

Aus der Medizinischen Klinik I
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Hendrik Lehnert

**Effekte von Insulin auf die Insulinsignalkaskade
und auf Apoptosevorgänge
in humanen renalen Tubulusepithelzellen**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Medizinischen Fakultät -

Vorgelegt von
Caroline J. Deisel
aus Wetzlar

Lübeck 2008

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Morten Schütt

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Boris Perras

Tag der mündlichen Prüfung: 15.05.2009

Zum Druck genehmigt: Lübeck, den 15.05.2009

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in folgender Publikation veröffentlicht:

„Insulin inhibits Caspase-3 Activity in Human Renal Tubular Epithelial Cells via the PI3-Kinase/Akt Pathway“, Cellular Physiology and Biochemistry; No. 21, Januar 2008

Meiner Familie und Gerrit

Abkürzungen

AKT	Proteinkinase B
ANV	Akutes Nierenversagen
ATP	Adenosintriphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Bovines Serumalbumin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
ECI	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamin – Tetraacetat
ELISA	Enzyme linked immuno sorbend assay
FCS	Fetal Calf Serum
HEPES	Hydroxyethylpiperazin – Ethansulfonsäure
HepG2	Hepatoma – G2 Zellen
HRP	Horseradish Peroxidase
IRS-1	Insulinrezeptorsubstrat – 1
IS – Zeit	Insulinstimuluszeit
p85	Adapteruntereinheit der PI3-Kinase mit relativem Molekulargewicht von 85 kD
PBS	Phosphat Buffered Saline
PI	Phosphatidylinositol
PI3P	Phosphatidylinositol-3-Phosphat
pPKB	phosphorylierte Proteinkinase B
PKB	Proteinkinase B
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTEC	Proximale Tubular Epithelial Cells = Tubulusepithelzellen
PY	Phosphotyrosin
PY-IRS1	Tyrosinphosphoryliertes IRS-1
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	Standard Error of the Mean
TBS	Tris Buffered Saline
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurate

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1-6
1.1	Akutes Nierenversagen	1
1.2	Pathophysiologie des akuten Nierenversagens	1-2
1.3	Regulation der Apoptose.....	2-3
1.4	Akutes Nierenversagen und Insulinwirkung.....	3-4
1.5	Insulinkaskade in klassischen Insulinzielgeweben	4-5
1.6	Fragestellung	6
2.	Material und Methoden	7-26
2.1	Material	7-11
2.1.1	Reagenzien	7
2.1.2	Radioaktive Substanzen	8
2.1.3	Antikörper	8
2.1.4	Technische Geräte und Zubehör	8-9
2.1.5	Einzelteile Laborbedarf	9
2.1.6	Flüssige Materialien für die Zellkultur	9
2.1.7	Zusammensetzung selbst hergestellte Puffer und Lösungen	9-11
2.1.8	Zellen	11
2.2	Methoden	12-26
2.2.1	Kultur von humanen Tubulusepithelzellen der Nierenrinde	12-13
2.2.2	Zellkultur mit Insulinmangelmedium	13
2.2.3	Inkubation der Zellen mit Insulin und Camptothecin	13
2.2.4	Inkubation der Zellen mit Wortmannin zur Blockierung der PI3-Kinase.....	14
2.2.5	Insulinstimulation und Solubilisierung der Zellen	14
2.2.6	Proteinbestimmung nach Bradford	15
2.2.7	Bestimmung der Zellzahl und Viabilität der Zellen	15-16
2.2.8	Insulinrezeptorkinaseaktivität.....	17
2.2.9	Berechnung der an humanspezifischen Insulinrezeptor-Antikörper gebundenen Kinase- und Insulinbindungsaktivität.....	18-19
2.2.10	Immunoimmobilisation von IRS-1.....	20
2.2.11	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	20-22
2.2.12	Immunoblot im Semi-Dry-Verfahren.....	23
2.2.13	Detektion der Immunoblots durch Chemilumineszenz	23-24
2.2.14	Bestimmung der Caspase-3-Aktivität im ELISA	24-25
2.2.15	Statistische Auswertung	25-26

3.	Ergebnisse	27
3.1	Zellzahl und Viabilität	27
3.2	Einfluss von Insulinstimulation und/oder –mangel auf die Insulinrezeptorkinase-Aktivität	27
3.3	Effekte von Insulin auf die IRS-1 Phosphorylierung	27-28
3.3.1	Messung der Proteinexpression von IRS-1 und der IRS-1 Phosphorylierung	28-29
3.3.2	Konzentrations-Wirkungsbeziehung und Zeitverlauf der Effekte von Insulin auf die IRS-1 Phosphorylierung	29-30
3.3.3	Insulinmangelzeiten	30-32
3.3.4	Insulinstimulierte IRS-1 Phosphorylierung	32-34
3.4	Einfluss von Insulin auf die PI3-Kinase	35
3.4.1	Charakterisierung der Versuchsbedingungen zur Bestimmung der insulinstimulierten IRS-1 Assoziation von der p85-Untereinheit ...	35-36
3.4.2	Insulinstimulierte Assoziation der p85-Untereinheit der PI3-Kinase an das IRS-1	36-37
3.5	Einfluss von Insulin auf die Proteinkinase B/Akt in Tubulusepithelzellen	38
3.5.1	Bestimmung der Proteinexpression der Akt.....	38-39
3.5.2	Insulinstimulierte Ser ²⁷³ -Phosphorylierung der Akt	39-40
3.6	Einfluss der Insulinstimulation auf die Caspase-3-Aktivität ...	40-42
3.6.1	Einfluss der Insulininkubation auf die IRS-1 Phosphorylierung bei gleichzeitiger Apoptoseinduktion durch Camptothecin und Blockierung der PI-3 Kinase durch Wortmannin.....	43-44
3.6.2	Einfluss der Insulininkubation auf die Caspase-3 Aktivität bei gleichzeitiger Apoptoseinduktion durch Camptothecin und Blockierung der PI-3 Kinase durch Wortmannin.....	45-46
4.	Diskussion	47-54
4.1	Nachweis und insulinabhängige Aktivierung wesentlicher Parameter der Insulinsignalkaskade in PTEC	47
4.2	Beeinflussung der Camptothecin-induzierten Apoptose in PTEC durch Insulin	48
4.3	Beeinflussung Camptothecin-induzierter Apoptosevorgänge in PTEC durch eine Insulinstimulation des PI3-Kinase/Akt-Signalwegs	48-50
4.4	Potentielle Rolle von IGF-1 bei der insulinstimulierten Aktivierung des PI3-Kinase/Akt-Signalwegs in PTEC	50

4.5	Verbindung des PI3-Kinase/Akt-Signalweg mit der Caspasenaktivität	51-52
4.6	Klinische Relevanz der Untersuchungsergebnisse	52-54
5.	Zusammenfassung	55-57
6.	Literaturverzeichnis	58-64
7.	Danksagung	65
8.	Lebenslauf	66

1. Einleitung

1.1 Akutes Nierenversagen

Das akute Nierenversagen (ANV) ist trotz aller klinischen und wissenschaftlichen Fortschritte mit einer erheblichen Morbidität und Mortalität assoziiert. In den meisten Studien an internistischen und / oder chirurgischen Patienten werden noch immer Mortalitätsraten von über 30% bei Auftreten eines akuten Nierenversagens angegeben [1]. Eine aktuelle Beobachtungsstudie an erwachsenen Patienten, die vorübergehend auf einer Intensivstation wegen eines akuten Nierenversagens mittels Dialysetherapie behandelt wurden, berichtet sogar von einer 1-Jahres Mortalität von ca. 64% [2]. Aufgrund dieser hohen klinischen Relevanz des ANV besteht ein großes Interesse an einer Optimierung der zur Verfügung stehenden Behandlungsoptionen und, in diesem Zusammenhang, an einem besseren Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen des ANV.

Das ANV ist generell durch eine plötzlich eintretende Abnahme der glomerulären Filtrationsfraktion definiert [3]. Die zum ANV führenden Faktoren sind bislang nicht vollständig verstanden. Es wird davon ausgegangen, dass eine Schädigung des Tubulusepithels im Vordergrund steht, die mit einer Entzündungsreaktion und Zerstörung der proximalen Tubulusepithelzellen (PTEC) einhergeht [4,5]. Es gibt zudem Hinweise darauf, dass hierbei Apoptosevorgänge eine wichtige Rolle spielen [6].

1.2 Pathophysiologie des akuten Nierenversagens

Die Ursachen für das akute Nierenversagen werden generell in prärenale, renale und postrenale Gründe unterteilt. Die renalen Ursachen werden weiterhin unterteilt in vaskuläre, glomeruläre, interstitielle und tubuläre Veränderungen [7]. In der Population der kritisch Kranken handelt es sich zumeist um ein ANV durch renale Gründe, die zu mehr als 70% durch eine Schädigung der Niere im Bereich des Tubulusepithels, einer so genannten akuten ischämischen Tubulusnekrose, verursacht werden [8]. Pathophysiologisch handelt es sich bei der akuten Tubulusnekrose um

ein komplexes Geschehen, das vor allem durch die Faktoren Hypoxie, Inflammation und Apoptose bestimmt wird [9].

Tubuluszellen reagieren durch ihre Beteiligung an verschiedensten, energiefördernden Stoffwechselprozessen und der obligat oxidativen Energiegewinnung sehr empfindlich bei einer Sauerstoffmangelversorgung. Es resultiert u.a. ein Verlust der Autoregulation und eine Erhöhung des Sympathikotonus bzw. eine erhöhte Sensitivität der Niere gegenüber Vasokonstriktoren [10]. Auf Zellebene führt eine relevante Hypoxie zum Verlust des apikalen Bürstensaums der Tubulusepithelzellen, Verlust der Zell-Adhäsionsmoleküle und schließlich zum Zellschaden durch Nekrose und Einsetzen von Apoptose. Die auf diese Weise entstehenden Zellfragmente bilden intraluminale Konglomerate und führen so zu einer tubulären Obstruktion mit Dilatation des proximal gelegenen Abschnittes [9]. Histologische Nierenpräparate von Patienten mit einem ANV weisen deshalb in typischer Weise dilatierte proximale Tubuli als Folge der tubulären Obstruktion auf [11]. Die Kombination von gestörter Autoregulation in Form von übermäßiger Vasokonstriktion und tubulärer Obstruktion durch Tubulusepithelschädigung erklärt die plötzlich eintretende Abnahme der glomerulären Filtrationsfraktion (GFR) beim ANV. Entscheidend für den Progress einer passageren renalen Funktionsstörung in ein manifestes ANV scheint das Ausmaß der Apoptose-induzierten Veränderungen zu sein.

1.3 Regulation der Apoptose

Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltods und kann sowohl über einen intrinsischen als auch über einen extrinsischen Weg aktiviert werden. Sie ist u.a. während der Organentwicklung in der Embryonalphase von entscheidender Bedeutung und schützt Gewebeverbände vor überschießendem Wachstum und Entartung (Aktivierung durch DNA-Schädigung). Eine extrinsische Aktivierung erfolgt z.B. über die Bindung von Tumor-Nekrose-Faktor alpha oder anderen Zytokinen, die eine intrazelluläre Signalkaskade aktivieren und den Zelltod einleiten. Apoptose unterscheidet sich von dem nekrotischen Zelltod durch den systematischen und von der Zelle aktiv durchgeführten Ablauf. Zudem fehlt eine

Entzündungsreaktion in der Zellumgebung, da die Zellbestandteile nach der Spaltung durch proteolytische Enzyme, insbesondere durch Caspasen, in Vesikel verpackt abtransportiert werden und die Zellmembran intakt bleibt.

Caspasen zählen zu den wesentlichen Effektoren der Apoptose. Sie gehören zur Familie der intrazellulären Cysteinproteasen, von denen mindestens 14 Subtypen bekannt sind. In PTEC wird, neben anderen Subtypen, hauptsächlich die Caspase-3 exprimiert [12,13]. Nach ihrer Aktivierung veranlassen Caspasen die Aktivierung proinflammatorischer Zytokine, spalten intrazelluläre Struktur- und Funktionsproteine, lösen weitere Zellbestandteile auf und führen so zum Zellertergang [12, 13]. Caspasen können direkt durch Hypoxie aktiviert werden. Eine weitere Möglichkeit der Aktivierung von Caspasen - und damit der Regulation von Apoptosevorgängen - scheint durch bestimmte intrazelluläre Signaltransduktionswege zu bestehen [14]. Insbesondere die Insulinsignalkaskade wird als potentieller regulatorischer Mechanismus apoptotischer Vorgänge diskutiert. Diese Hinweise stammen vor allem aus experimentellen Studien an Mesangialzellen von Ratten oder Mäusen [13, 15, 16].

