine normal- und Insulinresistenz-induzierende, hochkalorische Diät (HFD) erhalten haben. Zur Untersuchung des Einflusses von IKK ϵ auf die Entstehung der Insulinresistenz wurden diese Fütterungsexperimente mit IKK ϵ Knockout-Mäusen wiederholt. Es wurde die mRNA-Expression von Genen, die an der Insulinsignaltransduktion beteiligt sind, sowie von Makrophagenmarkern und Zytokinen quantitativ untersucht und mit parallel untersuchten Wildtyp-Tieren verglichen.

4.2.1 IKK ϵ -Expression in Wildtyp- und insulinresistenten C57BL/6-Mäusen

Zur Untersuchung der IKK ϵ -Expression in verschiedenen murinen Geweben wurde aus Geweben (Leber, Niere, Muskel, epididymiales Fettgewebe = epiWAT) von C57BL/6-Mäusen RNA gewonnen und in cDNA transkribiert, um sie mittels TaqMan-Analyse quantitativ zu untersuchen. Die Mäuse stammen aus einer Studie („DIM22-Studie“, LILLY), deren Ziel es war, die Faktoren der Diät-induzierten Adipositas (DIO, diet induced obesity), die zur Insulinresistenz führen, zu untersuchen. Diet induced obesity

ist einer der Hauptfaktoren bei der Entwicklung des metabolischen Syndroms und Diabetes Typ 2 (LUMENG et al., 2007; GREENBERG et al., 2006). Die Mäuse erhielten 3 verschiedene Diäten über einen Zeitraum von 16 Wochen nach Absetzen vom Muttertier (Abbildung 38). Gruppe 1 bekam über die gesamte Dauer eine normalkalorische Diät (lean chow), Gruppe 2 erhielt während der letzten Woche eine hochkalorische Diät (HFD, high fat diet). Die kurzzeitige Gabe des HFD-Futters diente dazu, mögliche Kurzeiteffekte der hochkalorischen Diät zu untersuchen. Gruppe 3 erhielt über den gesamten Zeitraum das HFD-Futter, was zur Diät-induzierten Adipositas und Insulinresistenz in diesen Tieren führt (SHOELSON et al., 2006).

Das Expressionsniveau von IKK ϵ in Leber und epiWAT ist bei den Kontrolltieren etwa 5-mal höher als im Muskel und der Niere (Abbildung 39). Diese Ergebnisse werden durch die Daten von SHIMADA et al. (1999) bestätigt. Signifikante Kurzeiteffekte der HFD auf die IKK ϵ -Expression konnten in Leber, epiWAT und Niere nicht nachgewiesen werden. Lediglich im Muskel stieg die IKK ϵ -Expression nach einer Woche HFD deutlich an, was sich aufgrund des Fehlerbalkens jedoch relativiert. Im Modell der Insulinresistenz nach 16-wöchiger HFD stieg die Expression von IKK ϵ in der Leber um das 3-fache an, im epiWAT sogar um das 6-fache. Die Expression von IKK ϵ wird in Makrophagen durch inflammatorische Stimuli angeregt (WANG et al., 2005). In der Leber liegen zahlreiche Makrophagen (Kupffersche Zellen) vor (DAHLE et al., 2005) und in das Fettgewebe werden vermehrt Makrophagen unter HFD infiltriert (KANDA et al., 2006). Makrophagen setzen zahlreiche Zytokine wie TNF α frei (STOFFELS et al. 2004), die die Expression von IKK ϵ induzieren (KRAVCHENKO et al., 2003). Die TNF α -Expression der Tiere aus der DIM22 Studie stieg in Leber und epiWAT nach 16-wöchiger HFD extrem an. Dies erklärt den starken Anstieg der IKK ϵ -Expression in Leber und epiWAT bei den HFD-Tieren. Bei der Insulinresistenz kann man allgemein erhöhte inflammatorische Werte messen. Der starke Anstieg der IKK ϵ -Expression bestätigt Untersuchungen, die IKK ϵ in einen Zusammenhang mit inflammatorischen Antworten stellen (INDUKURI et al., 2006; SANKAR et al., 2006).

Dass IKK ϵ in inflammatorischen Geweben vorwiegend exprimiert wird und weniger in den klassischen Zielgeweben des Glukose-Stoffwechsels (Leber und Muskel) (KISHORE et al., 2002), deutet darauf hin, dass IKK ϵ nicht primär an der Regulation des Insulinsignalings beteiligt ist, wie z.B. JNK als Mediator der Rückkopplungshemmung (HERS et al., 2005), sondern in Stadien eines nicht normal regulierten Stoffwechsels die Insulinsignaltransduktion negativ beeinflussen könnte. Das könnte bedeuten, dass IKK ϵ nicht unbedingt eine direkte Wirkung auf die Proteine der Insulinsignaltransduktion hat,

sondern in Zusammenhang mit der erhöhten Ausschüttung von Zytokinen, die zur Aktivierung von Kinasen wie JNK (c-Jun N-terminale Kinase), IKK β oder PKC (Proteinkinase C) und damit dem Auftreten der Insulinresistenz führen, steht (SHIMADA et al., 1999).

4.2.2 Bedeutung der Expressionsunterschiede in Wildtyp- und IKK ϵ -Knockout Mäusen

Für weitere Untersuchungen wurden IKK ϵ -Knockout-Mäuse im C57BL/6-Hintergrund generiert. Um mögliche Auswirkungen des IKK ϵ -Knockouts auf die Insulinsignaltransduktion und die daran beteiligten Proteine zu untersuchen, wurden die IKK ϵ Knockout-Mäuse sowie zur Kontrolle Wildtyp-Mäuse zum einen mit Kontrollfutter, sowie eine andere Gruppe mit hochkalorischer Diät (HFD, high fat diet) gefüttert. HFD führt zu einem Stadium der Insulinresistenz (TERAUCHI et al., 2007; SVEGLIATI-BARONI et al., 2006). Die Hälfte der Tiere aller vier Gruppen wurde über Nacht vor der Tötung gehungert und eine Stunde vorher mit 400 μ g/kg LPS stimuliert, der Rest der Tiere hat zur Kontrolle physiologische Kochsalzlösung (Saline) bekommen. (Übersicht der Gruppen s. Abbildung 40)

Die phänotypisch unauffälligen Knockout-Tiere wurden zur Kontrolle genotypisiert. Der Knockout des IKK ϵ -Gens konnte auf DNA-Ebene, Protein-Ebene sowie auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden.

Die IKK ϵ -Knockout-Mäuse wurden auf Proteinebene hinsichtlich möglicher Unterschiede in der Insulinsignaltransduktion im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren untersucht. Von den Leber- und epiWAT-Lysaten der IKK ϵ -Knockout-Mäuse sowie der Wildtyp-Mäuse wurden Western Blots verschiedener an der Insulinsignaltransduktion beteiligter Proteine gemacht (Abbildung 46 und Abbildung 47).

Der I κ B Kinase Komplex (IKK) wird bei durch Adipositas bedingter Insulinresistenz aktiviert (ARKAN et al., 2005; BASHAN et al., 2007). Die Aktivierung der IKK-Proteine erfolgt durch Phosphorylierung (SHAMBHARKAR et al., 2007). Der Western Blot der IKK ϵ Knockout- und der Wildtypmäuse detektiert in der Leber jeweils unter HFD eine erhöhte Phosphorylierung von IKK α und IKK β . Diese Ergebnisse zeigen, dass die HFD-Fütterung der Mäuse zu einem Stadium der Insulinresistenz führt (TERAUCHI et al., 2007; SVEGLIATI-BARONI et al., 2006).

In beiden Geweben war unter HFD eine verminderte Expression der β -Untereinheit des Insulinrezeptors zu beobachten. Dieses Phänomen wurde bereits beschrieben

(FRIEDMAN et al., 1997). Die Genexpressionsdaten der TaqMan-Analyse hingegen zeigen in der HFD-Leber einen höheren mRNA-Spiegel des Insulinrezeptors. Das könnte bedeuten, dass der Insulinrezeptor entweder nicht vollständig prozessiert wird, wie bereits im Zellmodell unter erhöhter IKK ϵ -Expression beobachtet (Abbildung 29), oder dass er wie IRS1 dem proteasomalen Abbau unterliegt (BALASUBRAMANYAM et al., 2005). Einige Untersuchungen deuten auf Änderungen der Expression des Insulinrezeptors hin (BHATTACHARYA et al., 2007; PESSIN et al., 2000). Beobachtet wurde eine verminderte Genexpression des Insulinrezeptors bei Insulinresistenz, die durch FFA (free fatty acids) induziert wurde. In Muskelzellen aktivierte Palmitat PKCepsilon, das als Folge die Transkriptionssinhibierung vom Insulinrezeptor vermittelte (DEY et al., 2007). Sowohl die Reduktion der Transkription, Translation oder Prozessierung sowie eine Degradation resultieren in einer verringerten Proteinmenge des Insulinrezeptors. Da auf Proteinebene in Leber und epiWAT jeweils unter HFD der Insulinrezeptor-Spiegel gesenkt ist, auf mRNA-Ebene im epiWAT keine Unterschiede zu sehen sind, in der Leber jedoch eine erhöhte Expression der Insulinrezeptor-mRNA zu beobachten ist, und unter Betrachtung der Literatur, kann davon ausgegangen werden, dass die Absenkung der Insulinrezeptor-Menge gewebespezifisch reguliert wird.

Davon ausgehend, dass durch andauernde HFD ein Stadium der Insulinresistenz erzeugt wird (TERAUCHI et al., 2007; SVEGLIATI-BARONI et al., 2006), erklärt es sich, dass im Western Blot bei IRS1 und IRS2 ein Shift der Proteinbanden zu sehen ist. Dieser wird durch die erhöhte Phosphorylierung der Insulinrezeptorsubstrate durch Kinasen wie JNK und einem erhöhten TNF α -Spiegel, der die Aktivierung weiterer Kinasen stimuliert, hervorgerufen (AGUIRRE et al., 2000; RUI et al., 2001).

Die IRS1-Expression in der Leber der untersuchten IKK ϵ Knockout- und Wildtypiere ändert sich weder auf Proteinebene noch auf mRNA-Ebene. SHIMOMURA et al. (2000) verglichen die mRNA- und Proteinexpression von Wildtyp- und ob/ob-Mäusen und konnten in der Leber ebenfalls beobachten, dass die mRNA-Menge von IRS1 konstant blieb, IRS2 indes unter HFD deutlich herunterreguliert wurde. Auch in der vorliegenden Arbeit war die IRS2-Expression in der Leber unter HFD sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene erniedrigt. Im epiWAT hingegen ist unter HFD eine geringere Menge an IRS1 nachzuweisen, das Ergebnis des Western Blots deckt sich mit dem der mRNA-Analyse. Die Reduktion der IRS1-Menge im Fettgewebe unter HFD wird mit einer erniedrigten Menge des Transkriptionsfaktors C/EBP α (CCAAT/enhancer binding

protein alpha), der eine wichtige Rolle bei der Adipocytendifferenzierung spielt, in Verbindung gebracht (WU et al., 1999). Aufgrund der hohen Homologie von IRS1 und IRS2 wäre es möglich, dass auch IRS2 durch C/EBP reguliert wird und deswegen seine Expression im Fettgewebe unter HFD ebenfalls reduziert ist (MATSUDA et al., 1997). Auch in der Leber der IKK ϵ Knockout- sowie der Wildtypmäuse ist eine verringerte Menge an IRS2 unter HFD zu beobachten. In ob/ob-Mäusen, die ein Modell für Adipositas-bedingte Insulinresistenz darstellen, wurde bereits eine verminderte Menge an IRS2 beobachtet (KEROUZ et al., 1997; TANIGUCHI et al., 2005). Des Weiteren wird als Grund für die verminderte IRS2-Expression eine chronische Hyperinsulinämie, die bei Insulinresistenz vorliegt, genannt (LINDMARK et al., 2006).