1.4 Akutes Nierenversagen und Insulinwirkung

Insulinresistenz, systemische Inflammation und damit einhergehende Phasen der Hyperglykämie sind typische metabolisch-hormonelle Veränderungen bei kritisch kranken Patienten, die sowohl prognostisch als auch therapeutisch eine herausragende Bedeutung besitzen. Insulinresistenz und systemische Inflammation beeinflussen sich hierbei gegenseitig negativ. So verursacht eine vermehrte Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen eine Reduktion der Insulinempfindlichkeit der einzelnen Gewebe, während die Hyperglykämie in Abhängigkeit der Höhe der Plasmaglucosewerte selbst eine Insulinresistenz bedingt (so genannte Glucoasetoxizität) [9, 18].

Die klinische Bedeutung einer solchen Stoffwechsellage wird insbesondere an Studien mit kritisch Kranken deutlich. Anhand von Studien an Patientenkollektiven

von internistischen oder chirurgischen Intensivstationen konnte gezeigt werden, dass die Aufrechterhaltung von niedrig normalen Blutzuckerwerten mittels einer intensivierten Insulintherapie zu einer signifikanten Reduktion der Morbidität und Mortalität führte [19 - 21]. In einer der ersten großen Studien zur Bedeutung der konsequenten und dauerhaften Blutzuckereinstellung bei kritisch Kranken einer chirurgischen Intensivstation zeigten van den Berghe et al., dass durch eine konstante Einstellung der Blutzuckerwerte im Bereich 80 – 110 mg/dl mittels Titrierung einer Insulindauerinfusion im Vergleich mit einer Therapie, die erst bei Blutzuckerwerten über 215 mg/dl begonnen wurde (durchschnittliche therapeutische Blutzuckerwerte 150 – 160 mg/dl), die Mortalität um ca. 34%, die Inzidenz einer Septikämie um ca. 46%, einer Polyneuropathie um ca. 44% und einer akuten Niereninsuffizienz um ca. 40% reduziert werden konnte [19,20]. Eine multivariate Regressionsanalyse dieser Daten ergab, dass die Senkung des Blutzuckerspiegels und nicht die Insulindosis zur Reduktion der Mortalität, der Polyneuropathien und der Septikämien führte, während der positive Effekt auf das Verhindern eines ANVs allein von der Insulindosis und nicht von der Senkung des Blutzuckerspiegels abhängig war [20].

Da das ANV bei kritisch Kranken zumeist auf eine Schädigung des Tubulusepithels durch Apoptosevorgänge zurück zu führen ist und Apoptosevorgänge in verschiedenen renalen Zellreihen durch Insulinstimulation beeinflusst werden konnten [15, 16], lassen die Daten von van den Berghe et al. vermuten, dass Insulin - zusätzlich zu den bekannten klassischen Effekten in den Insulinzielgeweben - auch direkte Effekte auf Apoptosevorgänge im Bereich der Tubulusepithelzellen haben könnte. Der Einfluss von Insulin auf das Zellsystem der humanen proximalen Tubulusepithelzellen ist bislang weder für die Insulinsignaltransduktion noch für Apoptosevorgänge untersucht.

1.5 Insulinsignalkaskade in klassischen Insulinzielgeweben

Die biologische Wirkung des Insulins wird durch spezifische membranständige Rezeptoren aus der Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen vermittelt [22,23]. Insulinrezeptoren sind heterotetramere Glykoproteine mit je zwei α - und β -Untereinheiten, die durch Disulfidbrücken verbunden sind [24]. Die α -

Untereinheiten sind vollständig extrazellulär gelegen und binden Insulin, wodurch eine Konformationsänderung eintritt, die zur Aktivierung einer innerhalb der β -Untereinheiten gelegenen Tyrosinkinase führt [25]. Durch diese Autophosphorylierung kann die Insulinrezeptorkinase Tyrosinreste anderer intrazellulärer Proteine phosphorylieren [26-28]. Hauptsubstrat der Rezeptorkinase ist das 185 kD große Insulinrezeptorsubstrat IRS-1, welches das derzeit am besten charakterisierte Substrat des Insulinrezeptors darstellt [22,29]. Weitere Insulinrezeptorsubstrate sind das IRS-2 [30], IRS-3 [31] und IRS-4 [32], IRS-5 und IRS-6 [43]. Sämtliche Insulinrezeptorsubstrate besitzen Phosphotyrosin-Bindungsstellen, so genannte PTB-Domänen, die eine Bindung an den Insulinrezeptor ermöglichen. Auf diese Weise erfolgt nach Insulinstimulation der Zelle eine Phosphorylierung der IRS-Proteine an Tyrosinresten, die nachfolgend durch eine spezifische, nicht-kovalente Bindung an verschiedene Proteine übertragen wird. Zu solchen Proteinen gehört die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase) [33], die mit ihrer 85 kD-Untereinheit (p85) spezifisch an das phosphorylierte IRS-1 bindet und so ihre katalytische 110 kD-Untereinheit (p110) aktiviert. Hieraus resultierende 3'-Phosphoinositide dienen weiteren Enzymen der Insulinsignalkaskade als Substrate [34,35,38]. Ein Schlüsselenzym, das über den PI3-Kinase-Signalweg aktiviert wird, ist die Proteinkinase B (PKB), die auch als Akt bezeichnet wird [36-38]. Die Aktivierung der Akt vermittelt durch eine Hemmung der Glykogensynthase-Kinase-3 (GSK-3) eine Stimulation der Glykogensynthese [35]. Zudem scheint die aktivierte Akt die für die zelluläre Glukoseaufnahme notwendige Translokation des Glukosetransporters GLUT-4 in die Zellmembran zu beschleunigen [27]. Es werden zudem alternative, ergänzende Signalwege der zellulären insulinstimulierbaren Glukoseaufnahme, z. B. über die Proteinkinase C, diskutiert [39,40]. Akt reguliert zudem die Caspasenaktivität und kann auf diese Weise die Apoptoserate über einen bislang nicht eindeutig geklärten Weg beeinflussen.

1.6 Fragestellung

In Anlehnung an die klinischen und experimentellen Daten, die Hinweise auf einen protektiven Effekt von Insulin auf Apoptosevorgänge in renalen Tubuluszellen geben [12,13,16,17,19], wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob humane Tubulusepithelzellen wesentliche Schritte der aus klassischen Insulinzielgeweben bekannten Insulinsignalkaskade aufweisen und ob Insulin einen Einfluss auf Apoptosevorgänge in diesen Zellen hat. Die Untersuchungen wurden an humanen Zellen, die aus makroskopisch gesundem Nierengewebe im Rahmen von Nephrektomien entnommen und in einem speziellen Zellmodell kultiviert wurden, durchgeführt. Bisher gibt es keine experimentellen Daten zu der Fragestellung in diesem humanen Zellmodell.

Folgende zentralen Fragen sollten in der vorliegenden Dissertation behandelt werden:

- 1. Lassen sich wesentliche Schritte der Insulinsignalkaskade, die in Insulinzielgeweben vorhanden sind, auch in humanen proximalen Tubulusepithelzellen nachweisen?**
- 2. Können durch Insulin Apoptosevorgänge in humanen proximalen Tubulusepithelzellen beeinflusst werden?**

2. Material und Methoden

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien

Acrylamid	BioRad, München
Albumin aus Rinderblut Fraktion V	Biomol, Hamburg
Ammoniumpersulfat	Boehringer Ingelheim, Heidelberg
ATP	Sigma, Deisenhofen
Aprotinin (Trasylol®)	Bayer, Leverkusen
Benzamidin	Sigma, Deisenhofen
BioRad-Eiweißreagenz	BioRad, München
Blockierungsreagenz	Boehringer, Mannheim
Bromphenolblau	Biomol, Hamburg
Dichloressigsäure	Sigma, Deisenhofen
DMSO	Sigma, Deisenhofen
DTT	Biomol, Hamburg
ELISA-Waschpuffer	Cell Signaling
Glycin	Biomol, Hamburg
Glycerol	Apotheke der Uniklinik, Lübeck
HEPES	Biomol, Hamburg
HRP-linked Streptavidin	Cell Signaling,
IGEPAL	Sigma, Deisenhofen
Insulin	Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dänemark
Leupeptin	Sigma, Deisenhofen
Magermilch	Difco, Detroit, USA
Methanol	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, NL
Natriumfluorid	Sigma, Deisenhofen
Natriumpyrophosphat	Sigma, Deisenhofen
Natrium-Vandate	Sigma, Deisenhofen
PBS	Biomol, Hamburg
PMSF	Boehringer, Mannheim
Phosphoinositol	Sigma, Deisenhofen
Pepstatin	Sigma, Deisenhofen
Sample Diluent	Cell Signaling
SDS	BioRad, München
STOP-solution	Cell Signaling
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
TEMED	BioRad, München
TMB Substrate	Cell Signaling
Tris	Biomol, Hamburg
Tween 20	Sigma, Deisenhofen
Wortmannin	

Alle weiteren, nicht aufgeführten Reagenzien wurden von der Firma Merck, Darmstadt, in Analysenqualität bezogen.

2. Material und Methoden

2.1.2. Radioaktive Substanzen

γ -³²P-ATP, 3000 Ci/mmol New England Nuclear, Dreieich

2.1.3 Antikörper

Anti-Phosphotyrosin (monoklonal), PY20-HRP	Transduction Laboratories, Lexington, England
Anti-IRS-1, polyklonal, Kaninchen IgG	Upstate cellsignaling soltuions, Lake Placid, NY
Anti-p85-PI3-Kinase	Upstate cellsignaling soltuions, Lake Placid, NY
Anti-PKB (polyklonal), Kaninchen IgG	New England BioLabs Inc., Beverly, MA, USA
Anti-phospho-Ser ⁴⁷³ -PKB	New England BioLabs Inc., Beverly, MA, USA
Goat anti rabbit – HRP (Polyklonal), Ziege IgG	Dakro, Glostrup, Denmark
Monoklonaler humanspezifischer Anti-Insulin-Antikörper (α IR-1) aus Maus Hybridoma Zellen	American Type Culture Collection, Rockville, USA

2.1.4 Technische Geräte und Zubehör

Arbeitsbench Gelaire Class 100	ABB, Hamburg
Analysenwaagen	Sartorius, Göttingen
Beckmann Mikrofuge II	Beckmann, München
Volumenzentrifuge	Speed Vac SVC 100H
Dual GelCaster Mighty Small Hoefer®	Pharmacia BioTech, San Franzisko, USA
Eppendorf-Pipetten (10, 20, 50, 100, 200, 1000 μ l)	Eppendorf, Hamburg
Gelelektrophoresekammer Hoefer®	Pharmacia BioTech, San Franzisko, USA
Glashomogenisator (5ml)	Braun, Melsungen
Glasplatten für Gelkammern	Pharmacia BioTech, San Franzisko, USA
Homogenisator Potter S	Braun, Melsungen
Heraeus Begasungsbrutschrank B5060EK/CO2	Sepatech, Osterode
Lab Shaker RT WT16	Biometra
Laborschüttler Mixer 5432	Eppendorf, Hamburg
Laborschüttler 4°C KS250	IKA Labortechnik
Mikroskop Olympus CK2	Zeiss, Oberkochen
Netzgerät: Power Supply EPS 601	Pharmacia BioTech, San Franzisko, USA
Photometer Milton Ray	Omnilab, Hamburg
Spectronic 1001 plus	

2. Material und Methoden

Präzisions-pH-Meter Typ S40
Scanner HP 4100C
Vortexer Vibrofixer VF2
Zentrifuge

Knick, Berlin
Hewlett Packard, Deutschland
Jahnke & Kunkel, Staufen
Mikro 22R, Hettich Zentrifugen

2.1.5 Einzelteile Laborbedarf

Sterile Pipetten (5ml / 10ml / 25ml)	Sarstedt, Nürnberg
Röntgenfilme Hyperfilm MP	Amersham, Braunschweig
Mikrotiterplatten (96 Buchten)	Nunc, Wiesbaden
Nitrocelluloseacetat Membranen	Schleicher&Schuell, Dassel
Gel Blotting-Papier GB003	Schleicher&Schuell, Dassel
Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nürnberg
Zell- und Gewebekulturflaschen	Sarstedt, Nürnberg
Spritzenfilter	Millipore, Bedford, USA
Ultrafree-MC 0,45µm Filter-Tubes	Millipore, Bedford, USA
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnberg
Zentrifugenröhrchen 15ml, Spitzboden	Sarstedt, Nürnberg
Zentrifugenröhrchen 50ml, konisch	Sarstedt, Nürnberg
Mikro-Schraubröhrchen 1,5ml	Sarstedt, Nürnberg
Reagiergefäße 1,5ml Safety cap	Sarstedt, Nürnberg
MicroAmp® Optical Tubes	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Protein G –Beads	Pierce, Illinois, USA

2.1.6 Flüssige Materialien für die Zellkultur

Fetal Bovine Serum	Biochrom, Berlin
Penicillin / Streptomycin	Biochrom, Berlin
DMEM Ham's F-12	Biochrom, Berlin
N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamine Medium	
Trypsin / EDTA Solution	Biochrom, Berlin
Phosphate buffered saline pH 7,2	Biochrom, Berlin

2.1.7 Zusammensetzung selbst hergestellter Puffer und Lösungen

Blocklösungen

- 5% BSA, TBS-T + 0,1% Tween
- 5% milk, PBS

Blotting – Puffer

Anode I Tris – HCL 400 mmol/l, 20% Methanol
Anode II Tris – HCL 32 mmol/l, 20% Methanol
Kathode Tris – HCL 400 mmol, 20% Methanol, 80,45 mmol/l ε-Aminocaprinsäure

2. Material und Methoden

Elektroden – Puffer

25 mmol/l Tris-HCL, 190 mmol/l Glycin, 0,1% SDS, pH 8,3

Entwickler A

38 ml Methanol, 43 ml Chloroform, 7 ml Ammoniakwasser, 5 ml H₂O

Krebs-Ringer-Phosphatpuffer

1% BSA, 5 mmol/l Glukose, 40 mmol/l Hepes, 0,3 mmol/l NaCl, 10 mmol/l KCl, 2,5 mmol/l KH₂PO₄, 2,7 mmol/l MgSO₄, 2,7 mmol/l CaCl₂, pH 7,4

Kulturmedium

500 ml DMEM-Ham's-F-12 Medium, 10 ng/ml EGF, 10 nmol/l Insulin, 5 µg/ml Transferrin, 5 ng/ml Natriumselenit, 37,5 ng/ml Hydrocortisone, 40 µg/ml 3,3',5-Triiodo-L-Thyronine, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 15 µl/ml 1M HEPES-Puffer

Laemmli-(Auftrags)-Puffer

4% SDS, 50 mmol/l Tris-HCL, 100 mmol/l DTT, 20 µl Bromphenolblau-1%, 1,6 g Glycerol, 10 ml H₂O, pH 6,8

PBS

8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCL, 0,2 g/l KH₂PO₄, 14,4 g/l Na₂HPO₄*2H₂O, pH 7,4

PBS-T

PBS + 0,01% Tween 20, pH 7,4

Phosphorylierungslösung

5 mmol/l MnCl₂, 10 mmol/l MgCl₂, 0,5 mmol/l CTP, 0,3 µmol/l ATP, 4 mCi ³²P-ATP

Puffer A

50 mmol/l Hepes, 0,2% Rinderserumalbumin (BSA), 0,05% Triton X-100, pH 7,4

Puffer B

100 mmol/l NaCl, 2,5 mmol/l KCL, 1 mmol/l CaCl₂, 20 mmol/l Hepes, 0,5% Triton X-100, 10% Glycerol, 0,1 mmol/l Na-Vanadat, 0,5 % BSA, 0,05% Acid, pH 7,4

Sammelgel 4%

0,67 ml Acrylamid 30%, 1,25 ml Tris-HCL (pH 6,8), 50µl SDS 10%, 3 ml H₂O, 25 µl Ammoniumpersulfat, 25 µl Temed

Solubilisierungspuffer

2,5 mmol/l PMSF, Na-Vanadate, Dichloressigsäure, Aprotinin, Benzamidin, Leupeptin, Pepstatin, pH 7,4

TBS

6,95 g/l Tris-HCl, 8,76 g/l NaCl, pH 7,5

2. Material und Methoden

TBS-T

TBS + 0,01% Tween 20, pH 7,5

TCA-Lösung

10% TCA, 10 mmol/l Na₂HPO₄

Trenngel 7,5%

3,13 ml Acrylamid, 3,13 Tris-HCl (pH 8,8), 6,05 ml H₂O, 3,125 ml SDS 10%, 125 µl APS, 6,3 µl Temed

Waschpuffer A

0,1 mol/l NaCl, 2,5 mmol/l KCl, 20 mmol/l Hepes, 1% BSA, 10% Glycerol, 0,05% IgPal, 2 mmol/l Vanadate, pH 7,4

Waschpuffer B

0,05% Triton x-100, 100 mmol/l NaCl, 2,5 mmol/l KCl, 1 mmol/l CaCl₂, 20 mmol/l HEPES, 0,5% BSA, 10% Glycerol; pH 7,4

2.1.8 Zellen

Humane renale Tubulusepithelzellen (TEZ) wurden nach Tumornephrektomien, die in der Klinik für Urologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, durchgeführt wurden, aus makroskopisch gesundem Nierengewebe gewonnen (Ethikantrag Aktenzeichen 28/93). Hierzu wurde nach Organentnahme ein Längsschnitt durch das gesamte Organ durchgeführt, um das Gewebe makroskopisch beurteilen zu können. Bei klar abgrenzbarem Tumor wurde anschließend ein etwa 2 cm x 2 cm x 0,5 cm großes Stück aus makroskopisch gesundem Gewebe an einem der Nierenpole entnommen und in ein steriles Gefäß mit *Kulturmedium* überführt. Anschließend erfolgte die Isolierung und Kultivierung der Zellen [44]. Die verwendeten humanen proximalen Tubulusepithelzellen wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Dr. Martin Nitschke / Dr. Wolfram Jabs, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, kultiviert und für nachfolgende Untersuchungen der Immunmodulation und von biologischen Insulineffekten verwendet.

2.2 Methoden

2.2.1 Kultur von humanen Tubulusepithelzellen der Nierenrinde

Die Kultur der Tubulusepithelzellen erfolgte unter Verwendung von DMEM-Ham's-F-12 Medium (Bio Whittaker, Heidelberg). Um ein adhärentes Zellwachstum zu fördern, wurde die Oberfläche der Kulturflaschen zunächst mit 5 ml fötalem Kälberserum (FCS) für 1 Stunde bei Raumtemperatur benetzt. Anschließend wurden Zellen der 1. – 3. Passage der Zellkultur aus flüssigem Stickstoff aufgetaut und in Medium resuspendiert. Der FCS-Film in der Kulturflasche wurde durch Abkippen entfernt und 20 ml DMEM-Ham's-F-12 Medium (37°C) sowie nachfolgend jeweils 1 ml Zellsuspension in die Flasche gegeben. Es folgte eine Kultur der adhären wachsenden Zellen in einem Brutschrank bei 37°C und 4,8% CO₂. An jedem zweiten Tag wurde das Medium gewechselt und eine mikroskopische Beurteilung des Zellwachstums durchgeführt.

Bei geschlossenem Zellrasen wurde dieser in ein neues Gefäß überführt. Hierzu wurde das Medium entfernt, der Kulturflaschenboden zunächst zweimal mit PBS gespült und anschließend mit 0,6 ml Trypsin pro 10 cm² für 2-4 Minuten bei 37°C inkubiert. Nachdem sich die Zellen vom Gefäßboden gelöst hatten, wurde die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt und das Trypsin durch Zugabe von 6 ml FCS inaktiviert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation der Zellsuspension für 8 Minuten bei 22°C mit 1000 Umdrehungen pro Minute. Um das Trypsin vollständig zu entfernen und somit ein optimales Zellwachstum zu ermöglichen, wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet erneut mit Medium resuspendiert und dann ein zweites Mal zentrifugiert.

Vor Beginn einer Versuchsreihe wurden die Zellen mindestens eine Woche in Kultur belassen. Hierfür wurden die Zellen nach einer Kultur in zunächst 25 cm² und 75 cm² großen Zellkulturflaschen in 100 x 20 mm großen Petrischalen mit jeweils 10 ml Kulturmedium kultiviert. Für die Versuche wurden Zellen zwischen der 4. und 6. Passage verwendet. Es ist bekannt, dass bei kontinuierlich fortgeführter Kultur das Risiko steigt, in späteren Passagen Zellen zu kultivieren, die nicht mehr die

2. Material und Methoden

Eigenschaften der ursprünglichen Zellen besitzen. Daher wurden Zellen in der 2. und 3. Passage durch langsame Temperatursenkung auf -80°C in DMEM-Ham's-F-12 Medium plus DMSO eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. So konnte für jeden der durchgeführten Versuche die Zellen neu angezüchtet werden.

2.2.2 Zellkultur mit Insulinmangelmedium

Die Zellen wurden zunächst in einem Medium mit Normalinsulin kultiviert. Das Insulin wurde in einer Konzentration von 1 ng/ml mit Krebs-Ringer-Phosphatpuffer verdünnt, so dass im Inkubationsmedium eine Endkonzentration von 10 nmol/l Insulin erreicht wurde. Bei konfluentem Zellwachstum wurde das Kulturmedium abgesaugt und gegen Kulturmedium, das entweder 10 nmol/l oder kein Insulin (Mangelmedium) enthielt, ausgetauscht. Nach einer Kultur über 24 bzw. 48 Stunden mit Insulinmangelmedium oder einem Kulturmedium mit Insulin, wurde das Medium entfernt und die Zellen jeweils über 0 oder 5 Minuten mit 100 nmol/l Insulin stimuliert.

2.2.3 Inkubation der Zellen mit Insulin und Camptothecin

Es wurde zunächst eine Stammlösung des Apoptoseinduktors Camptothecin angefertigt, indem 50 mg Camptothecin Trockensubstanz in 2 ml DMSO durch Schütteln gelöst wurden. Anschließend wurde durch Zugabe von 10 μl Camptothecin-Stammlösung in 9,99 ml Kulturmedium eine Verdünnungslösung mit einer Endkonzentration von 2 mmol/l Camptothecin hergestellt. Zusätzlich erfolgte die Herstellung einer Insulin-Verdünnungslösung durch Zugabe von Krebs-Ringer-Phosphatpuffer in geeigneter Menge (Endkonzentration 100 nmol/l Insulin). Bei einem annähernd geschlossenen Zellrasen, wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen jeweils für 12 Stunden bei 37°C entweder mit 2 mmol/l Camptothecin oder 100 nmol/l Insulin oder mit 2 mmol/l Camptothecin und 100 nmol/l Insulin inkubiert. Einige Zellen wurden ganz ohne Zusätze mit Kulturmedium in diesem Versuch als Kontrolle und Vergleichswert mitgeführt.

2. Material und Methoden

2.2.4 Inkubation mit Wortmannin zur Blockierung der PI-3 Kinase

Für 1 mmol/l Stammlösung mit einer Wortmannin-Konzentration von 0,1 mmol/l wurde 1 mg Wortmannin in 2,32 ml DMSO aufgelöst. Anschließend wurde diese Lösung im Verhältnis 1:10 mit Kulturmedium verdünnt. Die Zellen wurden mit einer Mischung aus 9,99 ml Kulturmedium und 10 µl der Wortmannin-Lösung (Endkonzentration 100 nmol/l) für 12 Stunden bei 37°C inkubiert. Dann erfolgte die Insulinstimulation wie unten beschrieben.

2.2.5 Insulinstimulation und Solubilisierung der Zellen

Nach 48 Stunden Inkubation mit bzw. ohne Insulin wurde das Kulturmedium gegen Krebs-Ringer-Phosphatpuffer ausgetauscht. Es folgte eine Inkubation für 15 Minuten, um eine Adaption der Zellen an den Puffer zu gewährleisten. Am Ende dieser Vorinkubation wurde der Puffer gegen frischen Krebs-Ringer-Phosphatpuffer ausgetauscht und die Zellen für 0 bzw. 5 Minuten mit 100 nmol/l Insulin stimuliert. Sämtliche Inkubationsschritte erfolgten im Laborschüttler unter Rotation bei 37°C.