Die Analyse der IKK ϵ Knockout Mäuse sowie der Wildtypmäuse zeigte auf Proteinebene bis auf eine etwas stärkere Expression von IRS2 im epiWAT der Knockout-Tiere keine Unterschiede in der Expression der untersuchten Proteine. Die unter HFD beobachteten Veränderungen in der Proteinexpression werden vollständig durch die in der Literatur beschriebenen Untersuchungen bestätigt.

Die quantitative Analyse der mRNA-Expression mittels TaqMan von Leber und epiWAT soll Expressionsunterschiede zwischen den IKK ϵ Knockout Mäusen und den Wildtyptieren zeigen. Die untersuchten Gene lassen sich in vier Gruppen unterteilen, 1) an der Insulinsignaltransduktion beteiligte Proteine (Insulinrezeptor, IRS1, IRS2, IKK ϵ , IKK β), 2) die Akutphase Serum-Amyloid-A-Proteine (SAA1, SAA2, SAA3), 3) Makrophagenmarker (CD11b, Emr1, CD68) sowie 4) inflammatorische Marker (IL1b, IL10, IL6, Cox2, TNF α). Die Tiere wurden zum Teil vor der Nekropsie mit LPS (Lipopolysaccharid) stimuliert. LPS ist ein Bestandteil von den Bakterienmembranen. Die Gabe von LPS simuliert eine Infektion, bei der es an Septin gebunden von CD14-tragenden Monozyten erkannt wird, die als Antwort vermehrt Zytokine wie TNF α und IL1b freisetzen (RIVEST et al., 2000).

Der IKK ϵ -Knockout hat keinen signifikanten Einfluss auf die RNA-Expression der an der Insulinsignaltransduktion beteiligten Proteine. Lediglich die IRS2-Expression der IKK ϵ Knockout lean Tiere ist im Gegensatz zu den Wildtyptieren erhöht.

Die Expression von IKK ϵ ist unter HFD deutlich erhöht, dies liegt an der Induktion durch inflammatorischen Stimuli wie der TNF α -Expression, die unter HFD ebenfalls

erhöht ist (HEMMI et al., 2004). Eine weitere Verstärkung des Effekts ist nach LPS-Stimulation zu beobachten. Auf die Expression der anderen Proteine dieser Gruppe (Insulinrezeptor, IRS1, IRS2, IKK β) hat die LPS-Stimulation mit einer Ausnahme keine Wirkung. Lediglich die Expression von IRS2 wird in der Leber durch LPS stark induziert. In HepG2-Zellen konnte die basale Aktivität des IRS2-Promotors durch oxidativen Stress verdoppelt werden (UDELHOVEN et al., 2007). Die Leber benötigt nach der durch die LPS-Stimulation simulierten bakteriellen Infektion Energie und Metabolite, um z. B. Akutphaseproteine in hoher Menge bilden zu können. Daher wäre es denkbar, dass die Leber, um dies zu erreichen, mit einer derartigen Erhöhung der IRS2-Menge antwortet, um vermehrt Glukose aufnehmen zu können. Dadurch wird die Aktivierung der Glykogensynthese sowie die Proteinsynthese angeregt (NAKAGAWA et al., 2006).

Die TaqMan-Analyse ergab, dass in der Leber die mRNA Menge von IRS1 bei beiden Diäten etwa gleich bleibt, von IRS2 unter HFD jedoch stark absinkt. SHIMOMURA et al. (2000) verglichen die mRNA- und Proteinexpression in der Leber von Wildtyp- und ob/ob-Mäusen und konnten ebenfalls beobachten, dass die mRNA-Menge von IRS1 etwa gleich blieb, die Expression von IRS2 unter HFD jedoch deutlich reduziert war. Nach 24-stündigem Hungern konnte gezeigt werden, dass die IRS2-mRNA-Expression in Korrelation zum gesunkenen Insulinspiegel stark erhöht ist. Weitere Untersuchungen belegen die These, dass Insulin selbst die IRS2 mRNA-Expression unterdrückt (SHIMOMOURA et al., 2000) Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass die chronische Hyperinsulinämie, die bei Insulinresistenz vorliegt, Auslöser für die verminderte Menge von IRS2 ist (LINDMARK et al., 2006)

Im epiWAT ist die IRS1- sowie

die IRS2-Expression jeweils unter HFD reduziert. In primären Adipocyten, die über 24 Stunden einer erhöhten Insulinkonzentration ausgesetzt waren, wurde die mRNA-Menge von IRS2 deutlich herabgesetzt (RENSTRÖM et al., 2005). Eine verminderte mRNA-Menge von IRS1 und IRS2 konnte in Adipocyten durch die Aktivierung von MAP-Kinasen hervorgerufen werden (FUJISHIRO et al., 2003). Durch die HFD-vermittelte inflammatorische Antwort werden MAP-Kinasen aktiviert (SHEN et al., 2006), die ihrerseits JNK aktivieren, was zur Entstehung der Insulinresistenz beiträgt (KANETO et al., 2006). Neben einer verminderten RNA-Expression ist es auch denkbar, dass die Stabilisierung der mRNA durch pathologische Faktoren, die durch die HFD hervorgerufen werden, beeinträchtigt wird (EHLTING et al., 2007).

Akutphaseproteine werden hauptsächlich von der Leber (VREUGDENHIL et al., 1999) als Antwort auf inflammatorische Stimuli vermehrt ausgeschüttet (UHLAR et al., 1999). Bei Diabetes-Patienten können chronisch erhöhte Akutphaseproteine nachgewiesen werden (Lin et al, 2001). Unter den Akutphaseproteinen sind auch die Serum-Amyloid-A Proteine (SAA) (JUNKER et al. 2006). Sie rekrutieren Immunzellen durch die Freisetzung von diversen Zytokinen, darunter z. B. MCP1 (monocyte chemotactic protein-1) und spielen eine Rolle bei chronisch entzündlichen Krankheiten. Ihre Expression wird von proinflammatorischen Zytokinen (IL1, IL6, TNF α) reguliert (HAGIHARA et al., 2004). Unter akut inflammatorischen Bedingungen (nach LPS-Stimulation) werden sie 1000-fach induziert (ZHANG et al., 2005). Es konnte gezeigt werden, dass auch in Adipocyten die SAA-Proteine bei Adipositas vermehrt exprimiert werden (YANG et al., 2006). Aus diesen Gründen wurden sie im Modell der HFD-induzierten Insulinresistenz und den IKK ϵ Knockout Mäusen untersucht.

In den Knockouttieren ist die Expression der SAA-Proteine im Vergleich zu den Wildtyptieren mit Ausnahme der SAA3-Expression im epiWAT erhöht, besonders stark ist der Effekt im epiWAT bei SAA1 und SAA2. Die Hochregulation von SAA1 und SAA2 im IKK ϵ Knockout spricht dafür, dass IKK ϵ normalerweise SAA1 und SAA2 reprimiert. Die erhöhte Expression von SAA1 und SAA2 korreliert mit der erhöhten Makrophageninfiltration (CD11b, CD68, Emr1). SAA3 scheint aufgrund des anderen Expressionsmusters anders als SAA1 und SAA2 reguliert zu werden.

Bei der Diät-induzierten Insulinresistenz werden vermehrt Makrophagen in das weiße Fettgewebe infiltriert (COENEN et al, 2007). Die Expression von Makrophagenmarkern korreliert mit der Anzahl an infiltrierten Makrophagen. Daher wurden die Makrophagenmarker CD11b, Emr1 (EGF-Like Module-Containing Mucin-Like Receptor 1) und CD68 (KHAZEN et al., 2005; VAN ROYEN et al, 2003; HOLNESS et al., 1993) für diese Untersuchungen ausgewählt. Die Expression der Makrophagenmarker stieg jeweils unter HFD an, besonders hoch ist die Expression im epiWAT. In den IKK ϵ -Knockout-Tieren ist die Expression jeweils etwas höher als in den Wildtyp-Tieren. Der Anstieg der Expression der Makrophagenmarker im IKK ϵ -Knockout spricht für eine antiinflammatorische Rolle von IKK ϵ . Die LPS-Stimulation erhöht die Expression der Makrophagenmarker nicht. Der Grund dafür liegt wahrscheinlich an der relativ kurzen Stimulation mit LPS von nur einer Stunde. Diese Dauer reicht für eine Infiltration von Makrophagen nicht aus, im Gegensatz dazu steigen die Zytokine sehr stark an, was zeigt, dass die Stimulation mit LPS erfolgreich war (ZHOU et al., 2004).

Weiterhin wurde die Expression verschiedener Zytokine gemessen, wobei IL 10 antiinflammatorisch, IL1b, IL6, Cox2 (Cyclooxygenase 2), CD40 und TNF α proinflammatorisch wirken (DEN BOER et al, 2006; JAGER et al, 2007; CAO et al., 2007). IL1b und IL6 wirken als Chemoattraktant und stimulieren die Synthese von Akutphaseproteinen (HADDAD, 2002; FASSHAUER et al., 2004). IL10 vermindert die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen in T-Zellen und Monozyten (WILLEMS et al., 1994). CD40 ist ein Mitglied der TNF-Rezeptor Familie (LUTGENS et al., 2007). Cox2 spielt eine Rolle bei der Dysregulation der Inflammation und der Entstehung von Krebs (SIMMONS et al., 2004). Die Expression der Zytokine ist wie erwartet unter HFD jeweils erhöht (TAKAHASHI et al., 2003). Ohne LPS-Stimulation liegt die Expression zum Teil an der Nachweisgrenze, insbesondere bei IL6 und Cox2. Die LPS-Stimulation führt erwartungsgemäß zu einem extremen Anstieg der Zytokinexpression (CHIBA et al., 2007). Besonders im Fettgewebe, in denen die meisten Zytokine freigesetzt werden, ist in den Knockouttieren ist die Expression der Zytokine nach LPS-Stimulation höher als im Wildtyp, diese Daten deuten wie schon die Expressionsdaten der Akutphaseproteine auf die antiinflammatorische Rolle von IKK ϵ hin.

Die mRNA-Expressionsdaten deuten sowohl in der Gruppe der untersuchten Akutphaseproteine als auch der Makrophagenmarker auf eine antiinflammatorische Rolle vom IKK ϵ hin. Da die Expression der Zytokine im IKK ϵ -Knockout nicht reduziert war, ist eine signifikante inflammatorische Rolle von IKK ϵ weitestgehend auszuschließen.

Die Phosphorylierung von IKK β (inhibitorischer Kinase Komplex beta) führt zur Ubiquitinylierung der Inhibitoren von NF κ B (I κ B) und damit zur Aktivierung von NF κ B (TANAKA et al., 2005). Da IKK ϵ und IKK β eine hohe Homologie aufweisen (HUYNH et al., 2002; SHIMADA et al., 1999), sollte untersucht werden, ob auch IKK ϵ den NF κ B-Komplex inhibiert, und ob es demnach Unterschiede in der NF κ B-Aktivierung zwischen den Wildtyptieren und den IKK ϵ Knockoutmäusen gibt. Die NF κ B-Aktivitätsmessung zeigte keine Änderung in der Aktivierung des NF κ B-Komplexes zwischen den Wildtypmäusen und den IKK ϵ -Knockout-Tieren. Eine Aktivierung von NF κ B durch IKK ϵ scheint nicht stattzufinden.

Dieses Ergebnis unterstützt die Schlüsse, die aus dem RNA-Expressionsdaten gezogen wurden. Die erhöhte Expression der Akutphaseproteine sowie der Zytokine im IKK ϵ -Knockout deuten darauf hin, dass IKK ϵ eine antiinflammatorische Rolle spielt. IKK ϵ wird zwar auch wie IKK β durch TNF α aktiviert (CARCAMO et al., 2002; KRAVCHENKO

et al., 2003), dies führt jedoch nicht zur Weiterleitung des inflammatorischen Stimulus, vielmehr scheint IKK ϵ ein Gegenspieler der Entzündungsreaktion zu sein.

4.3 *Schlussfolgerung und Ausblick*

In der vorliegenden Arbeit wurde 1.) die Interaktion von IKK ϵ mit dem Insulinrezeptor und seinen Substraten *in vitro* und 2.) der Einfluss von IKK ϵ auf die Entstehung der Insulinresistenz *in vivo* untersucht.

Bei den *in vitro*-Untersuchungen konnte eine direkte Phosphorylierung der Insulinrezeptorsubstrate durch IKK ϵ nachgewiesen werden. Die TNF α -vermittelte Induktion der IKK ϵ -Expression in FAO-Zellen resultierte in einer erniedrigten Proteinexpression von IRS1 sowie der verminderten Tyrosin-Phosphorylierung der Insulinrezeptorsubstrate. Die transiente Expression von IKK ϵ in HEK293rapid-Zellen hat zu einer verringerten Insulinrezeptor-Prozessierung sowie einer Größenverschiebung der Proteinbanden von IRS1 und IRS1, die auf IKK ϵ -vermittelten Phosphorylierungen beruht, zur Folge. Die Serin-Phosphorylierung der IRS-Proteine durch I κ B-Kinasen wird als möglicher Mechanismus angesehen, durch den inflammatorische Signalwege zur Entstehung der Insulinresistenz beitragen (GAO et al., 2002) *In vivo* konnte unter HFD eine erhöhte IKK ϵ -Expression beobachtet werden. Der Anstieg der Expression korreliert mit einer signifikanten Erhöhung inflammatorischer Marker. Bei Fütterungsexperimenten mit IKK ϵ -Knockout-Mäusen wurde eine antiinflammatorische Rolle von IKK ϵ festgestellt. Im Zusammenhang mit der Entstehung der Insulinresistenz scheint IKK ϵ eher eine untergeordnete Rolle zu spielen. Neuere Untersuchungen beschäftigen sich mit der Aktivierung von IKK ϵ im Zuge einer inflammatorischen Antwort insbesondere nach viralen Infektionen. IKK ϵ reguliert die Transkription antiviraler Gene (SWEENEY et al., 2005). Dabei phosphoryliert IKK ϵ den Transkriptionsfaktor IRF3 (IFN regulatory factor 3), der die Produktion von INF β (Interferon beta) induziert (SWEENEY et al., 2007). Virale Infektionen sind potentielle Auslöser des Diabetes Typ 1 (VAN DER WERF et al., 2007). Dazu zählen unter anderem Viren, die Kinderkrankheiten wie Röteln, Mumps und Masern verursachen, sowie Hepatitis- und Polioviren und die Erreger der sog. Sommergrippe (HYOTY et al., 2002; JUN et al., 2003). Diese Daten stellen möglicherweise einen Zusammenhang zwischen IKK ϵ und der INF β -vermittelten Entstehung des Diabetes Typ 1 dar (PELEGRIN et al., 1998).

5 Zusammenfassung

Für die Entstehung der Insulinresistenz werden unter anderem stressaktivierte Kinasen des NF κ B-Signalweges wie z. B. IKK β verantwortlich gemacht. Eine mit IKK β eng verwandte Ser/Thr-Kinase ist IKK ϵ , die potentiell die Insulinsignalkette beeinflussen könnte. Um dies zu untersuchen, wurden *in vitro*-Versuche zur Interaktion zwischen IKK ϵ und dem Insulinrezeptor sowie den Insulinrezeptorsubstraten (IRS) durchgeführt. Sowohl bei IRS1 als auch bei IRS2 konnte eine direkte Phosphorylierung durch IKK ϵ nachgewiesen werden. Die Aktivität der IRS wird durch Phosphorylierungen reguliert, wobei die negative Regulation insbesondere durch Ser/Thr-Phosphorylierungen gesteuert wird. Dies legt den Schluss nahe, dass auch IKK ϵ an der Entstehung der Insulinresistenz teilhaben könnte. Die transiente Expression von IKK ϵ führt ebenfalls zur Phosphorylierung der Insulinrezeptorsubstrate in insulinsensitiven Zelllinien. Die IKK ϵ -vermittelte Phosphorylierung von IRS beeinflusste jedoch nicht die Insulin-abhängige Signaltransduktion in diesen Zellen. Zur Charakterisierung der Funktion von IKK ϵ *in vivo* wurde zunächst die Expression von IKK ϵ in murinen Geweben mit und ohne Insulinresistenz untersucht. Dazu wurden Fütterungsexperimente mit C57/Bl6-Mäusen durchgeführt, die eine normal- und Insulinresistenz-induzierende, hochkalorische Diät (HFD) erhalten haben. In diesem Tiermodell konnte unter HFD eine erhöhte IKK ϵ -Expression beobachtet werden. Der Anstieg der Expression korrelierte mit einer deutlichen Erhöhung inflammatorischer Marker. Um den Einfluss von IKK ϵ auf die Insulinsignaltransduktion und das Entstehen der Insulinresistenz zu analysieren, wurden diese Fütterungsstudien mit IKK ϵ -Knockout-Mäuse wiederholt. Für eine kurzzeitige Aktivierung des NF κ B-Signalweges wurde jeweils eine Vergleichsgruppe zusätzlich mit Lipopolysacchariden (LPS) stimuliert. Anschließend wurde die mRNA-Expression von Genen, die an der Insulinsignaltransduktion beteiligt sind, sowie von verschiedenen Makrophagenmarkern und Zytokinen quantitativ untersucht und mit parallel untersuchten Wildtyp-Tieren verglichen. Bei diesen Experimenten wurde eine antiinflammatorische Rolle von IKK ϵ festgestellt. Im Zusammenhang mit der Entstehung der Insulinresistenz scheint IKK ϵ eher eine untergeordnete Rolle zu spielen, wobei auch die LPS-Gabe keinen Einfluss auf die Expression von Markern des Insulinsignalweges hatte. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit korrelieren mit neueren Untersuchungen, in denen die Aktivierung von IKK ϵ im Zuge einer inflammatorischen Antwort insbesondere nach viralen Infektionen beschrieben wird. Dabei induziert IKK ϵ die Produktion von IFN β , was möglicherweise auf einen Zusammenhang zwischen IKK ϵ und der IFN β -vermittelten Entstehung des Diabetes mellitus Typ 1 deutet.

6 Literaturverzeichnis

- ADLI M, BALDWIN AS. (2006) IKK-i/IKKepsilon controls constitutive, cancer cell-associated NF-kappaB activity via regulation of Ser-536 p65/RelA phosphorylation. *J Biol Chem.* 281(37), 26976-26984
- AGUIRRE V, UCHIDA T, YENUSH L, DAVIS R, WHITE MF. (200) The c-Jun NH₂-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser³⁰⁷. *J Biol Chem.* 275(12), 9047-9054
- AGUIRRE V, WERNER ED, GIRAUD J, LEE YH, SHOELSON SE, WHITE MF. (2002) Phosphorylation of Ser³⁰⁷ in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *Biol Chem.* 277(2), 1531-1537
- ALESSI DR, DOWNES CP. (1999) The role of PI 3-kinase in insulin action. *Biochim Biophys Acta.* 1436(1-2), 151-164
- ALESSI DR, JAMES SR, DOWNES CP, HOLMES AB, GAFFNEY PR, REESE CB, COHEN P. (1997) Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B. *Curr Biol.* 7(4), 261-269
- AMBERG DC, BOTSTEIN D, BEASLEY EM (1995) Precise gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae* by double fusion polymerase chain reaction. *Yeast* 11, 1275-1280
- ARKAN MC, HEVENER AL, GRETEN FR, MAEDA S, LI ZW, LONG JM, WYNSHAW-BORIS A, POLI G, OLEFSKY J, KARIN M. (2005) IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med.* 11(2), 191-198
- AUPPERLE, KR, YAMANISHI Y, BENNETT BL, MERCURIO F, BOYLE DL, FIRESTEIN GS. (2001) Expression and regulation of inducible IkappaB kinase (IKK-i) in human fibroblast-like synoviocytes. *Cell Immunol.* 214(1), 54-59
- AVRUCH, J. (1998) Insulin signal transduction through protein kinase cascades. *Mol Cell Biochem.* 182(1-2), 31-48
- BHATTACHARYA S, DEY D, ROY SS. (2007) Molecular mechanism of insulin resistance. *J Biosci.* 32(2), 405-413
- BALASUBRAMANYAM M, SAMPATHKUMAR R, MOHAN V. (2005) Is insulin signaling molecules misguided in diabetes for ubiquitin-proteasome mediated degradation? *Mol Cell Biochem.* 275(1-2), 117-125
- BALTENSPERGER, K., KOZMA, L.M., JASPERS, S.R., CZECH, M.P. (1994) Regulation by insulin of phosphatidylinositol 3'-kinase bound to alpha- and beta-isoforms of p85 regulatory subunit. *J Biol Chem.* 269(46), 28937-28946

- BASHAN N, DORFMAN K, TARNOVSKI T, HARMAN-BOEHM I, LIBERTY IF, BLUHER M, OVADIA S, MAYMON-ZILBERSTEIN T, POTASHNIK R, STUMVOLL M, AVINOACH E, RUDICH A. (2007) MAP kinases, IKK and insulin signaling in human omental versus subcutaneous adipose tissue in obesity. *Endocrinology* 148(6), 2955-2962
- BAUD V., KARIN M. (2001) Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives, *Trends Cell Biol.* 11(9), 372-377
- BIBEAU-POIRIER A., GRAVEL S. P., CLEMENT J. F., ROLLAND S., RODIER G., COULOMBE P., HISCOTT J., GRANDVAUX N, MELOCHE S, SERVANT MJ. (2006) Involvement of the I κ B kinase (IKK)-related kinases tank-binding kinase 1/IKKi and cullin-based ubiquitin ligases in IFN regulatory factor-3 degradation. *J Immunol.* 177(8), 5059-5067
- BHATTACHARYA S, DEY D, ROY SS. (2007) Molecular mechanism of insulin resistance. *J Biosci.* 32(2), 405-413
- BOYCE M, BRYANT KF, JOUSSE C, LONG K, HARDING HP, SCHEUNER D, KAUFMAN RJ, MA D, COEN DM, RON D, YUAN J. (2005) A selective inhibitor of eIF2 α dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science.* 307(5711), 935-939
- BRIVANLOU AH, DARNELL JE JR. (2002) Signal transduction and the control of gene expression. *Science* 295(5556), 81381-81388
- CAI D, DHE-PAGANON S, MELENDEZ PA, LEE J, SHOELSON SE. (2003) Two new substrates in insulin signaling, IRS5/DOK4 and IRS6/DOK5. *J Biol Chem.* 278(28), 25323-25330
- CAI D, YUAN M, FRANTZ DF, MELENDEZ PA, HANSEN L, LEE J, SHOELSON SE. (2005) Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med.* 11(2), 183-190
- CAO H, KELLY MA, KARI F, DAWSON HD, URBAN JF JR, COVES S, ROUSSEL AM, ANDERSON RA. (2007) Green tea increases anti-inflammatory tristetraprolin and decreases pro-inflammatory tumor necrosis factor mRNA levels in rats. *J Inflamm (Lond).* 4, 1
- CARCAMO JM, PEDRAZA A, BORQUEZ-OJEDA O, GOLDE DW. (2002) Vitamin C suppresses TNF alpha-induced NF kappa B activation by inhibiting I kappa B alpha phosphorylation. *Biochemistry.* 41(43), 12995-13002
- CHARIOT, A, LEONARDI A, MULLER J, BONIF M, BROWN K, SIEBENLIST U. (2002) Association of the adaptor TANK with the I kappa B kinase (IKK) regulator NEMO connects IKK complexes with IKK epsilon and TBK1 kinases. 2002 *J Biol Chem.* 277(40), 37029-37036
- CHEN LW, EGAN L, LI ZW, GRETEN FR, KAGNOFF MF, KARIN M. (2003) The two faces of IKK and NF-kappaB inhibition: prevention of systemic inflammation but increased local injury following intestinal ischemia-reperfusion. *Nat Med.* 9(5), 575-581