Die Stimulation der Zellen mit Insulin wurde durch Abgießen des Zellpuffers, Spülen mit eiskaltem PBS und Eintauchen in flüssigen Stickstoff beendet. Um den Aktivierungsgrad der zellulären Proteine zu erhalten, wurden die Zellen in gefrorenem Zustand auf einer mit Stickstoff gekühlten Metallplatte mit einem eisgekühlten Metallschaber von den Petrischalen gelöst. Der entstandene Eisschnee wurde anschließend sofort mit 0,5 ml Solubilisierungspuffer, der Phosphatase- und Kinaseinhibitoren enthielt, versetzt und durch einen elektrisch getriebenen Homogenisator (Potter) zerkleinert. Um ungelöstes Material und Kunststoffanteile der Petrischale zu entfernen, wurde das Zellsolubilisat für 10 Minuten mit 13.000 U/min bei 4°C zentrifugiert und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Anschließend wurde der Proteingehalt der Proben photometrisch bestimmt.

2.2.6 Proteinbestimmung nach Bradford

Der Proteingehalt der für die SDS-Page (s.u.) eingesetzten Zelllysate wurde mit der Bradford-Methode [45] ermittelt. Die quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration in einer Lösung kann photometrisch mit der Bradford-Methode durchgeführt werden. Diese Methode beruht auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue an Proteine.

Zunächst wurde eine Standardkurve mit verschiedenen Konzentrationen (150 µg/ml, 300 µg/ml, 600 µg/ml, 1200 µg/ml) des Standardproteins Bovines Serum Albumin erstellt. Die Bestimmung des Proteingehalts der zu untersuchenden Proben konnte dann mithilfe dieser Standardkurve erfolgen. Alle Ansätze wurden als Doppelbestimmung durchgeführt. Abschließend wurden die Überstände für nachfolgende Versuche in Eppendorfgefäße aliquotiert (je 200 µl) und bei -80°C tiefgefroren. So konnte das Volumen errechnet werden das 100 µg (Westernblot) bzw. 300 µg (Immunoimmobilisation) Protein enthielt, was für die weiteren Verfahren entscheidend war, um ausreichende und einheitliche Proteinmengen zu garantieren.

2.2.7 Bestimmung der Zellzahl und Viabilität der Zellen

Um zellschädigende Effekte des Insulinmangels zu erfassen, wurden die Zellen jeweils parallel zu einer Versuchsreihe im Anschluss an die 48-stündige Insulinmangelphase fotografiert und die Morphologie der Zellen, die ohne oder mit Insulin inkubiert wurden, miteinander verglichen. Es konnten keine morphologischen Unterschiede zwischen Zellen, die entweder ohne und mit Insulin inkubiert wurden, nachgewiesen werden. Abbildung 1 stellt Fotos der Zellen dar, die ohne (A) oder mit Insulin (B) inkubiert wurden.

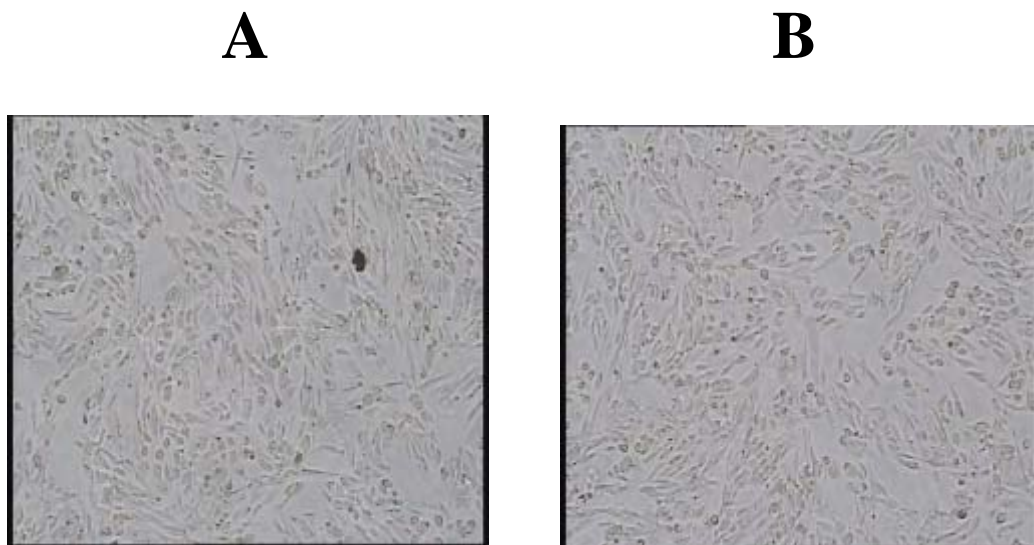


Abb.1: Zellfotografien zur Beurteilung der Zellmorphologie. Die Zellen wurden kultiviert und über 48 Stunden ohne (A) oder mit 10 nmol/l Insulin (B) inkubiert. Anschließend wurde die Morphologie bei 100-facher Vergrößerung mikroskopisch beurteilt.

Zusätzlich zur morphologischen Beurteilung erfolgte eine Bestimmung der Zellzahl und des Anteils abgestorbener Zellen. Hierzu wurden Zellsuspensionen von Zellen, die mit oder ohne Insulin inkubiert wurden, benutzt. Der Suspension wurde 1 ml Trypan-Blau-Lösung zugesetzt, gevortext und für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert, um die toten Zellen anzufärben. Anschließend wurden 10 μ l des Gemisches in eine Neubauerzählkammer pipettiert und zunächst die Gesamtzellzahl durch Auszählen aller Zellen von 4 Quadraten bestimmt. Die Berechnung der Gesamtzellzahl in der Zellsuspension wurde nach folgender Formel durchgeführt:

$$\text{Gesamtzellzahl} = \text{Mittelwert der ausgezählten Zellen pro Quadrat} \times 10000 \times 3$$

Die Berechnung des Anteils toter Zellen erfolgte auf die gleiche Weise durch das Auszählen der blau gefärbten Zellen [77].

2.2.8 Insulinrezeptorkinaseaktivität

Bei Bindung von Insulin an seinen Rezeptor findet eine Konformationsänderung und Aktivierung der Tyrosinkinase der β -Untereinheit statt. Die Tyrosinkinase phosphoryliert ATP-abhängig Tyrosin-Reste und leitet so die intrazelluläre Insulinsignaltransduktion ein.

Für die Messung der Insulinrezeptorkinase- und der Insulinbindungsaktivität wurden Mikrotiterbuchten verwendet, an denen zuvor anti-Insulinrezeptor-Antikörper immobilisiert worden sind [72]. Es wurden jeweils 40 μ l (3,0 mg/ml) Zellsolubilisat in die beschichteten Buchten pipettiert und diese anschließend bei 4°C für 16 Stunden inkubiert. Die Mikrotiterbuchten wurden dann dreimal mit Waschpuffer B gewaschen und mit 10 μ l Phosphorylierungslösung, die radioaktiv markiertes ATP (^{32}P -ATP) enthielt, bestückt. Das ^{32}P -ATP wurde mit hoher spezifischer Aktivität (100-200 Ci/mmol) und niedriger Konzentration (0,5 μ mol/l) verwendet, um eine Autophosphorylierung und damit eine Autoaktivierung der Rezeptoren während der Messung zu verhindern.

Anschließend wurde die rezeptorvermittelte Phosphatinkorporation in ein synthetisches Polymer, das aus 80% Glutaminsäure und 20% Tyrosin (Poly-GluTyr) bestand, gemessen [71]. Abhängig vom „in situ“ erreichten Aktivitätszustand der Rezeptorkinase wurde das ATP zu ADP + ^{32}P gespalten und das Poly-GluTyr im Überstand der Buchten phosphoryliert. Nach 20 Minuten Phosphorylierungszeit wurde der Einbau des ^{32}P durch Zugabe von 100 mmol/l nicht markiertem ATP gestoppt. Der Inhalt der Buchten wurde anschließend jeweils auf ein 1,5 cm² großes Whatman-Papierplättchen pipettiert und die Papierplättchen in einem Schüttelbad mit eiskalter zehnpromzentiger TCA-Lösung fünfmal über 10 Minuten gewaschen. Durch diesen Vorgang wurde das Poly-GluTyr in den Papierplättchen ausgefällt und die übrigen Bestandteile aus dem Überstand der Buchten entfernt. Die luftgetrockneten Papierplättchen wurden danach in kleine Plastikflaschen mit je 5 ml Szintillationsflüssigkeit gegeben und anschließend die β -Strahlung der Plättchen in einem Zählgerät bestimmt.

2.2.9 Berechnung der an humanspezifischen Insulinrezeptor-Antikörper gebundenen Kinase- und Insulinbindungsaktivität

Die Tyrosinkinaseaktivität der in den Mikrotiterbuchten immobilisierten Rezeptoren wurde als Phosphattransfer in das Substrat Poly-GluTyr pro Zeiteinheit berechnet. Für die Berechnung des Phosphattransfers in das Substrat Poly-GluTyr waren die eingesetzte Konzentration des ^{32}P -ATP (KATP) und das Volumen der Phosphorylierungslösung (PV) bekannt. In einem Zählgerät (Meßwert cpm = counts per minute) wurden die Gesamtradioaktivität, die pro Messpunkt eingesetzt wurde (cpm total count) und die spezifischen Zahlimpulse des ^{32}P -ATP, das durch die Kinasereaktion in das Poly-GluTyr inkorporiert wurde (cpm Substrat), bestimmt. Die Radioaktivität, die sich im Substrat nach Inkubation in Buchten, in denen kein Insulinrezeptor immobilisiert worden war, befand (cpm Hintergrund), wurde als nichtspezifischer Anteil von der Radioaktivität, die im Substrat nachgewiesen wurde, abgezogen. Anhand der bekannten ATP-Konzentration (KATP), des Volumens (PV) und der im Zählgerät gemessenen Werte ließ sich nach folgender Formel die Phosphatinkorporation in das Poly-GluTyr in fmol berechnen

$$\frac{(\text{cpm}_{\text{Substrat}} - \text{cpm}_{\text{Hintergrund}}) / \text{cpm}_{\text{total count}} \times K_{\text{ATP}} \text{ (nmol/l)} \times \text{PV} \text{ (}\mu\text{l)}}{\text{Phosphatinkorporation (fmol)}}$$

Die Tyrosinkinaseaktivität wurde nachfolgend auf die Rezeptormenge, die pro Bucht eingesetzt wurde, bezogen. Hierzu wurde in derselben Bucht, in der zuvor die Kinaseaktivität gemessen wurde, die Bindung von ^{125}J -Insulin an die immobilisierten Insulinrezeptoren bestimmt.

Zur Messung der Bindungsaktivität wurden je 30 μl *Puffer A*, der ^{125}J -Insulin sowie nicht markiertes Insulin in einer Konzentration von 7 nmo/l enthielt, in die Buchten pipettiert. Nach 24 Stunden wurden die Buchten mit *Puffer B* gewaschen und für 30 Minuten bei Raumtemperatur je 50 μl zweiprozentiger *SDS-Lösung* in die Buchten gegeben, um das in den Buchten gebundene Insulin abzulösen. Nachfolgend wurde

2. Material und Methoden

diese Lösung unter erneutem Spülen der Buchten mit je 50 μl SDS-Lösung aus den Buchten in kleine Plastikflaschen transferiert und die jeweilige Radioaktivität in einem γ -Zählgerät bestimmt. Bei den Versuchsreihen sollten für die Messung der Insulinrezeptorkinaseaktivität und Bindungsaktivität etwa 0,5–10 fmol Insulinbindungsaktivität pro Bucht immobilisiert sein. Teilweise wurde dabei in Vorexperimenten eine Bindungsbestimmung durchgeführt, um durch eine entsprechende Verdünnung oder Konzentration des Materials die gewünschte Bindungsaktivität zu erreichen.