- CHIBA N, MASUDA A, YOSHIKAI Y, MATSUGUCHI T. (2007) Ceramide inhibits LPS-induced production of IL-5, IL-10, and IL-13 from mast cells. *J Cell Physiol.* [Epub ahead of print]
- CIECHANOVER A. (1994) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell.* 79(1), 13-21
- CLAMPIT, J.E., MEUTH, J.L., SMITH, H.T., REILLY, R.M., JIROUSEK, M.R., TREVILLYAN, J.M., RONDINONE, C.M. (2003) Reduction of protein-tyrosine phosphatase-1B increases insulin signaling in FAO hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 300(2), 261-267
- COENEN KR, GRUEN ML, CHAIT A, HASTY AH. (2007) Diet-induced increases in adiposity, but not plasma lipids, promote macrophage infiltration into white adipose tissue. *Diabetes.* 56(3), 564-573
- COPELAND GP, LEINSTER SJ, DAVIS JC, HIPKIN LJ. (1987) Insulin resistance in patients with colorectal cancer. *Br J Surg.* 74(11), 1031-1035
- DAHLE MK, MYHRE AE, AASEN AO, WANG JE. (2005) Effects of forskolin on Kupffer cell production of interleukin-10 and tumor necrosis factor alpha differ from those of endogenous adenylyl cyclase activators: possible role for adenylyl cyclase 9. *Infect Immun.* 73(11), 7290729-6
- DE MEYTS P. (2004) Insulin and its receptor: structure, function and evolution. *Bioessays.* 26(12), 1351-1362
- DEN BOER MA, VOSHOL PJ, SCHRODER-VAN DER ELST JP, KORSHENINNIKOVA E, OUWENS DM, KUIPERS F, HAVEKES LM, ROMIJN JA. (2006) Endogenous interleukin-10 protects against hepatic steatosis but does not improve insulin sensitivity during high-fat feeding in mice. *Endocrinology* 147(10), 4553-4558
- DENEKA M, NEEFT M, VAN DER SLUIJS P. (2003) Regulation of membrane transport by rab GTPases. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 38(2), 121-142
- DEY D, BHATTACHARYA A, ROY S, BHATTACHARYA S. (2007) Fatty acid represses insulin receptor gene expression by impairing HMGA1 through protein kinase Cepsilon. *Biochem Biophys Res Commun.* 357(2), 474-479
- EHLTING C, LAI WS, SCHAPER F, BRENNENDORFER ED, MATTHES RJ, HEINRICH PC, LUDWIG S, BLACKSHEAR PJ, GAESTEL M, HAUSSINGER D, BODE JG. (2007) Regulation of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) mRNA stability by TNF-alpha involves activation of the MKK6/p38MAPK/MK2 cascade. *J Immunol.* 178(5), 2813-2826
- EHRHARDT C, KARDINAL C, WURZER WJ, WOLFF T, VON EICHEL-STREIBER C, PLESCHKA S, PLANZ O, LUDWIG S. (2004) Rac1 and PAK1 are upstream of IKK-epsilon and TBK-1 in the viral activation of interferon regulatory factor-3. *FEBS Lett.* 567(2-3), 230-238

- ELSAMMAK M, REFAI W, ELSAWAF A, ABDEL-FATTAH I, ABD ELATTI E, GHAZAL A. (2005) Elevated serum tumor necrosis factor alpha and ferritin may contribute to the insulin resistance found in HCV positive Egyptian patients. *Curr Med Res Opin.* 21(4), 527-534
- FASSHAUER M, KLEIN J, KRALISCH S, KLIER M, LOSSNER U, BLUHER M, PASCHKE R. (2004) Serum amyloid A3 expression is stimulated by dexamethasone and interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes. *J Endocrinol.* 183(3), 561-567
- FITZGERALD KA, MCWHIRTER SM, FAIA KL, ROWE DC, LATZ E, GOLENBOCK DT, COYLE AJ, LIAO SM, MANIATIS T. (2003) IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol.* 4(5), 491-496
- FRIEDMAN JE, ISHIZUKA T, LIU S, FARRELL CJ, BEDOL D, KOLETSKY RJ, KAUNG HL, ERNSBERGER P. (1997) Reduced insulin receptor signaling in the obese spontaneously hypertensive Koletsky rat. *Am J Physiol.* 273(5 Pt 1), E1014-1023
- FRUMAN DA, MEYERS RE, CANTLEY LC. (1998) Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem.* 67, 481-507
- FUJISHIRO M, GOTOH Y, KATAGIRI H, SAKODA H, OGIHARA T, ANAI M, ONISHI Y, ONO H, ABE M, SHOJIMA N, FUKUSHIMA Y, KIKUCHI M, OKA Y, ASANO T. (2003) Three mitogen-activated protein kinases inhibit insulin signaling by different mechanisms in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol.* 17(3), 487-497
- FURUKAWA S, FUJITA T, SHIMABUKURO M, IWAKI M, YAMADA Y, NAKAJIMA Y, NAKAYAMA O, MAKISHIMA M, MATSUDA M, SHIMOMURA I. (2004) Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 114(12), 1752-1761
- GAO Z, HWANG D, BATAILLE F, LEFEVRE M, YORK D, QUON MJ, YE J. (2002) Serine phosphorylation of Insulin receptor substrate 1 by inhibitor kappa B kinase complex, *J Biol Chem.* 277(50), 48115-48121
- GHOSH S, MAY MJ, KOPP EB. (1998) NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 16, 225-260
- GIANNELLI G, BERGAMINI C, MARINOSCI F, FRANSVEA E, NAPOLI N, MAUREL P, DENTICO P, ANTONACI S. (2006) Antifibrogenic effect of IFN-alpha2b on hepatic stellate cell activation by human hepatocytes. *J Interferon cytokine Res.* 26(5), 301-308
- GOLDFINE ID. (1987) The insulin receptor: molecular biology and transmembrane signaling. *Endocr Rev.* 8(3), 235-255
- GOOD LF, MAGGIRWAR SB, KEALIHAR A, UHLIK M, SUN SC. (1996) Multiple structural domains within I kappa B alpha are required for its inducible degradation by both cytokines and phosphatase inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun.* 223(1), 123-128

- GOODYEAR LJ, GIORGINO F, SHERMAN LA, CAREY J, SMITH RJ, DOHM GL. (1995) Insulin receptor phosphorylation, insulin receptor substrate-1 phosphorylation, and phosphatidylinositol 3-kinase activity are decreased in intact skeletal muscle strips from obese subjects. *J Clin Invest.* 95(5), 2195-2120
- GOREN HJ, WHITE MF, KAHN CR. (1987) Separate domains of the insulin receptor contain sites of autophosphorylation and tyrosine kinase activity. *Biochemistry.* 26(8), 2374-2382
- GREENBERG AS, OBIN MS.(2006) Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. *Am J Clin Nutr.* 83(2), 461S-465S
- HADDAD JJ. (2002) Redox regulation of pro-inflammatory cytokines and IkappaB-alpha/NF-kappaB nuclear translocation and activation. *Biochem Biophys Res Commun.* 296(4), 847-856
- HAGIHARA K, NISHIKAWA T, ISOBE T, SONG J, SUGAMATA Y, YOSHIZAKI K. (2004) IL-6 plays a critical role in the synergistic induction of human serum amyloid A (SAA) gene when stimulated with proinflammatory cytokines as analyzed with an SAA isoform real-time quantitative RT-PCR assay system. *Biochem Biophys Res Commun.* 314(2), 363-369
- HEMMI H, TAKEUCHI O, SATO S, YAMAMOTO M, KAISHO T, SANJO H, KAWAI T, HOSHINO K, TAKEDA K, AKIRA S. (2004) The roles of two IkappaB kinase-related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection. *J Exp Med.* 199(12), 1641-1650
- HERS I, TAVARE JM. (2005) Mechanism of feedback regulation of insulin receptor substrate-1 phosphorylation in primary adipocytes. *Biochem J.* 388(Pt 2), 713-720
- HERSCHKOVITZ A, LIU YF, ILAN E, RONEN D, BOURA-HALFON S, ZICK Y. (2007) Common inhibitory serine sites phosphorylated by IRS-1 kinases, triggered by insulin and inducers of insulin resistance. *J Biol Chem.* [Epub ahead of print]
- HIROSUMI J, TUNCMAN G, CHANG L, GORGUN CZ, UYSAL KT, MAEDA K, KARIN M, HOTAMISLIGIL GS. (2002) A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature.* 420(6913), 333-336
- HO SN, HUNT HD, HORTON RM, PULLEN JK. (1998) Pease LR.Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene.* 77(1), 51-59
- HOLNESS CL, SIMMONS DL. (1993) Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood.* 81(6),1607-1613
- HOTAMISLIGIL GS, SHARGILL NS, SPIEGELMAN BM. (1993) Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259(5091), 87-91
- HOTAMISLIGIL GS, SPIEGELMAN BM. (1994) Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes.* 43(11), 1271-1278

- HOTAMISLIGIL GS, PERALDI P, BUDAVARI A, ELLIS R, WHITE MF, SPIEGELMAN BM. (1996) IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science*. 271(5249), 665-668
- HUBBARD SR, WEI L, ELLIS L, HENDRICKSON WA. (1994) Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor. *Nature*. 372(6508), 746-754
- HUYNH QK, KISHORE N, MATHIALAGAN S, DONNELLY AM, TRIPP CS. (2002) Kinetic Mechanisms of I κ B-related Kinases (IKK) inducible IKK and TBK-1 differ from IKK-1/IKK-2 heterodimer. *J Biol Chem*. 277(15), 12550-12558
- HYOTY H, TAYLOR KW. (2002) The role of viruses in human diabetes. *Diabetologia*. 45(10), 1353-1361
- INDUKURI, H., CASTRO, S. M., LIAO, S., FEENEY, L. A., DORSCH, M., COYLE, A. J. (2006) IKKepsilon regulates viral-induced interferon regulatory factor-3 activation via a redox-sensitive pathway. *Virology*. 353(1), 155-165
- JACOBS S, CUATRECASAS P. (1981) Insulin receptor: structure and function. *Endocr Rev*. 2(3), 251-263
- JIANG, G., ZHANG, B.B. (2002) Pi 3-kinase and its up- and down-stream modulators as potential targets for the treatment of type II diabetes. *Front Biosci*. 7, 903-907
- JAGER J, GREMEAUX T, CORMONT M, LE MARCHAND-BRUSTEL Y, TANTI JF. (2007) Interleukin-1beta-induced insulin resistance in adipocytes through downregulation of insulin receptor substrate-1 expression. *Endocrinology*. 148(1), 241-251
- JUN HS, YOON JW. (2003) A new look at viruses in type 1 diabetes. *Diabetes Metab. Res. Rev*. 19,8
- JUNKER K, VON EGGELING F, MULLER J, STEINER T, SCHUBERT J. (2006) Identification of biomarkers and therapeutic targets for renal cell cancer using ProteinChip technology. *Urologe A*. 45(3), 305-306, 308, 310-312 passim
- KAMON J, YAMAUCHI T, MUTO S, TAKEKAWA S, ITO Y, HADA Y, OGAWA W, ITAI A, KASUGA M, TOBE K, KADOWAKI T. (2004) A novel IKK β inhibitor stimulates adiponectin levels and ameliorates obesity-linked insulin resistance. *Biochem Biophys Res Commun*. 323(1), 242-248
- KANDA H, TATEYA S, TAMORI Y, KOTANI K, HIASA K, KITAZAWA R, KITAZAWA S, MIYACHI H, MAEDA S, EGASHIRA K, KASUGA M. (2006) MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest*. 116(6), 1494-1505
- KANE S, SANO H, LIU SC, ASARA JM, LANE WS, GARNER CC, LIENHARD GE. (2002) A method to identify serine kinase substrates. Akt phosphorylates a novel adipocyte protein with a Rab GTPase-activating protein (GAP) domain. *J Biol Chem*. 277(25), 22115-22118

- KANETO H, MATSUOKA TA, NAKATANI Y, KAWAMORI D, MIYATSUKA T, MATSUHISA M, YAMASAKI Y. (2005) Oxidative stress, ER stress, and the JNK pathway in type 2 diabetes, *J Mol Med.* 83(6), 429-439
- KANETO H, NAKATANI Y, KAWAMORI D, MIYATSUKA T, MATSUOKA TA, MATSUHISA M, YAMASAKI Y. (2006) Role of oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and c-Jun N-terminal kinase in pancreatic beta-cell dysfunction and insulin resistance. *Int J Biochem Cell Biol.* 38(5-6), 782-793
- KANETY H, FEINSTEIN R, PAPA MZ, HEMI R, KARASIK A. (1995) Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1). Possible mechanism for suppression of insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1. *J Biol Chem.* 270(40), 23780-23784
- KANZAKI M. (2006) Insulin receptor signals regulating GLUT4 translocation and actin dynamics. *Endocr J.* 53(3), 267-293
- KARIN M, BEN-NERIAH Y (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol.* 18, 621-663
- KARIN M, YAMAMOTO Y, WANG QM (2004) The IKK NF κ B system: a treasure trove for drug development. *Nat Rev Drug Discov.* 3(1), 17-26
- KARYLOWSKI O, ZEIGERER A, COHEN A, MCGRAW TE. (2004) GLUT4 is retained by an intracellular cycle of vesicle formation and fusion with endosomes. *Mol Biol Cell.* 15(2), 870-882
- KAWAGUCHI T, YOSHIDA T, HARADA M, HISAMOTO T, NAGAO Y, IDE T, TANIGUCHI E, KUMEMURA H, HANADA S, MAEYAMA M, BABA S, KOGA H, KUMASHIRO R, UENO T, OGATA H, YOSHIMURA A, SATA M. (2004) Hepatitis C virus down-regulates insulin receptor substrates 1 and 2 through up-regulation of suppressor of cytokine signaling 3. *Am J Pathol.* 165(5), 1499-1508
- KELLERER M, KOCH M, METZINGER E, MUSHACK J, CAPP E, HARING HU. (1997) Leptin activates PI-3 kinase in C2C12 myotubes via janus kinase-2 (JAK-2) and insulin receptor substrate-2 (IRS-2) dependent pathways. *Diabetologia.* 40(11), 1358-1362
- KELLERER M, LAMMERS R, FRITSCH E, STRACK V, MACHICAO F, BORBONI P, ULLRICH A, HARING HU. (2001) Insulin inhibits leptin receptor signalling in HEK293 cells at the level of janus kinase-2: a potential mechanism for hyperinsulinaemia-associated leptin resistance. *Diabetologia.* 44(9):1125-32
- KEROUZ NJ, HORSCH D, PONS S, KAHN CR. (1997) Differential regulation of insulin receptor substrates-1 and -2 (IRS-1 and IRS-2) and phosphatidylinositol 3-kinase isoforms in liver and muscle of the obese diabetic (ob/ob) mouse. *J Clin Invest.* 100(12), 3164-3172
- KHAN AH, PESSIN JE. (2002) Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways. *Diabetologia.* 45(11), 1475-1483

- KHAZEN W, M'BIKA JP, TOMKIEWICZ C, BENELLI C, CHANY C, ACHOUR A, FOREST C. (2005) Expression of macrophage-selective markers in human and rodent adipocytes. *FEBS Lett.* 579(25), 5631-5634
- KIM SK, NOVAK RF. (2007) The role of intracellular signaling in insulin-mediated regulation of drug metabolizing enzyme gene and protein expression. *Pharmacol Ther.* 113(1):88-120
- KISHORE N, HUYNH QK, MATHIALAGAN S, HALL T, ROUW S, CREELY D, LANGE G, CAROLL J, REITZ B, DONNELLY A, BODDUPALLI H, COMBS RG, KRETZMER K, TRIPP CS. (2002) IKK-I and TBK-1 are enzymatically distinct from the homologous enzyme IKK-2, *J Biol Chem.* 277(16), 13840-13847
- KOBAYASHI T, MATSUMOTO T, KAMATA K. (2005) The PI3-K/Akt pathway: roles related to alterations in vasomotor responses in diabetic models. *J Smooth Muscle Res.* 41(6), 283-302
- KOHN AD, KOVACINA KS, ROTH RA. (1995) Insulin stimulates the kinase activity of RAC-PK, a pleckstrin homology domain containing ser/thr kinase. *EMBO J.* 14(17), 4288-4295
- KRAVCHENKO VV, MATHISON JC, SCHWAMBORN K, MERCURIO F, ULEVITCH RJ. (2003) IKKi/IKK ϵ plays a key role in integrating signals induced by pro-inflammatory stimuli. *J Biol Chem.* 278(29), 26612-26619
- KURUCZ I, MORVA A, VAAG A, ERIKSSON KF, HUANG X, GROOP L, KORANYI L. (2002) Decreased expression of heat shock protein 72 in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes correlates with insulin resistance. *Diabetes.* 51(4), 1102-1109
- LAWLOR MA, MORA A, ASHBY PR, WILLIAMS MR, MURRAY-TAIT V, MALONE L, PRESCOTT AR, LUCOCQ JM, ALESSI DR. (2002) Essential role of PDK1 in regulating cell size and development in mice. *EMBO J.* 21(14), 3728-3738
- LEE YH, WHITE MF. (2004) Insulin receptor substrate proteins and diabetes. *Arch Pharm Res.* 27(4), 361-370
- LI J, DEFEA K, ROTH RA. (1999) Modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation by an Akt/phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Biol Chem.* 274(14), 9351-9356
- LIN Y, RAJALA MW, BERGER JP, MOLLER DE, BARZILAI N, SCHERER PE. (2001) Hyperglycemia-induced production of acute phase reactants in adipose tissue. *J Biol Chem.* 276(45), 42077-42083
- LIETZKE SE, BOSE S, CRONIN T, KLARLUND J, CHAWLA A, CZECH MP, LAMBRIGHT DG. (2000) Structural basis of 3-phosphoinositide recognition by pleckstrin homology domains. *Mol Cell.* 6(2), 385-394
- LINDMARK S, BUREN J, ERIKSSON JW. (2006) Insulin resistance, endocrine function and adipokines in type 2 diabetes patients at different glycaemic levels: potential impact for glucotoxicity in vivo. *Clin Endocrinol (Oxf).* 65(3), 301-309

- LIPSON KL, FONSECA SG, URANO F. (2006) Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and auto-immunity in diabetes. *Curr Mol Med.* 6(1), 71-77
- LIU YF, PAZ K, HERSCHKOVITZ A, ALT A, TENNENBAUM T, SAMPSON SR, OHBA M, KUROKI T, LEROITH D, ZICK Y. (2001) Insulin stimulates PKCzeta -mediated phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1). A self-attenuated mechanism to negatively regulate the function of IRS proteins. *J Biol Chem.* 276(17), 14459-14465
- LOUIS N, EVELEGH C, GRAHAM FL. (1997) Cloning and sequencing of the cellular-viral junctions from the human adenovirus type 5 transformed 293 cell line. *Virology.* 233(2), 423-429
- LUMENG CN, DEYOUNG SM, SALTIEL AR. (2007) Macrophages block insulin action in adipocytes by altering expression of signaling and glucose transport proteins. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 292(1), E166-174
- LUTGENS E, LIEVENS D, BECKERS L, DONNERS M, DAEMEN M. (2007) CD40 and Its Ligand in Atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med.* 17(4), 118-123
- MAGGI D, BARBETTI F, CORDERA R. (1999) Role of proline 193 in the insulin receptor post-translational processing. *Diabetologia.* 42(4), 435-442
- MALONEY A, WORKMAN P. (2002) HSP90 as a new therapeutic target for cancer therapy: the story unfolds. *Expert Opin Biol Ther.* 2(1), 3-24
- MARANO MA, MOLDAWER LL, FONG Y, WEI H, MINEI J, YURT R, CERAMI A, LOWRY SF. (1988) Cachectin/TNF production in experimental burns and Pseudomonas infection. *Arch Surg.* 123(11), 1383-1388
- MARTIN OJ, LEE A, MCGRAW TE. (2006) GLUT4 distribution between the plasma membrane and the intracellular compartments is maintained by an insulin-modulated bipartite dynamic mechanism. *J Biol Chem.* 281(1), 484-490
- MATSUDA K, ARAKI E, YOSHIMURA R, TSURUZOE K, FURUKAWA N, KANEKO K, MOTOSHIMA H, YOSHIZATO K, KISHIKAWA H, SHICHIRI M. (1997) Cell-specific regulation of IRS-1 gene expression: role of E box and C/EBP binding site in HepG2 cells and CHO cells. *Diabetes.* 46(3), 354-362
- MEUNIER-DURMORT C, FERRY N, HAINQUE B, DELATTRE J, FOREST C. (1996) Efficient transfer of regulated genes in adipocytes and hepatoma cells by the combination of liposomes and replication-deficient adenovirus. *Eur J Biochem.* 237(3), 660-667
- MIINEA CP, SANO H, KANE S, SANO E, FUKUDA M, PERANEN J, LANE WS, LIENHARD GE. (2005) AS160, the Akt substrate regulating GLUT4 translocation, has a functional Rab GTPase-activating protein domain. *Biochem J.* 391(Pt 1), 87-93
- MIJATOVIC T, KRUYTS V, CAPUT D, DEFRANCE P, HUEZ G. (1997) Interleukin-4 and -13 inhibit tumor necrosis factor-alpha mRNA translational activation in lipopolysaccharide-induced mouse macrophages *J Biol Chem.* 1997 May 30;272(22):14394-8

- MIURA T, SUZUKI W, ISHIHARA E, ARAI I, ISHIDA H, SEINO Y, TANIGAWA K. (2001) Impairment of insulin-stimulated GLUT4 translocation in skeletal muscle and adipose tissue in the Tsumura Suzuki obese diabetic mouse: a new genetic animal model of type 2 diabetes. *Eur J Endocrinol.* 145(6), 785-790
- MOTHE I, VAN OBBERGHEN E. (1996) Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on multiple serine residues, 612, 632, 662, and 731, modulates insulin action. *J Biol Chem.* 271(19), 11222
- MYERS MG JR, BACKER JM, SUN XJ, SHOELSON S, HU P, SCHLESSINGER J, YOAKIM M, SCHAFFHAUSEN B, WHITE MF. (1992) IRS-1 activates phosphatidylinositol 3'-kinase by associating with src homology 2 domains of p85. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89(21), 10350-10354
- NAKAGAWA Y, SHIMANO H, YOSHIKAWA T, IDE T, TAMURA M, FURUSAWA M, YAMAMOTO T, INOUE N, MATSUZAKA T, TAKAHASHI A, HASTY AH, SUZUKI H, SONE H, TOYOSHIMA H, YAHAGI N, YAMADA N. (2006) TFE3 transcriptionally activates hepatic IRS-2, participates in insulin signaling and ameliorates diabetes. *Nat Med.* 12(1), 107-113
- NOMURA F, KAWAI T, NAKANISHI K, AKIRA S. (2000) NF-kappaB activation through IKK-I-dependent I-TRAF/TANK phosphorylation. *Genes Cells.* 5(3), 191-202
- OLSON TS, BAMBERGER MJ, LANE MD. (1988) Post-translational changes in tertiary and quaternary structure of the insulin proreceptor. Correlation with acquisition of function. *J Biol Chem.* 263(15), 7342-7351
- OZCAN U, CAO Q, YILMAZ E, LEE AH, IWAKOSHI NN, OZDELEN E, TUNCMAN G, GORGUN C, GLIMCHER LH, HOTAMISLIGIL GS. (2004) Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes, *Science.* 306(5695), 457-461
- PATTI ME, KAHN CR. (1998) The insulin receptor--a critical link in glucose homeostasis and insulin action. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 9(2-4), 89-109
- PAZ K, HEMI R, LEROITH D, KARASIK A, ELHANANY E, KANETY H, ZICK Y. (1997) A molecular basis for insulin resistance. Elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem.* 272(47), 29911-29918
- PAZ K, LIU YF, SHORER H, HEMI R, LEROITH D, QUAN M, KANETY H, SEGER R, ZICK Y. (1999) Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1) by protein kinase B positively regulates IRS-1 function. *J Biol Chem.* 274(40), 28816-28822
- PEDERSON TM, KRAMER DL, RONDINONE CM. (2001) Serine/threonine phosphorylation of IRS-1 triggers its degradation: possible regulation by tyrosine phosphorylation. *Diabetes.* 50(1), 24-31