Zur Berechnung der Insulinbindungsaktivität waren bereits die eingesetzte Insulinkonzentration (K_{Insulin}) und das Probenvolumen (PV) bekannt. Zusätzlich wurde die Gesamtradioaktivität pro Messpunkt ($\text{cpm}_{\text{total count}}$) sowie die Radioaktivität, die an die gesamte Mikrotiterbucht, einschließlich der Rezeptoren und nichtspezifischer Bindungsstellen, gebunden hatte ($\text{cpm}_{\text{Bucht}}$) in einem Zählgerät bestimmt. Der Anteil an nichtspezifischer Bindung wurde als die ^{125}J -Insulinbindung, die in Gegenwart von 1700 nmol/l Insulin gemessen wurde, definiert ($\text{cpm}_{\text{nichtspezifisch}}$). Um den Anteil des Insulins, das spezifisch an die Insulinrezeptoren gebunden hatte, zu berechnen, wurde der nichtspezifische Anteil von der Menge, die an die gesamte Bucht gebunden hatte, abgezogen. Über die Gesamtaktivität ($\text{cpm}_{\text{total count}}$), die bekannte Insulinkonzentration (K_{Insulin}) und das Probenvolumen (PV) wurde berechnet, wie viel Insulin bei einer Insulinkonzentration von 8,7 nmol/l an die immobilisierten Rezeptoren gebunden hatte und als Bindungsaktivität in fmol angegeben. 1 fmol Bindungsaktivität war als die Zahl der Rezeptoren, die bei 8,7 nmol/l Insulin und 4⁰ Celsius 1 fmol Insulin binden, definiert (28).

$$\frac{(\text{cpm}_{\text{Bucht}} - \text{cpm}_{\text{nichtspezifisch}}) / \text{cpm}_{\text{total count}} \times K_{\text{Insulin}} \text{ (nmol/l)} \times \text{PV} \text{ (\mu l)}}{\text{Bindungsaktivität (BA) (fmol)}}$$

Die Enzymaktivität der Insulinrezeptorkinase wurde wie folgt als das eingebaute Phosphat (attomol) in das synthetische Polymer pro Minute Insulinbindungsaktivität berechnet [72]: Insulinrezeptorkinaseaktivität = (amol) Phosphatinkorporation / (min * Bindungsaktivität).

2.2.10 Immunoimmobilisation von IRS-1

Zur Untersuchung der IRS-1 Menge, der IRS-1-Phosphorylierung und Assoziation der p85-Untereinheit der PI3-Kinase an das IRS-1 wurde das IRS-1 aus den Zellsolubilisaten immunadsorbiert. Hierzu wurden zunächst 300 µg Protein aus den jeweiligen Proben entnommen und mit 3,2 µg/ml eines polyklonalen anti-IRS-1-Antikörper für 4 Stunden bei 4°C inkubiert und in 10 Minuten-Intervallen für 1 Minute gerüttelt. Die so entstandenen Antigen-Antikörper-Komplexe wurden anschließend an mit Protein G gekoppelte Agarose-Beads gebunden. Dazu wurde die benötigte Menge (je Probe 40 µl) Agarose in drei Waschgängen gereinigt (Zugabe von 1 ml Waschpuffer, Vortexen, 1 Minute bei 6000 U/min zentrifugieren und den Überstand absaugen). Nach dem letzten Waschschrift wurde die Agarose auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt und nachfolgend auf die entsprechende Anzahl Eppendorfgefäße verteilt. Anschließend wurden die Antigen-Antikörper-Solubilisate zugegeben und die Proben bei 4°C über Nacht mit Fortsetzen des Vortexen erneut inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Überstände abgenommen und eingefroren um eine spätere Kontrolle der erfolgten Präzipitation zu ermöglichen. Nach erneutem Waschen der Agarose-Komplexe wurde 60 µl Laemmli-Puffer hinzugegeben und die Proben für 30 Minuten bei 37°C bei kontinuierlichem Rütteln im Thermomixer inkubiert. Die nun gelöste Agarose wurde mithilfe von Filterröhrchen von den Solubilisaten in der Zentrifuge bei 5000 U/min für 10 Minuten, getrennt. Es folgte ein fünfminütiger Kochvorgang der Proben zur vollständigen Denaturierung der Proteine. Anschließend wurden die Proteine in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt.

2.2.11 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS – Page)

Proteine aus den Zellsolubilisaten wurden in Laemmli-Auftragspuffer [Laemmli 1970] gelöst, für fünf Minuten bei 95°C im Thermomixer unter kontinuierlichem Vortexen gekocht und auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Zuvor immunoimmobilisiertes IRS-1 und die IRS-1 assoziierte p85 wurde ohne erneute Zugabe von Laemmli-Auftragspuffer gekocht. Für die Detektion von Phosphotyrosinresten des IRS-1 wurden 2/3 des Probenvolumens auf ein

2. Material und Methoden

Polyacrylamidgel aufgetragen und anschließend im Immunoblot bestimmt. Das andere Drittel der Probe wurde zur Detektion von IRS-1 und der assoziierten p85-Untereinheit der PI3-Kinase auf ein zweites Gel aufgetragen.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem diskontinuierlichen Polyacrylamidsystem nach Laemmli [46]. Hierzu wurde die *Trenngellösung*, die 7,5% Polyacrylamid enthielt, in eine vertikale Laufkammer gegossen und mit destilliertem Wasser überschichtet um die Oberkante des Gels zu glätten. Nach Polymerisation wurde das Wasser abgetupft, ein Kamm, der die Lanes formt, eingelegt und die *Sammelgellösung* aufgetragen, deren Polymerisationszeit bei ca. 20 Minuten liegt. Nach Einbringen der Proben wurde die Elektrophorese bei einem Stromfluss von 30 mA pro Gel für ca. 1,5 Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt.

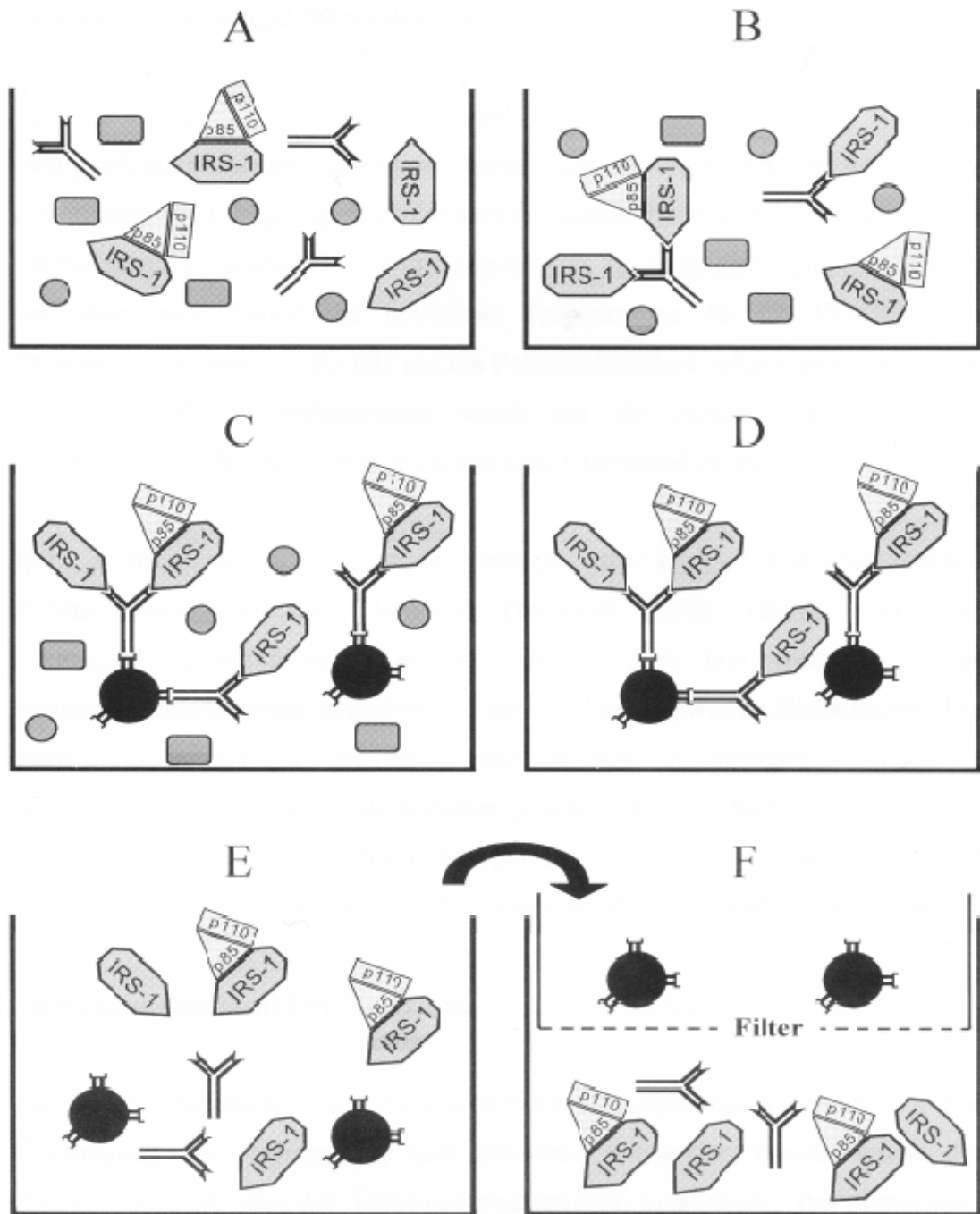


Abb.2: Schema der IRS-1 Immunpräzipitation. Zellslysate wurden zunächst mit einem polyklonalen anti-IRS-1 Antikörper (\llcorner) inkubiert (A), der sowohl nicht phosphoryliertes (IRS-1) als auch phosphoryliertes IRS-1 bindet (B), das wiederum mit der p85-Untereinheit der PI3-Kinase assoziiert sein kann (p85/p110). Die entstandenen Antigen-Antikörperkomplexe wurden dann durch das an Agarose gekoppelte G-Protein (\bullet) gebunden (C). Anschließend wurden die übrigen Lysatproteine (\square , \circ) durch Waschen der Agarose entfernt (D) und das IRS-1 mit Laemmli-Puffer von der Agarose abgelöst (E). Dann wurde die Agarose durch Zentrifugation der Proben im Filterröhrchen entfernt (F).

2.2.12. Immunoblot im Semi-Dry-Verfahren

Um die aufgetrennten Proteine weiter untersuchen zu können, war eine Übertragung der Proteine auf eine Membran notwendig. Hierfür wurde nach erfolgter Elektrophorese das Polyacrylamidgel nach Abtrennung der Sammelphase in eine Blotting-Kammer überführt. Zunächst wurden hierzu fünf Filterpapierstücke und eine Nitrocellulose-Membran passend geschnitten und nach folgendem Aufbau zusammengesetzt: Zwei Filterpapiere wurden in *Blotting-Puffer-Anode I*, eines in *Blotting-Puffer-Anode II* und zwei in *Blotting-Puffer-Kathode* getränkt. Das Gel wurde in *Blotting-Puffer-Anode II* geschwenkt. Die Schichtung erfolgte indem die drei in *Anoden-Puffer I* und *II* geschwenkten Stücke nacheinander luftblasenfrei auf die untere Elektrode (Anode) der Western Blot-Apparatur gesetzt wurden. Dann folgte eine in *Blotting-Puffer-Anode II* getränkte Nitrocellulose-Membran und das Polyacrylamidgel. Abschließend wurden die zwei in *Blotting-Puffer-Kathode* getränkten Filterpapiere aufgeschichtet. Bei jedem Schritt musste auf eine luftblasenfreie Schichtung geachtet werden, um einen optimalen Stromfluss zu gewährleisten. Der Deckel (Kathode) wurde auf die Apparatur aufgesetzt und mit einem Gewicht beschwert. Der Transfer erfolgte bei 0,8 mA/cm² für ca. 2 Stunden.

2.2.13 Detektion der Immunoblots durch Chemilumineszenz

Die Membranen wurden nach dem Blotting in einer Block-Lösung über Nacht bei 4°C inkubiert um die unspezifischen Proteinbindungsstellen zu blockieren. Für IRS-1 und Phosphotyrosin-IRS-1 wurde *PBS* mit 5% Magermilchpulver, für Akt und pAkt-Ser⁴⁷³ *TBS-T* mit 5% BSA benutzt. Am folgenden Tag wurden die Membranen mit Erstantikörpern (in jeweiligen *Blocklösungen* verdünnt) für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Antikörper waren entweder gegen phosphorylierten Tyrosinreste des IRS-1 (1:2000), Akt (1:1000) oder Phospho-Akt-Ser⁴⁷³ (1:1000) gerichtet. Nach mehrmaligem Waschen (2 x 5 Minuten mit *PBS*, 1 x 5 Minuten mit *PBS-T*, 2 x 5 Minuten mit *PBS*) folgte für die Detektion der Akt und pAkt-Ser⁴⁷³ die Inkubation mit einem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper (gegen Kaninchen gerichteter IgG-Antikörper, 1:2000 in Blocklösung) für 1 Stunde. Die Membranen wurden danach erneut gewaschen, für

60 Sekunden mit dem Peroxidase-Substrat (ECL-Lösung) überschichtet und anschließend gegen einen Chemilumineszenz-sensiblen Film in eine Röntgenkassette gelegt. Im Falle der phosphorylierten Tyrosinreste des IRS-1 kam ein spezieller Peroxidase-konjugierter anti-Phosphotyrosin-Primärantikörper (0,1 µg/ml in Blocklösung, 1:2000) zur Anwendung der direkt im ECL-Verfahren detektiert werden kann. Nach zweistündiger Inkubation folgte ein Waschvorgang (3 x 5 Minuten mit *TBS-T*) und die Detektion mittels ECL-Verfahren.

Beim Nachweis des humanen IRS-1 und der an das IRS-1 assoziierten p85 wurde das beschriebene Verfahren modifiziert angewandt. Die entsprechenden Membranen wurden nach dem Blotting auf Höhe der 105 kD-Bande zerschnitten, um innerhalb derselben Membran sowohl das IRS-1 (185 kD) als auch die assoziierte p85-Untereinheit der PI3-Kinase (85 kD) mit zwei jeweils spezifischen Antikörpern nachzuweisen. Die Membranen wurden gewaschen (2 x 5 Minuten *PBS*, 1 x 5 Minuten *PBS-T*, 2 x 5 Minuten *PBS*) und für 2 Stunden mit den Primärantikörpern bei Raumtemperatur inkubiert (IRS-1 → 0,75 µg/ml Blocklösung; p85→1:2000). Nach gleichem Waschvorgang erfolgte die Inkubation mit dem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper (gegen Kaninchen gerichteter IgG-Antikörper, 1:2000 in Blocklösung) für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur und abschließender Nachweis im ECL-Verfahren.

2.2.14 Bestimmung der Caspase-3-Aktivität

Die Bestimmung der Caspase-3-Aktivität erfolgte mit Hilfe eines kommerziell erworbenen Sandwich-ELISA-Kits. Die Aktivität des Enzyms wird bei dieser Methode durch eine photometrische Reaktion nachgewiesen. Die Zellen wurden zunächst kultiviert und, wie unter Punkt 2.2.3 beschrieben, mit Insulin und Camptothecin behandelt. Um den ELISA anwenden zu können, mussten die Zellen nach durchgeführtem Experiment mit einem speziellen, im Kit enthaltenen Lysispuffer solubilisiert werden. Anschließend wurde jeweils 100 µl Zelllysat mit 100 µl Diluent-Lösung (Sample Diluent) versetzt und für einige Sekunden gevortext. Die Mikrowell-Platte wurde zeitgleich auf Raumtemperatur gebracht. In jede der Vertiefungen, die mit einem Anti-Caspase-3-Antikörper beschichtet waren, wurden

2. Material und Methoden

100 µl der Diluent-Lysat-Gemische gefüllt und für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden die Diluent-Lysat-Gemische entfernt und die Wells mit ELISA-Waschpuffer in mehreren Schritten gespült. Dabei blieb die Caspase-3 an dem speziellen Antikörper am Boden der Wells haften. Zu diesem Antikörper-Enzym-Komplex wurden nun 100 µl eines anti-Caspase-3-Antikörpers hinzugefügt und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend folgte wieder ein wiederholter Waschvorgang. Es wurde dann ein mit Peroxidase-konjugierter Sekundärantikörper (HRP-linked Streptavidin) in die Buchten gegeben und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Wieder erfolgte ein wiederholter Waschvorgang. Nun wurde dem Antikörper-Enzym-Antikörper-Komplex das Peroxidase-Substrat (TMB Substrate) hinzugefügt und eine letzte Inkubationszeit für 10 Minuten bei 37°C schloss sich an. Zum Stoppen der enzymatischen Reaktion wurde dann eine Stopp-Lösung (Stop Solution) in die Buchten pipettiert. Die photometrische Reaktion wurde sichtbar. Die genaue Auswertung der Mikrowell-Platte erfolgte mittels eines Plattenphotometers bei 405 nm.

2.2.15 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse wurden als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Der SEM wurde aus der Standardabweichung der Einzelwerte dividiert durch die Quadratwurzel des Stichprobenumfanges minus 1 berechnet. Die Normalverteilung der Messwerte wurde im Kolmogorov-Smirnov-Test geprüft. Die Immunoblots zur Messung der Phosphorylierung von IRS-1 und PKB sowie der Mengen von IRS-1, PKB und der assoziierten PI3-Kinase wurden für den gesamten Zeitverlauf alle in einem einzigen Experiment pro Parameter durchgeführt. Die Auswertung der Proteinbanden erfolgte mit einem Scanner der Firma Hewlett Packard (6100c) und dem Programm „Molecular Analyst“ der Firma BioRad. Für die Bestimmung der Signalproteine waren mehrere Experimente notwendig, so dass für jeden gemessenen Parameter Immunoblots aus verschiedenen Experimenten miteinander verglichen werden mussten. Da die Intensität der Banden von Experiment zu Experiment variierte, ist ein direkter Vergleich der densitrometrisch gemessenen Werte unzulässig. Daher wurde innerhalb jedes Experimentes zunächst der densitrometrische Mittelwert aller 6 Banden eines Immunoblots (3 Zeitpunkte

2. Material und Methoden

jeweils mit und ohne Insulin) bestimmt und anschließend der densitrometrische Wert jeder einzelnen Bande auf den densitrometrischen Mittelwert bezogen. Die daraus resultierenden Werte wurden dann als „relative Einheiten“ (AU) angegeben. Dadurch war es möglich die Ergebnisse der einzelnen Experimente miteinander zu vergleichen. Da die Messergebnisse normalverteilt waren (Kolmogorov-Smirnov-Test, SigmaStat, SPSS Inc.), wurden die Unterschiede der Werte zwischen Zellen, die mit Insulin behandelt wurden, mit Zellen, die nicht mit Insulin vorbehandelt waren, mit dem T-Test für nicht gepaarte Stichproben analysiert (SigmaStat, SPSS Inc.). P-Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1 Zellzahl und Viabilität

Nach Insulinmangel wurde die Zellzahl und Viabilität der Tubulusepithelzellen mittels Trypan-Blau untersucht und das mikroskopische Erscheinungsbild der Zellen analysiert. Nach 0 bzw. 48 Stunden Insulinmangel konnten $1,22 \times 10^5 \pm 0,19$ und $1,25 \times 10^5 \pm 0,13$ Zellen/Schale gezählt werden. Davon waren $8,5 \pm 0,16$ und $9,1 \pm 0,12$ % trypanpositive Zellen. Dies zeigt, dass der Entzug von Insulin keinen signifikanten Einfluss auf Zellzahl und Viabilität hat. Zudem konnten zu allen Zeitpunkten keine morphologischen Unterschiede der Zellkulturen nachgewiesen werden.

3.2 Einfluss von Insulinstimulation und/oder –mangel auf die Insulinrezeptorkinase-Aktivität

Nach der Inkubation der Zellen für 0, 24 oder 48 Stunden mit Insulinmangelmedium folgte die Stimulation mit 100 nmol/L Insulin für 0 bzw. 5 Minuten. Bei den nicht-stimulierten Zellen war die Insulinrezeptorphosphorylation um 15% und 25% vermindert. Bei den stimulierten Zellen zeigte sich die Erhöhung der Insulinrezeptorphosphorylation um 270%, 450% und 526%. Die Proteinmenge wurde jeweils parallel mitbestimmt und blieb durch Insulinstimulation und –mangel unverändert (Daten nicht gezeigt).

3.3 Effekte von Insulin auf die IRS-1 Phosphorylierung

Das Signalprotein IRS-1 ist ein Schlüsselprotein der initialen Insulinsignalkaskade [23,49]. Eine veränderte Tyrosinphosphorylierung des IRS-1 kann einen Einfluss auf die Aktivierung verschiedener nachgeschalteter Signalproteine und damit Auswirkungen auf die Insulinweiterleitung und die Apoptosevorgänge in Zellen haben. Daher wurde zunächst mit Hilfe von Immunoblots untersucht, ob Insulin die

3. Ergebnisse

Phosphorylierung des IRS-1 in humanen proximalen Tubulusepithelzellen verändert.

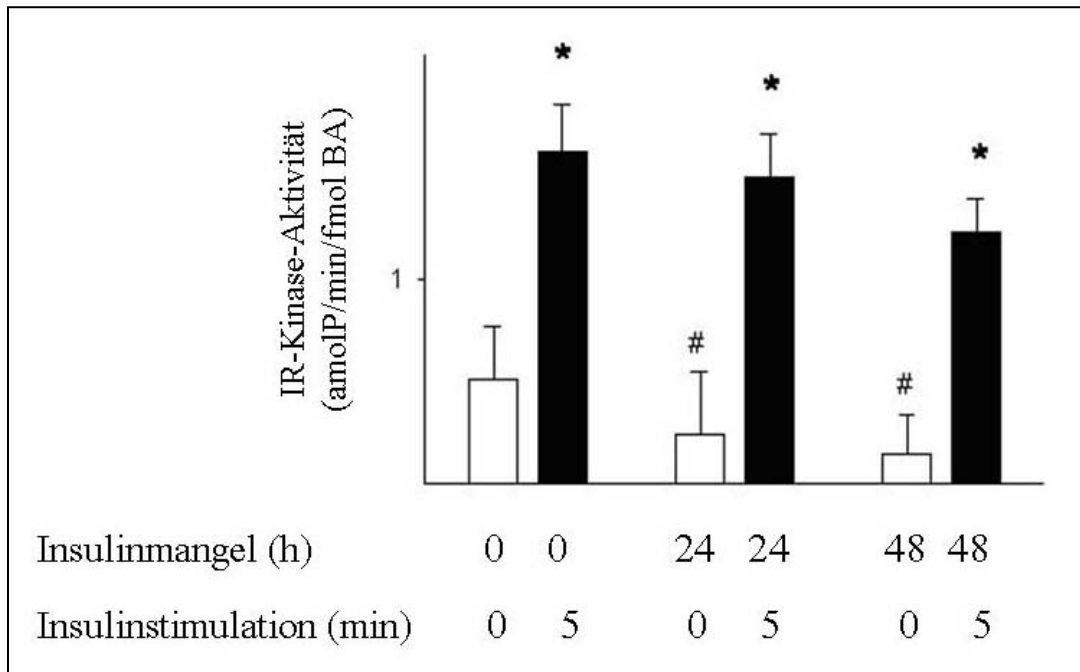


Abb. 3: Einfluss von Insulinstimulation und -Mangel auf die Insulinrezeptor-Kinase-Aktivität. PTEC wurden für 0, 24 oder 48 Stunden einem Insulinmangel ausgesetzt. Anschließend erfolgte die Stimulation mit 100 nmol/L Insulin für 0 (□) bzw. 5 (■) Minuten. Die Insulinbindungsaktivität (BA) wurde analysiert. Die Aktivität der IR-Kinase wurde mittels aufgenommenem attomol Phosphat in ein synthetisches Polypeptid pro Minute und Femtomol gebundenem Insulin ermittelt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM, $n=5$, * = $p < 0,05$ Insulinstimulierte Zellen vs. nicht stimulierte Zellen (Basalwerte); # = $p < 0,05$ Basalwerte der Zellen mit Insulinmangel vs. Basalwerte der nicht bemangelten Zellen.

3.3.1 Messung der Proteinexpression von IRS-1 und der IRS-1 Phosphorylierung

Um zu untersuchen, welche Proteinmengen aus den Zellsolubilisaten für ein Phosphorylierungs- bzw. ein IRS-1-Signal im linearen Messbereich ausreichen, wurden zunächst Verdünnungsreihen für die Phosphotyrosin- (75 bis 1200 μ g Protein) sowie für die IRS-1-Immunoblots (25 bis 400 μ g Protein) erstellt. Diese ergaben für das Phosphotyrosinsignal einen linearen Messbereich bei einer Proteinmenge von 75 bis 600 μ g und für das IRS-1-Signal bei einer Proteinmenge von 25 bis 200 μ g. Aufgrund der Ergebnisse wurde in weiteren Versuchen zum

3. Ergebnisse

Nachweis der Tyrosinphosphorylierung des IRS-1 200 μg Protein und zum Nachweis der IRS-1-Menge 100 μg Protein verwendet.