- PELEGRIN M, DEVEDJIAN JC, COSTA C, VISA J, SOLANES G, PUJOL A, ASINS G, VALERA A, BOSCH F. (1998) Evidence from transgenic mice that interferon-beta may be involved in the onset of diabetes mellitus. *J Biol Chem.* 273(20), 12332-12340
- PERALDI P, SPIEGELMAN B. (1998) TNF-alpha and insulin resistance: summary and future prospects. *Mol Cell Biochem.* 182(1-2), 169-175
- PESSIN JE, SALTIEL AR. (2000) Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest.* 106(2), 165-169
- PETERS, R.T., Liao, S., Maniatis, T. (2000) IKKepsilon is part of a novel PMA-inducible I kappa B Kinase complex. *Mol Cell* 5(3), 513-522
- PETERS RT, MANIATIS T. (2001) A new family of IKK-related kinases may function as I kappa B kinase kinases. *Biochim Biophys Acta.* 1471(2), M57-62
- RENSTROM F, BUREN J, ERIKSSON JW. (2005) Insulin receptor substrates-1 and -2 are both depleted but via different mechanisms after down-regulation of glucose transport in rat adipocytes. *Endocrinology.* 146(7), 3044-3051
- RIVEST S, LACROIX S, VALLIERES L, NADEAU S, ZHANG J, LAFLAMME N. (2000) How the blood talks to the brain parenchyma and the paraventricular nucleus of the hypothalamus during systemic inflammatory and infectious stimuli. *Proc Soc Exp Biol Med.* 223(1), 22-38
- RON, D. (2002) Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. *J Clin Invest.* 110(10), 1383-1388
- ROSSETTI L. (1995) Glucose toxicity: the implications of hyperglycemia in the pathophysiology of diabetes mellitus. *Clin Invest Med.* 18(4), 255-260
- ROUARD M, BASS J, GRIGORESCU F, GARRETT TP, WARD CW, LIPKIND G, JAFFIOLE C, STEINER DF, BELL GI. (1999) Congenital insulin resistance associated with a conformational alteration in a conserved beta-sheet in the insulin receptor L1 domain. *J Biol Chem.* 274(26), 18487-18491
- RUDDON RW, BEDOWS E. (1997) Assisted protein folding. *J Biol Chem.* 272(6), 3125-3128
- RUI L, AGUIRRE V, KIM JK, SHULMAN GI, LEE A, CORBOULD A, DUNAIF A, WHITE MF. (2001) Insulin/IGF-1 and TNF-alpha stimulate phosphorylation of IRS-1 at inhibitory Ser³⁰⁷ via distinct pathways, *J Clin Invest.* 107(2), 181-189
- RUI L, YUAN M, FRANTZ D, SHOELSON S, WHITE MF. (2002) SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. *J Biol Chem.* 277(44), 42394-42398
- SALTIEL, AR (2000) Series introduction: the molecular and physiological basis of insulin resistance: emerging implications for metabolic and cardiovascular diseases. *J Clin Invest.* 106(2), 163-164

- SALTIEL AR. (2001) New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. *Cell*. 104(4), 517-529
- SALTIEL AR, KAHN CR. (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414(6865), 799-806
- SANKAR S, CHAN H, ROMANOW WJ, LI J, BATES RJ. (2006) IKK-i signals through IRF3 and NFkappaB to mediate the production of inflammatory cytokines. *Cell Signal*. 18(7), 982-993
- SCHERR M, EDER M. (2007) Gene silencing by small regulatory RNAs in mammalian cells. *Cell Cycle*. 6(4), 444-449
- SEN R, BALTIMORE D (1986) Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-kB by a posttranslational mechanism. *Cell* 47, 921-928
- SESTI G. (2006) Pathophysiology of insulin resistance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 20(4), 665-679
- SESTI G, FEDERICI M, HRIBAL ML, LAURO D, SBRACCIA P, LAURO R. (2001) Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders. *FASEB J*. 15(12), 2099-2111
- SHAMBHARKAR PB, BLONSKA M, PAPPU BP, LI H, YOU Y, SAKURAI H, DARNAY BG, HARA H, PENNINGER J, LIN X. (2007) Phosphorylation and ubiquitination of the IkappaB kinase complex by two distinct signaling pathways. *EMBO J*. 26(7), 1794-1805
- SHARMA S, TENOEVEER BR, GRANDVAUX N, ZHOU GP, LIN R, HISCOTT J. (2003) Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science*. 300(5622), 1148-1151
- SHEN YH, ZHANG L, GAN Y, WANG X, WANG J, LEMAIRE SA, COSELLI JS, WANG XL. (2006) Up-regulation of PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten) mediates p38 MAPK stress signal-induced inhibition of insulin signaling. A cross-talk between stress signaling and insulin signaling in resistin-treated human endothelial cells. *J Biol Chem*. 281(12), 7727-7736
- SHEPHERD, P.R., WITHERS, D.J., SIDDLE, K. (1998) Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signaling. *Biochem J*. 333 (Pt 3), 471-90
- SHIMADA T, KAWAI T, TAKEDA K, MATSUMOTO M, INOUE J, TATSUMI Y, KANAMARU A, AKIRA S. (1999) IKK-I, a novel lipopolysaccharide-inducible kinase that is related to IkappaB kinases, *Int Immunol*. 11(8), 1357-1362
- SHIMOMURA I, MATSUDA M, HAMMER RE, BASHMAKOV Y, BROWN MS, GOLDSTEIN JL. (2000) Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. *Mol Cell*. 6(1), 77-86

- SHOELSON SE, LEE J, YUAN M. (2003) Inflammation and the IKK beta/I kappa B/NF-kappa B axis in obesity- and diet induced insulin resistance. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 27 Suppl 3, S49-52
- SHOELSON SE, LEE J, GOLDFINE AB. (2006) Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest.* 116(7), 1793-1801
- SHULMAN GI. (2000) Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest.* 06(2), 171-176
- SIMMONS DL, BOTTING RM. (2004) Hla T.Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev.* 56(3), 387-437
- SINGH MK, KRISAN AD, CRAIN AM, COLLINS DE, YASPELKIS BB 3rd. (2003) High-fat diet and leptin treatment alter skeletal muscle insulin-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase activity and glucose transport. *Metabolism.* 52(9), 1196-1205
- SMITH RM, CHARRON MJ, SHAH N, LODISH HF, JARETT L. (1991) Immunoelectron microscopic demonstration of insulin-stimulated translocation of glucose transporters to the plasma membrane of isolated rat adipocytes and masking of the carboxyl-terminal epitope of intracellular GLUT4. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(15), 6893-6897.
- STEPHENS JM, LEE J, PILCH PF. (1997) Tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is accompanied by a loss of insulin receptor substrate-1 and GLUT4 expression without a loss of insulin receptor-mediated signal transduction. *J Biol Chem.* 272(2), 971-976
- STOFFELS K, OVERBERGH L, GIULIETTI A, KASRAN A, BOUILLON R, GYSEMANS C, MATHIEU C. (2004) NOD macrophages produce high levels of inflammatory cytokines upon encounter of apoptotic or necrotic cells. *J Autoimmun.* 23(1), 9-15
- SUN XJ, ROTHENBERG P, KAHN CR, BACKER JM, ARAKI E, WILDEN PA, CAHILL DA, GOLDSTEIN BJ, WHITE MF. (1991) Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature.* 352(6330), 73-77
- SUN SC, MAGGIRWAR SB, HARHAJ E. (1995) Activation of NF-kappa B by phosphatase inhibitors involves the phosphorylation of I kappa B alpha at phosphatase 2A-sensitive sites. *J Biol Chem.* 270(31), 18347-18351
- SUN XJ, GOLDBERG JL, QIAO LY, MITCHELL JJ. (1999) Insulin-induced insulin receptor substrate-1 degradation is mediated by the proteasome degradation pathway. *Diabetes.* 48(7), 1359-1364
- SVEGLIATI-BARONI G, CANDELARESI C, SACCOMANNO S, FERRETTI G, BACHETTI T, MARZIONI M, DE MINICIS S, NOBILI L, SALZANO R, OMENETTI A, PACETTI D, SIGMUND S, BENEDETTI A, CASINI A. (2006) A model of insulin resistance and nonalcoholic steatohepatitis in rats: role of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and n-3 polyunsaturated fatty acid treatment on liver injury. *Am J Pathol.* 169(3), 846-860

- SWEENEY SE, HAMMAKER D, BOYLE DL, FIRESTEIN GS. (2005) Regulation of c-Jun phosphorylation by the I kappa B kinase-epsilon complex in fibroblast-like synoviocytes. *J Immunol.* 174(10), 6424-6430
- SWEENEY SE, MO L, FIRESTEIN GS. (2007) Antiviral gene expression in rheumatoid arthritis: role of IKKepsilon and interferon regulatory factor 3. *Arthritis Rheum.* 56(3), 743-752
- SZANTO I, GERGELY P, MARCSEK Z, BANYASZ T, SOMOGYI J, CSERMELY P. (1995) Changes of the 78 kDa glucose-regulated protein (grp78) in livers of diabetic rats. *Acta Physiol Hung.* 83(4), 333-342
- SZANTO I, KAHN CR. (2000) Selective interaction between leptin and insulin signaling pathways in a hepatic cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(5), 2355-2360
- TAKAHASHI K, MIZUARAI S, ARAKI H, MASHIKO S, ISHIHARA A, KANATANI A, ITADANI H, KOTANI H. (2003) Adiposity elevates plasma MCP-1 levels leading to the increased CD11b-positive monocytes in mice. *J Biol Chem.* 278(47), 46654-46660
- TANAKA H, FUJITA N, TSURUO T. (2005) 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1-mediated I kappa B kinase beta (IkkB) phosphorylation activates NF-kappaB signaling. *J Biol Chem.* 280(49), 40965-40973
- TANIGUCHI, C. M., EMANUELLI, B., KAHN, R. (2006) Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7(2), 85-96
- TANIGUCHI, C. M., UEKI, K., KAHN, R. (2005) Complementary roles of IRS1 and IRS2 in the hepatic regulation of metabolism. *J Clin Invest.* 115(3), 718-727
- TENOEVER BR, NG SL, CHUA MA, MCWHIRTER SM, GARCIA-SASTRE A, MANIATIS T. (2007) Multiple functions of the IKK-related kinase IKKepsilon in interferon-mediated antiviral immunity. *Science.* 315(5816), 1274-1278
- TERAUCHI Y, TAKAMOTO I, KUBOTA N, MATSUI J, SUZUKI R, KOMEDA K, HARA A, TOYODA Y, MIWA I, AIZAWA S, TSUTSUMI S, TSUBAMOTO Y, HASHIMOTO S, ETO K, NAKAMURA A, NODA M, TOBE K, ABURATANI H, NAGAI R, KADOWAKI T. (2007) Glucokinase and IRS-2 are required for compensatory beta cell hyperplasia in response to high-fat diet-induced insulin resistance. *J Clin Invest.* 117(1), 246-257
- TILG H, MOSCHEN AR. (2006) Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol.* 6(10), 772-783
- TIROSH A, POTASHNIK R, BASHAN N, RUDICH A. (1999) Oxidative stress disrupts insulin-induced cellular redistribution of insulin receptor substrate-1 and phosphatidylinositol 3-kinase in 3T3-L1 adipocytes. A putative cellular mechanism for impaired protein kinase B activation and GLUT4 translocation. *J Biol Chem.* 274(15), 10595-10602
- TRACEY KJ, CERAMI A (1993) Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. *Annu Rev Cell Biol.* 9, 317-343

- TREMBLAY F, KREBS M, DOMBROWSKI L, BREHM A, BERNROIDER E, ROTH E, NOWOTNY P, WALDHAUSL W, MARETTE A, RODEN M. (2005) Overactivation of S6 kinase 1 as a cause of human insulin resistance during increased amino acid availability. *Diabetes*. 54(9), 2674-2684
- UDELHOVEN, M., BERTRAM, B., LEESER, U., FREUDE, S., SCHNITKER, J., KRONE, W., SCHUBERT, M. (2007) SP1 und NF1 binden auf dem humanen IRS-2 Promotor und sind verantwortlich für die stressaktivierte und Erk abhängige IRS-2 Transkription in HepG2 Zellen. V32 Symposium „Glukosetransport und Insulin-Signaling“, 42. Jahrestagung der Deutschen Diabetes-Gesellschaft
- UHLAR AND WHITEHEAD. (1999) Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant *Eur. J. Biochem.*, 265, 501-523
- UM SH, FRIGERIO F, WATANABE M, PICARD F, JOAQUIN M, STICKER M, FUMAGALLI S, ALLEGRINI PR, KOZMA SC, AUWERX J, THOMAS G. (2004) Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature*. 431(7005), 200-205
- URANO F, WANG X, BERTOLOTTI A, ZHANG Y, CHUNG P, HARDING HP, RON D. (2000) Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1, *Science*. 287(5453), 664-666
- VAN DER WERF N, KROESE FG, ROZING J, HILLEBRANDS JL.(2007) Viral infections as potential triggers of type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 23(3), 169-183
- VAN ROYEN N, HOEFER I, BOTTINGER M, HUA J, GRUNDMANN S, VOSKUIL M, BODE C, SCHAPER W, BUSCHMANN I, PIEK JJ. (2003) Local monocyte chemoattractant protein-1 therapy increases collateral artery formation in apolipoprotein E-deficient mice but induces systemic monocytic CD11b expression, neointimal formation, and plaque progression. *Circ Res*. 92(2), 218-225
- VASSALLI P. (1992) The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol*. 10, 411-52
- VILASCO M, LARREA E, VITOUR D, DABO S, BREIMAN A, REGNAULT B, RIEZU JI, EID P, PRIETO J, MEURS EF. (2006) The protein kinase IKK ϵ can inhibit HCV expression independently of IFN and its own expression is downregulated in HCV-infected livers. *Hepatology*. 44(6), 1635-1647
- VIRKAMÄKI, A., UEKI, K., KAHN, R. C. (1999) Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest*. 103(7), 931-943
- VREUGDENHIL AC, DENTENER MA, SNOEK AM, GREVE JW, BUURMAN WA. (1999) Lipopolysaccharide binding protein and serum amyloid A secretion by human intestinal epithelial cells during the acute phase response. *J Immunol*. 163(5), 2792-2798
- WAETZIG V, CZELOTH K, HIDDING U, MIELKE K, KANZOW M, BRECHT S, GOETZ M, LUCIUS R, HERDEGEN T, HANISCH UK. (2005) c-Jun N-terminal kinases (JNKs) mediate pro-inflammatory actions of microglia. *Glia*. 50(3), 235-246

- WANG C, MAO X, WANG L, LIU M, WETZEL MD, GUAN KL, DONG LQ, LIU F. (2007) Adiponectin sensitizes insulin signaling by reducing p70 S6 kinase-mediated serine phosphorylation of IRS-1. *J Biol Chem.* 282(11), 7991799-6
- WANG N, AHMED S, HAQQI TM. (2005) Genomic structure and functional characterization of the promoter region of human I κ B kinase-related kinase IKKi/IKK ϵ gene. *Gene.* 353(1), 118-133
- WERNER, E., HANSEN, L., YUAN, M., MELENDEZ, P., SHOELSON, S. (2005) Insulin resistance due to IKKi, an NF κ B inducible kinase. Poster Abstract 432, Keystone Conference
- WIETEK, C., CLEAVER, C. S., LUDBROOK, V., WILDE, J., WHITE, J., BELL, D. J., LEE, M., DICKSON, M., RAY, K. P., O'NEILL, L., A. J. (2006) I κ B kinase epsilon interacts with p52 and promotes transactivation via p65. *J Biol Chem.* 281(46), 34973-34981
- WILLEMS F, MARCHANT A, DELVILLE JP, GERARD C, DELVAUX A, VELU T, DE BOER M, GOLDMAN M. (1994) Interleukin-10 inhibits B7 and intercellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes. *Eur J Immunol.* 24(4), 1007-1009
- WU, S., TAN, M., HU, Y. WANG, J., SCHEUNER, D. (2004) Ultraviolet light activates NF κ B through translational inhibition of I κ B α synthesis. *J Biol Chem.* 279(33), 34898-3490
- WU Z, ROSEN ED, BRUN R, HAUSER S, ADELMANT G, TROY AE, MCKEON C, DARLINGTON GJ, SPIEGELMAN BM. (1999) Cross-regulation of C/EBP α and PPAR γ controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol Cell.* 3(2), 151-158
- YAN G, SHI L, PENFORNIS A, FAUSTMAN DL. (2003) Impaired processing and presentation by MHC class II proteins in human diabetic cells. *J Immunol.* 170(1), 620-627
- YANG RZ, LEE MJ, HU H, POLLIN TI, RYAN AS, NICKLAS BJ, SNITKER S, HORENSTEIN RB, HULL K, GOLDBERG NH, GOLDBERG AP, SHULDINER AR, FRIED SK, GONG DW. (2006) Acute-phase serum amyloid A: an inflammatory adipokine and potential link between obesity and its metabolic complications. *PLoS Med.* 3(6), e287
- YE J. (2007) Role of insulin in the pathogenesis of free fatty acid-induced insulin resistance in skeletal muscle. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 7(1), 65-74
- YIN MJ, YAMAMOTO Y, GAYNOR RB. (1998) The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I κ B kinase-beta. *Nature.* 396(6706), 77-80
- ZHANG N, AHSAN MH, PURCHIO AF, WEST DB. (2005) Serum amyloid A-luciferase transgenic mice: response to sepsis, acute arthritis, and contact hypersensitivity and the effects of proteasome inhibition. *J Immunol.* 174(12), 8125-8134

- ZHOU H, DING G, LIU W, WANG L, LU Y, CAO H, ZHENG J. (2004) Lipopolysaccharide could be internalized into human peripheral blood mononuclear cells and elicit TNF-alpha release, but not via the pathway of toll-like receptor 4 on the cell surface. *Cell Mol Immunol.* 1(5), 373-377
- ZICK Y. (2001) Insulin resistance: a phosphorylation-based uncoupling of insulin signaling. *Trends Cell Biol.* 11(11), 437-441
- ZICK Y. (2004) Uncoupling insulin signalling by serine/threonine phosphorylation: a molecular basis for insulin resistance. *Biochem Soc Trans.* 32(Pt 5), 812-816
- ZICK Y. (2005) Ser/Thr phosphorylation of IRS proteins: a molecular basis for insulin resistance. *Sci STKE.* (268), pe4

7 Anhang

7.1 *Abbildungsverzeichnis*

Abbildung 1:	Insulinsignalwege.....	7
Abbildung 2:	Insulinrezeptor.....	8
Abbildung 3:	Autophosphorylierung der β -Untereinheiten.....	9
Abbildung 4:	Übersicht der an der Insulinsignaltransduktion beteiligten Elemente.....	9
Abbildung 5:	Schematische Darstellung der IRS-Proteine.....	10
Abbildung 6:	Schematische Darstellung der Overlap-PCR.....	25
Abbildung 7:	TaqMan-Sonde.....	26
Abbildung 8:	Ablauf RealTime-PCR.....	27
Abbildung 9:	Phosphorylierung von Casein durch rekombinantes IKK ϵ	39
Abbildung 10:	Ergebnisse des TKA-ELISA.....	40
Abbildung 11:	Coomassie-gefärbtes SDS-Gel des IR-Kinase-Assays.....	42
Abbildung 12:	Autoradiogramm des IR-Kinase-Assays.....	43
Abbildung 13:	Quantifizierung des Autoradiogramms des IR-Kinase-Assays.....	44
Abbildung 14:	Coomassie-gefärbtes SDS-Gel des IRS1-Kinase-Assays.....	45
Abbildung 15:	Autoradiogramm des IRS1-Kinase-Assays.....	46
Abbildung 16:	Quantifizierung des Autoradiogramms des IRS1-Kinase-Assays.....	47
Abbildung 17:	Coomassie-gefärbtes SDS-Gel des IRS2-Kinase-Assays.....	48
Abbildung 18:	Autoradiogramm des IRS2-Kinase-Assays.....	49
Abbildung 19:	Quantifizierung des Autoradiogramms des IRS2-Kinase-Assays.....	49
Abbildung 20:	Sequenzausschnitt von IRS1 und IRS2 mit Ser636/639-Motiv.....	50
Abbildung 21:	Schematische Darstellung der IKK ϵ -Klonierungsstrategie.....	51
Abbildung 22:	Schematische Darstellung der Overlap-PCR.....	53
Abbildung 23:	Vektorkarten des IKK ϵ -Klones sowie des IKK ϵ K38A-Klones.....	54
Abbildung 24:	Zeitverlauf der IKK ϵ -Expression nach TNF α -Stimulation.....	55
Abbildung 25:	TNF α -vermittelte Induktion der IKK ϵ -Expression in FAO-Zellen.....	56
Abbildung 26:	IKK ϵ -Gen-Knockdown mit siRNA.....	57
Abbildung 27:	mit GFP-markierter siRNA transfizierte FAO-Zellen.....	58
Abbildung 28:	mit GFP transfizierte FAO-Zellen.....	58
Abbildung 29:	Einfluss ansteigender Mengen von transfizierten IKK ϵ auf die IR-Expression.....	59
Abbildung 30:	AKT Western Blot.....	60
Abbildung 31:	eIF2 α als ER-Stress-Marker.....	61
Abbildung 32:	Einfluss von IKK ϵ auf IRS1 und IRS2.....	62
Abbildung 33:	phospho-IRS1Ser636/639-Western Blots der IRS1-Lysate.....	63
Abbildung 34:	phospho-IRS1Ser636/639-Western Blots der IRS2-Lysate.....	63
Abbildung 35:	CIAP-Behandlung von IRS1 bzw. IRS2.....	64
Abbildung 36:	IKK ϵ in HEK293rapid-Zellen.....	66
Abbildung 37:	Co-Immunpräzipitation p85 und IRS1 bzw. IRS2.....	68
Abbildung 38:	Übersicht der Fütterung der DIM22-Mäuse.....	70
Abbildung 39:	IKK ϵ -Expression in murinem Gewebe.....	71
Abbildung 40:	Übersicht der verschiedenen Maus-Gruppen.....	72
Abbildung 41:	Genotypisierungsprimer des IKK ϵ -Knockouts.....	73
Abbildung 42:	Erwartete Fragmente bei der Genotypisierung des IKK ϵ -Knockouts.....	73
Abbildung 43:	Genotypisierung der wt- und IKK ϵ -Knockout-Mäuse auf DNA-Ebene.....	75
Abbildung 44:	Genotypisierung der wt- und IKK ϵ -Knockout-Mäuse auf RNA-Ebene.....	75
Abbildung 45:	Genotypisierung der wt- und IKK ϵ -Knockout-Mäuse auf Protein-Ebene.....	76
Abbildung 46:	Analyse der Leberlysate von wt- und IKK ϵ -Knockout-Mäusen auf Proteinebene....	77
Abbildung 47:	Analyse der epiWAT-Lysate von wt- und IKK ϵ -Knockout-Mäusen auf Proteinebene	77
Abbildung 48:	mRNA-Expression verschiedener Marker in Leber und epiWAT.....	85
Abbildung 49:	Positivkontrollen NF κ B-Aktivitätsmessung.....	86
Abbildung 50:	NF κ B Aktivitätsmessung.....	86

7.2 Sequenzen

Jeweils Rot hervorgehoben ist die Ser636/639-Sequenz.