In jedem Experiment erfolgte jeweils parallel zu der Bestimmung der insulinstimulierten IRS-1 Phosphorylierung die Bestimmung der Menge des zellulären IRS-1, um zu klären, ob eventuelle Veränderungen auf eine verminderte Phosphorylierung oder eine verminderte Proteinmenge zurückzuführen sind.

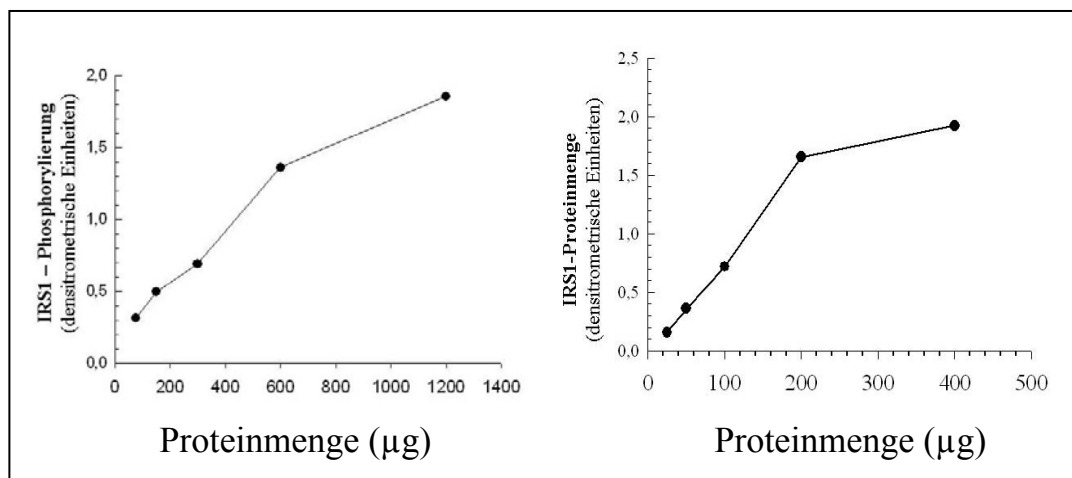


Abb. 4: Abhängigkeit der IRS-1-Phosphorylierung (A) und IRS-1-Menge (B) von der aufgetragenen Proteinmenge. Nach Kultur der Tubulusepithelzellen erfolgte bei beginnender Konfluenz die Stimulation mit 100 nmol/l Insulin für 5 Minuten. Anschließend wurden die Zellen solubilisiert und IRS-1 immunoimmobilisiert und in der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Phosphorylierung des IRS-1 sowie die IRS-1 Menge konnte mit einem monoklonalen anti-Phosphotyrosin-Antikörper bzw. einem polyklonalen anti-IRS-1-Antikörper im Immunoblot nachgewiesen werden. Die densitrometrische Auswertung erfolgte mit einem Scanner. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte, n=2.

3.3.2 Konzentrations-Wirkungsbeziehung und Zeitverlauf der Effekte von Insulin auf die IRS-1 Phosphorylierung

Zunächst musste entschieden werden, welche Insulinkonzentration und welche Inkubationszeit eingesetzt werden sollte, um den Insulineffekt in Tubulusepithelzellen näher charakterisieren zu können. Zur Untersuchung von pharmakologischen Effekten auf zellulärer Ebene werden häufig höhere Konzentrationen als die üblichen therapeutischen eingesetzt.

So wurden in früheren Arbeiten mit HepG2-Zellen Insulin-Konzentrationen von 40 – 100 nmol/l verwendet [47,48].

Im Rahmen einer Dosis-Wirkungskurve wurde der Insulin-Effekt auf die IRS-1-Phosphorylierung untersucht. Nach Inkubation der Zellen mit insulinfreiem Medium über 24 Stunden folgte die Stimulation für 5 Minuten mit verschiedenen Insulin-Konzentrationen. Die in Abbildung 4A dargestellten Untersuchungsergebnisse zeigen, dass eine Inkubation mit 10 nmol/ Insulin die IRS-1 Phosphorylierung um $65,6 \pm 0,23\%$ gegenüber dem Ausgangsniveau steigert. Eine Inkubation mit 100 nmol/l Insulin führt zu einer Zunahme von $122,3 \pm 0,2\%$ und 1000 nmol/l Insulin zu $175,8 \pm 0,25\%$ Zunahme der Tyrosinphosphorylierung. Die IRS-1 Mengen haben sich durch die jeweilige Inkubation mit Insulin nur unwesentlich geändert (Abb. 4B). Einen linearen Bereich findet man zwischen 10 und 100 nmol/l. Um den bestmöglichen Effekt in den Versuchen zu erreichen, wurde im Weiteren 100 nmol/l Insulin zur Stimulation der Zellen verwendet.

Abbildung 5 zeigt die insulinstimulierte IRS-1 Phosphorylierung und jeweilige IRS-1 Proteinmenge bei verschiedenen Stimulationszeiten mit 100 nmol/l Insulin. Die Kurve steigt bis zum Zeitpunkt 5 Minuten auf das 4-fache des Basalwertes steil an und fällt im Folgenden wieder ab.

Aufgrund der Ergebnisse der Dosis-Wirkungskurve und des Zeitverlaufs des Effektes von Insulin auf die IRS-1 Phosphorylierung in humanen Tubulusepithelzellen wurden für sämtliche weitere Versuche eine Insulinkonzentration von 100 nmol/l und eine Stimulationsdauer von 5 Minuten gewählt.

3.3.3 Insulinmangelzeiten

Aus vorangegangenen Versuchen mit anderen Zellreihen [47] ist bekannt, dass es für einen verwertbaren Insulineffekt auf Proteinebene der Insulinkaskade wichtig ist, zunächst den Aktivierungsgrad der Zellen zu reduzieren. Dies geschah durch die Kultivierung mit insulinfreiem Medium für 24 Stunden.

3. Ergebnisse

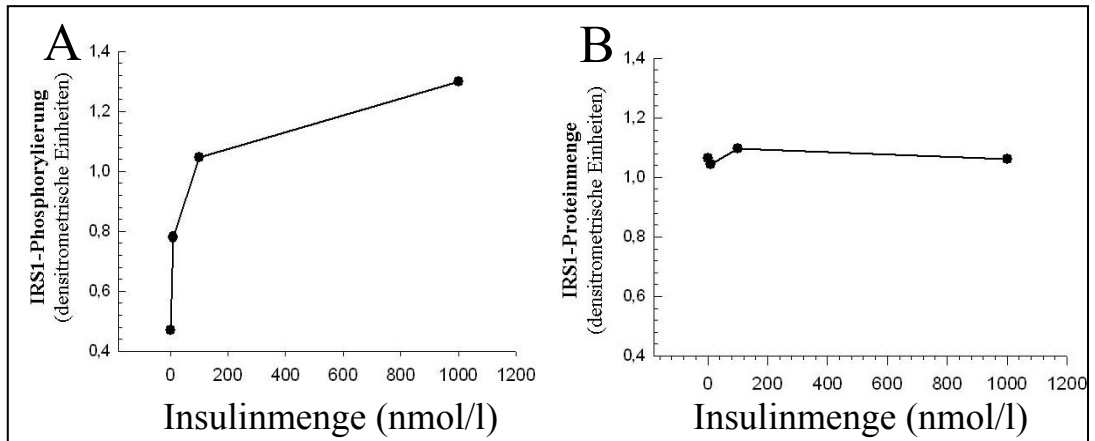


Abb. 5: IRS-1 Phosphorylierung (A) und IRS-1 Menge (B) in Abhängigkeit von der Insulinkonzentration. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit insulinfreiem Medium inkubiert und anschließend für 5 Minuten mit den angegebenen Insulinkonzentrationen stimuliert. Nach Solubilisierung der Zellen und Immunoimmobilisation von IRS-1 folgte die Auftrennung der Proteine mit Hilfe der SDS-Page und die Übertragung der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran im Western Blot. Nach Inkubation der Membranen mit einem monoklonalen anti-Phosphotyrosin-Antikörper bzw. polyklonalen IRS-1-Antikörper wurden die Tyrosinphosphorylierung des IRS-1 bzw. die IRS-1-Proteinmenge durch Chemilumineszenz detektiert. Die Auswertung der Proteinbanden erfolgte densitrometrisch. Gezeigt sind Mittelwerte (n=3).

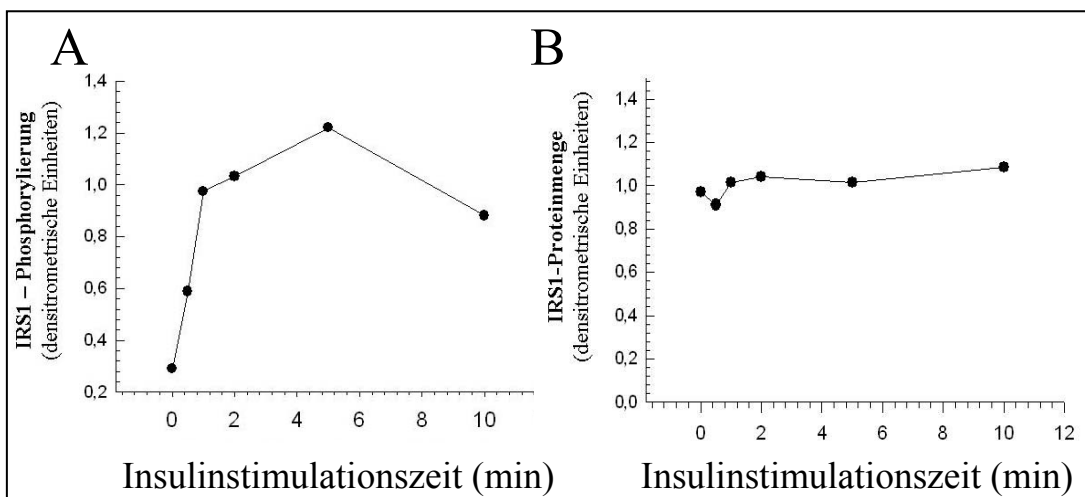


Abb. 6: Abhängigkeit der IRS-1 Phosphorylierung (A) und die IRS-1 Menge (B) von der Insulinstimulationszeit. Tubuluszellen wurden 24 Stunden in insulinfreiem Medium inkubiert und anschließend mit 100 nmol/l Insulin für verschiedene Zeiten stimuliert. Nach Solubilisierung und Immunpräzipitation von IRS-1 folgte die Auftrennung der Proteine in der SDS-Gelelektrophorese und die Übertragung auf Nitrocellulosemembranen im Western Blot. Anschließend wurden die Membranen mit spezifischen Antikörpern inkubiert und die Tyrosinphosphorylierung des IRS-1 (A) sowie die IRS-1 Proteinmenge (B) im Immunoblot durch Chemilumineszenz detektiert. Die Auswertung der Proteinbanden erfolgte densitrometrisch. Gezeigt sind Mittelwerte (n=2).

Für die Versuche wurden außerdem die Zeiten 8, 12, 48 und 72 Stunden getestet. Jedoch führten nur die Zeiten 24 und 48 Stunden zu signifikanten Veränderungen. Daher sind für alle weiteren Versuche die Mangelzeiten von 24 und 48 Stunden verwendet worden.

3.3.4 Insulinstimulierte IRS-1 Phosphorylierung

Die in Abbildung 4 und 5 gezeigten Ergebnisse demonstrieren, dass Insulin zu einer Erhöhung der IRS-1 Phosphorylierung in humanen proximalen Tubulusepithelzellen führt. Um diesen Effekt weiter zu charakterisieren, wurden Tubulusepithelzellen über 24 bzw. 48 Stunden mit insulinfreiem Medium inkubiert und anschließend für 0 bzw. 5 Minuten mit 100 nmol/l Insulin stimuliert. Abbildung 6A zeigt den Verlauf der IRS-1-Phosphorylierung in Zellen mit oder ohne Insulinmangel, die für 0 oder 5 Minuten mit Insulin stimuliert wurden.