Aminosäuresequenz der rIRS1 CDS (ACCESSION CAA41264) :

```

1  masppdtdgf sdvrkvgylr kpksmhkrff vlraaseagg parleyyene kkwrhkssap
61  krsiplescf ninkradskn khlvalytrd ehfaiaadse aeqdswyqal lqlhnrakah
121 hdgagggcgg scsgssgvge agedlsydtg pggpafkevwq vilkpkglgq tknligiyrl
181 cltsktisfv klnseaaavv lqlmnirrcg hsenffffiev grsavtgpge fwmqvddsvv
241 aqnmhetile amramsdefr prtksqssss csnpisvplr rhhltnppps qvgltrrsrt
301 esitatspas mvvgkpgsfr vrassdgegt msrpdsvdgs pvspstnrth ahrhrghssrl
361 hpplnhsrsi pmpssrcsps atspvslsss stsghgstsd clfprssas vsgspsdggf
421 issdeygspp cdfrrsfrsv tpdslghtpp argeeelsny icmgkgast ltapnghyil
481 srgegnghryi pgamgtspa lgtdeaagaa dldnrfrkrt hsaigtsptis hqktpsqsav
541 vsieeytemm paayppgggs ggrrlpgyrhs afvpthsype eglemhler rggghrpdss
601 nlhtddgymp mspgvavvps nrkngdympp mspksvsapq qiinpirrhp qrvdpngymm
661 mspsgscspd igggscssss isaapsgssy gkpwtngvvg hthalphak ppvesgggkl
721 lpctgdymnm spvgdsntss psecyypged pqhkpvslyy slprsfkhtq rpgepegar
781 hqhlrlssss grlryatae dssstssds lggycgarp essvthphhh alqphlprkv
841 dtaaqtnsrl arptrlsldg pkastlprvr eqqqqqqqqq qsslhppepk spgeyvnief
901 gsgqpgylag patsrpspsv rclpqlhpap reetgseeym nmdlpggrra twqesggvel
961 grvgpappga asicrptrsv pnsrgdymtm qigcprqsyv dtspvapvsv admrtgiaae
1021 nqslprttga apppsstasa sasvtpqgaa eqaahsllg gpqgpggmsa ftrvnlspnh
1081 nqsakvirad tggcrrrhss etfsaptraa ntvsgagaa gggsgggsed vkrhssasfe
1141 nvwlrpgdlg gaskesapgc gaaggleksl nyidldlvkd vkqhpqdcps qqqsllppppp
1201 hqplgsnegs sprrssedls tyasinfqkq pedrq

```

Aminosäuresequenz der hIRS2 CDS (ACCESSION NP_003740) :

```

1  maspprhgpp gpasgdgpnl nnnnnnnnhs vrkcgylrkq khghkrffvl rgpgaggdea
61  tagggsapqp prleyyesek kwrskagapk rvialdccln inkradakhk yllalytkde
121 yfavaaeneq eqegwyralt dlvsagraaa gdappaaapa ascaslpga lggsagaaga
181 edsyglvapa taayrevwqv nlkpkglgqs knltgvyrllc lsartigfvc lnceqpsvtl
241 qlmnirrcgh sdsffffiev rsavtgggel wmqaddsvva qnihetilea mkalkelfef
301 rprsksqssg ssathpisvp garrhhhlvn lppsqtglvr rsrtdslaat ppaakcscsr
361 vrtasegdgg aaagaaaaga rpvsvagspl spgpvraps rshtlsggcg grgskvallp
421 aggalqhsrs msmpvahspp aatspgslss ssghgsgsyp pppgphpplp hplhhgggqr
481 pssgsasasg spsdpgfmsl deygsspgdl rafcshrsnt pesiaetppa rdgggggefy
541 gytmtdrpls hcgrsyrrvs gdaaqldrg lkrktylslt parqrpvppp ssasldeytl
601 mratfsgsag rlcpscpass pkvayhpye dygdieigsh rsssnlgad dgympmtppa
661 alagsgsgsc rsddymppsp asvsapkqil qpraaaaaaaa avpsagpagp aptsaagrft
721 pasgggykas spaesspeds gymrmwgcgk lsmehadgkl lpngdylnvs psdavttgtp
781 pdffsaalhp ggeplrgvpg ccysslprsy kapytcggds dqyvlmsspv grileeerle
841 pqatpgpsqa asafgagptq pphpvvpspv rpsggrpegf lqqrgravrp trlsleglps
901 lpsmhieyplp pepkspgeyi nidfgepgar lspapplla saassslls asspasslgs
961 gtpgtssdsr qrsplsdymn ldfsspkspk pgapsghpv sldgllspea sspypplppr
1021 psaspssslq ppppppape lyrlppasav atagppgaas slssdtgdng dytemafgva
1081 atppqpiaap pkpeaarvas ptsgvkrlsl meqvsgveaf lqasqppdph rgakviradp
1141 qgrrrrhsse tfsstttvtp vspsfahnpk rhnsasvenv slrksseggv gvpggggdep
1201 ptsprqlqpa pplapqrpw tpgqpgglvg cpqsggspmr retsagfqng lnyiaidvre
1261 epglppqpq pppplpqpq ksswgrtrsl ggllsavvgv stgggcggpg pgalppanty
1321 asidflshhl keativke

```

7.3 Sequenzierungen

IKKε Sequenz:

Start- (ATG) und Stop- (TGA)-Codon sind farblich unterlegt.

```

1 gagagagctg agagccagga ctcaagtgtg agcttggtgt cccaccgcca caaggaggca
61 gggaagaaac ccactagtcc cagctcctgg ggtggcacag acattgcaac tggccctgcc
121 tgtgggtcct agggggcctt gggtaccagg aggctaagaa cactgctcat gaatgacagt
181 gagccctgaa agctctgggg gtgtcaccca gtcccacaag cctgcatccc ctgcaagtga
241 gatgggctca gtcctctggac gtgccacaga cagaaagcat aacatacact cgccaggaag
301 agcctttgcc tgactcaggg cagctcagag tgtggggcag aaggtgacca gccagctcag
361 ggcaggagatg cagagacaca gcccaattacc tgtggcacac agatgacctg ctggggcagg
421 gggccactgc cagtgtgtac aaggcccgcg acaagaaatc cggagagctg gttgctgtga
481 aggtcttcaa cactaccagc tacctgctgg cccgcgaggt gcaggtgagg gaggttgagg
541 tcctgcggaa gctgaaccac cagaacatcg tcaagctctt tgcggtggag gagacgggcg
601 gaagccggca gaaggtactg gtgatggagt actgctccag tgggagcctg ctgagtgtgc
661 tggagagccc tgagaatgcc tttgggctgc ctgaggatga gttcctgggtg gtgctgcgct
721 gtgtgggtggc cggcatgaac cacctgctgg agaacggcat tgtgcatcgc gacatcaagc
781 cggggaacat catgctcctc gtagggggagg aggggcagag catctacaag ctgacagact
841 tcggcgctgc ccgggagctg gatgatgatg agaagtctgt ctcggtctat gggactgagg
901 agtacctgca tcccagatg tatgagcggg cggtgcttct aaagccccag caaaaagcgt
961 tcggggtgac tgtggatctc tggagcattg gagtgcctt gtaccatgca gccactggca
1021 gcctgcctt catcccctt ggtggggcac ggcggaacaa ggagatcatg taccggatca
1081 ccacggagaa gccggctggg gccattgcag gtgccagag gcgggagaa gggcccctgg
1141 agtggagctc caccctccc atcacctgac agctgtcact ggggctgcag agccagctgg
1201 tgccatcct ggccaacatc ctggagggtg agcaggccaa gtgctggggc ttcgaccagt
1261 tctttgogga gaccagtgc atcctgcagc gaggttgtct ccatgtcttc tccctgtccc
1321 aggcagctc gcaccacatc tatatccatg cccacaacac gatagccatt tccaggagg
1381 ccgtgcacaa gcagaccagt gtggcccccc gacaccagga gtacctctt gagggtcacc
1441 tctgtgtcct cgagcccagc gtctcagcac agcacatcgc ccacacgacg gcaagcagcc
1501 ccctgacctt cttcagcaca gccatcccta aggggctggc cttcagggac cctgctctgg
1561 acgtccocaa gttcgtcccc aaagtggacc tgcaggcggg ttacaacact gccaagggcg
1621 tgttggggcg cggctaccag gccctgcggc tggcacgggc cctgctggat gggcaggagc
1681 taatgtttcg ggggctgcac tgggtcatgg aggtgctcca ggccacatgc agacggactc
1741 tggaaagtggc aaggacatcc ctctctacc tcagcagcag cctgggaact gagaggttca
1801 gcagcgtggc tggaaacgct gagatccagg aactgaaggc ggctgcagaa ctgagggtcca
1861 ggctgcggac tctagcggag gtctctcca gatgctcca aaatatcagc gagaccagg
1921 agagcctgag cagcctgaac cgggagctgg tgaagagccg ggatcaggtc catgaggaca
1981 gaagcatcca gcagattcag tctgttttgg acaagatgaa cttcatctac aaacagttca
2041 agaagtctag gatgaggcca gggcttggct acaacgagga gcagattcac aagctggata
2101 agtgaattt cagtcattta gccaaaagac tctcagaggt gttccaggag gactgcgtgc
2161 agaagtatca agcgtcctta gtcacacacg gcaagaggat gagggtggtg caccagacca
2221 ggaaccacct gcgctgtgtt ggctgttctg tggctgcctg taacacagaa gccccagggg
2281 tccaggagag tctcagcaag ctctggaag agctatctca ccagctcctt caggaccgag
2341 caaagggggc tcaggcctcg ccgctccca tagctcctta cccagcctt acacgaaagg
2401 acctgcttct ccacatgcaa gagctctgag aggggatgaa gctgctggca tctgacctcc
2461 tggacaacaa ccgcatcatc gaacggctaa atagagtccc agcacctcct gatgtctgag
2521 ctccatgggg cacatgaggc atcctgaagc attagaatga ttccaacact gctcttctgc
2581 accatgagac caaccaggc caagatccca tcccatcaca tcagcctacc tccctctgg
2641 ctgctggcca ggatgtcggc agcattacct tccactgctt ttctcctgg gaagcagcag
2701 agctgagact gggcaccagg ccacctctgt tgggaccac aggaaagatg gttggcagca
2761 ctgctgggct gacctttcta tcttctctag gctcaggtae tgctcctcca tggccatggc
2821 tgggcccgtg ggagaagaag ctctcatacg ccttcccact ccctctgggt tataggactt
2881 cactccctag ccaacaggag aggaggcctc ctggggtttc cccagggcag taggtcaaac
2941 gacctcatca cagtcttctt tctcttcaa gcgttctatg ttgaacacag ctctctccgc
3001 tcccttgtga tttctgaggg tcaccactgc cagcctcagg caacatagag agcctcctgt
3061 tctttctatg cttggctctga ctgagcctaa agttgagaaa atgggtggcc aaggccagtg
3121 ccagtgtctt ggggcccctt tggctctccc tcaactctct aggctccagc tggctcctgg
3181 acatgcagcc aggactgtga gtctgggcag gtccaaggcc tgcaccttca agaagtggaa
3241 taaatgtggc ctttgcctct gtt

```

7.4 Assay on Demand-Liste (TaqMan Primer)

Die Assays on Demand wurden von APPLIED BIOSYSTEMS bezogen.

Gen	Assay ID
mAngptl3	Mm00803820 m1
mAngptl4	Mm00480431 m1
mCD11b	Mm00434455 m1
mCD40	Mm00441891 m1
mCD68	Mm00839636 g1
mCox2	Mm00478374 m1
mCxcl10	Mm00445235 m1
mEmr1	Mm00802530 m1
mIKKb	Mm00833995 m1
mIKKε	Mm00444862 m1
mIL1b	Mm00434228 m1
mIL10	Mm00439616 m1
mIL6	Mm00446190 m1
miNos	Mm00440485 m1
mIR	Mm00439693 m1
mIRS1	Mm00439720 s1
mIRS2 (Primer Probe Set)	fwd GCGGCCTCATCTTCTTCACT rev AACTGAAGTCCAGGTTTCATATAGTCAGA
mPpie	Mm00450929 m1
mSAA1	Mm00656927 g1
mSAA2	MSAA2-ABD-EX23
mSAA3	Mm00441203 m1
mTbp	Mm00446973 m1
mTNFα	Mm00443258 m1