Die Grafik 6A zeigt eine Abnahme der IRS-1-Phosphorylierung mit steigender Mangelinkubationszeit sowohl bei stimulierten als auch bei nicht-stimulierten Zellen. Die 24-stündige Mangelzeit führt in den nicht stimulierten Zellen zu einer signifikanten Reduktion der Phosphorylierung um 26%. Der Insulinmangel für insgesamt 48 Stunden reduzierte die IRS1-Phosphorylierung um 59%. In den stimulierten Zellen war die Phosphorylierung nach 24 Stunden um 9%, nach 48 Stunden um 19% gesenkt.

Die Stimulation führte zu allen Zeitpunkten im Vergleich zu den nicht-stimulierten Zellen zu einem signifikanten Anstieg der Phosphorylierung. Bezogen auf die jeweiligen Basalwerte (nicht-stimulierte Zellen) war die Phosphorylierung bei 0 Stunden Insulinmangel von $0,72 \pm 0,08$ AU auf $1,62 \pm 0,1$ AU (95%), nach 24 Stunden von $0,54 \pm 0,04$ AU auf $1,48 \pm 0,09$ AU (289%) und nach 48 Stunden Insulinmangel von $0,3 \pm 0,08$ AU auf $1,33 \pm 0,9$ AU (412%) gesteigert.

Parallel zu der IRS-1 Phosphorylierung wurde die IRS-1 Proteinmenge bestimmt um auszuschließen, dass mögliche Effekte auf veränderte Proteinmengen

3. Ergebnisse

zurückzuführen sind. In Abbildung 6B ist gezeigt, dass die Proteinmenge in den Versuchen zu allen Zeitpunkten nahezu unverändert war.

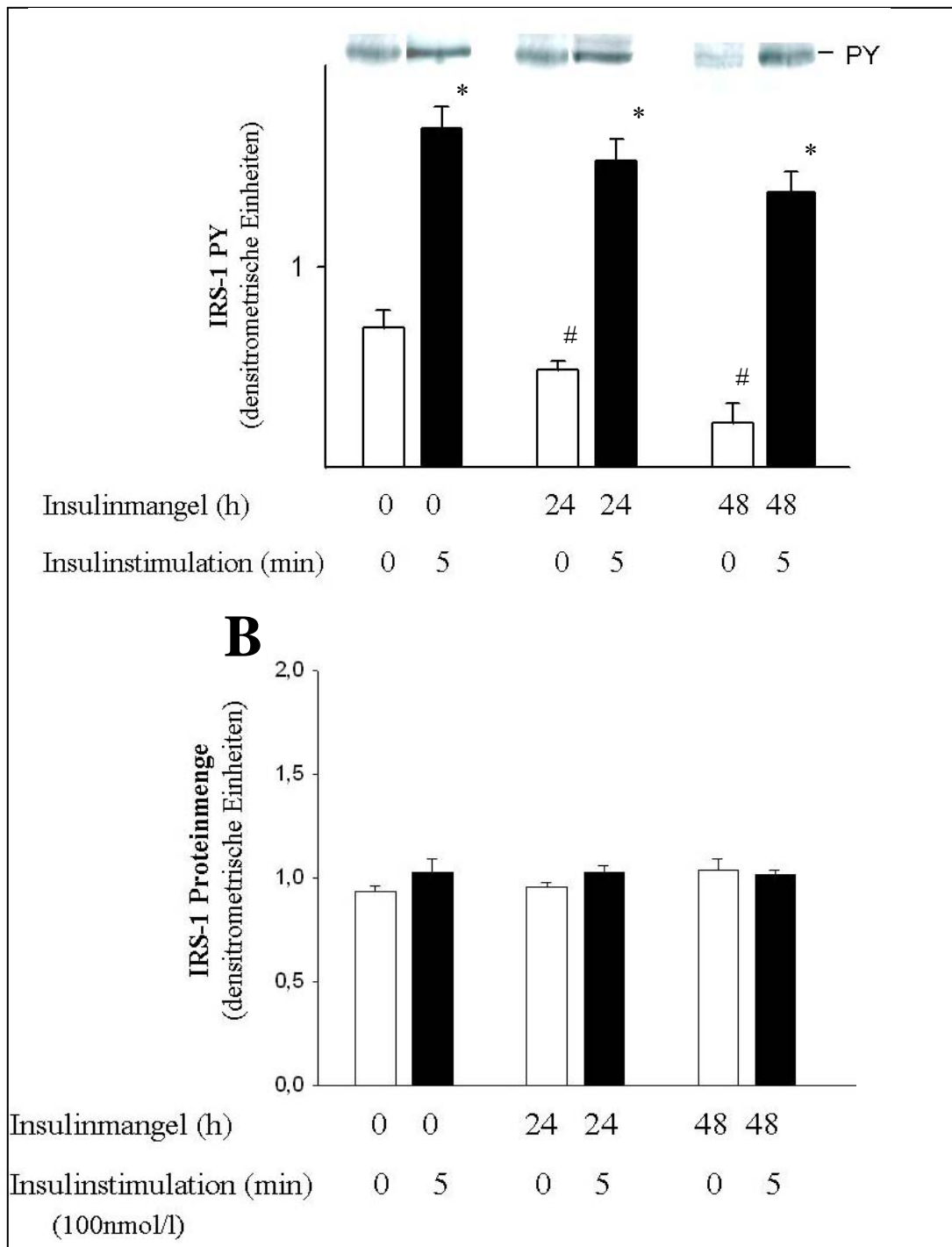


Abb. 7: Abhängigkeit der IRS-1 Phosphorylierung (A) und der IRS-1 Menge (B) von Insulinmangel und -stimulation.

Nach Inkubation der Zellen 0, 24 oder 48 Stunden mit insulinfreiem Medium erfolgte die Stimulation für 5 Minuten mit (□) oder ohne (■) 100 nmol/l Insulin. Die Zellen wurden anschließend solubilisiert und IRS-1 mit Hilfe eines an Agarose gebundenen anti-IRS-1 Antikörpers immunoimmobilisiert. Nach Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE konnte die Phosphorylierung des IRS-1 (A) mit einem monoklonalen anti-Phosphotyrosin-Antikörper sowie die IRS-1 Menge (B) mit einem polyklonalen anti-IRS-1-Antikörper nachgewiesen werden. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM, n=6; * = $p < 0,05$ stimulierte Zellen vs. nicht-stimulierte; # = $p < 0,05$ nicht stimulierte vs. Basalwert.

3.4 Einfluss von Insulin auf die PI3-Kinase

Die PI3-Kinase wird durch die Bindung einer 85kD regulatorischen Untereinheit (p85) an das phosphorylierte IRS-1 aktiviert [50] und leitet das Insulinsignal mit Hilfe einer 110 kD katalytischen Untereinheit (p110) weiter. Die Erhöhung der IRS-1 Phosphorylierung durch Insulin könnte sowohl die Assoziation als auch die Aktivität des Enzyms beeinflussen und damit Auswirkungen auf die weiteren nachgeschalteten Signalwege haben [49]. Aus diesem Grund wurde im Weiteren untersucht, ob ein Insulinmangel und die -stimulation der Tubulusepithelzellen auch die Assoziation der p85-Untereinheit an das phosphorylierte IRS-1 verändert.

3.4.1 Charakterisierung der Versuchsbedingungen zur Bestimmung der insulinstimulierten IRS-1 assoziierten p85

Nach Bestimmung der für die Ermittlung der IRS-1 Phosphorylierung notwendigen Proteinmenge war es ebenfalls notwendig den linearen Messbereich für die p85-Proteinmenge zu charakterisieren.

Die Untersuchungsergebnisse in Abbildung 7 zeigen, dass eine lineare Abhängigkeit zwischen der IRS-1 assoziierten p85-Untereinheit und einer Proteinmenge von 50-200 µg zu finden ist. Aufgrund dieser Ergebnisse bestand die Möglichkeit mit 100 µg Protein die IRS-1 und die p85 in nur einem Experiment zu bestimmen, da diese Proteinmenge für die beiden Parameter einen linearen Messbereich darstellt und für die Western Blots die Membran aufgrund der unterschiedlichen Molekulargewichte von IRS-1 (185 kD) und der p85 (85 kD) zur Inkubation mit den jeweiligen spezifischen Antikörpern durchtrennt werden konnte.

In jedem Experiment erfolgte die Bestimmung der IRS-1 Menge, um mögliche Schwankungen der Messung bei der Immunpräzipitation des IRS-1 zu erfassen.

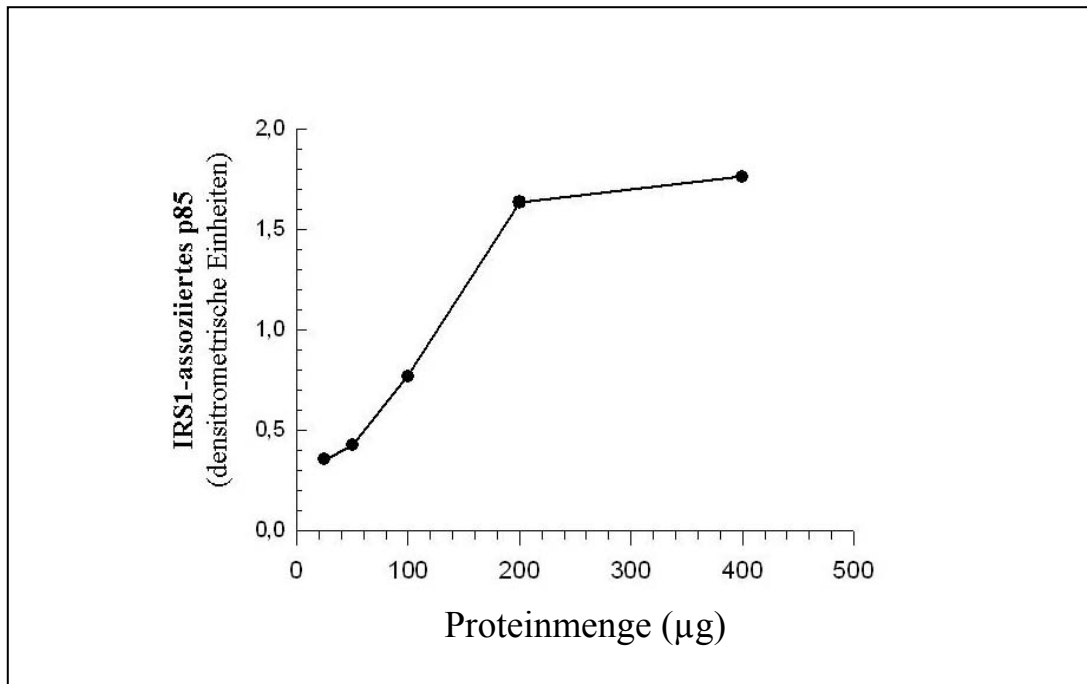


Abb. 8: Assoziation der p85 an das IRS-1 in Abhängigkeit von der verwendeten Probenmenge. Es wurde IRS-1 aus den Zellsolubilisaten bei verschiedenen Proteinmengen immunoimmobilisiert und anschließend mit einem Drittel des Immunpräzipitats eine SDS-PAGE durchgeführt, um das IRS-1 und p85 aufzutrennen. Nach Übertragung der Proteine auf Nitrocellulosemembranen im Western Blot wurden diese in Höhe der 105 kD-Markerbande zerschnitten. Der untere Membranteil wurde mit einem monoklonalen p85-Antikörper vom Kaninchen für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und die p85 anschließend mit einem anti-Kaninchen-Sekundärantikörper durch Chemilumineszenz detektiert. Gezeigt sind Mittelwerte, n=3.

3.4.2 Insulinstimulierte Assoziation der p85 Untereinheit der PI3-Kinase an das IRS-1

In den vorangegangenen Versuchen hat sich gezeigt, dass Insulinmangel und die Stimulation der Tubulusepithelzellen mit 100 nmol/l Insulin für 0 oder 5 Minuten die Assoziation der p85-Untereinheit der PI3-Kinase an das IRS-1 beeinflusst.

Zur näheren Charakterisierung ist in Abbildung 8 der Verlauf der Assoziation der p85-Untereinheit an das IRS-1 in Abhängigkeit von Mangel- und Stimulationszeit der Zellen mit Insulin gezeigt. Mit steigender Insulinmangelzeit sinkt die Assoziation der p85-Untereinheit an das IRS-1.

3. Ergebnisse

Bei den nicht-stimulierten Zellen führte ein Insulinmangel nach 24 Stunden zu einer signifikanten Reduktion der Assoziation von $1,13 \pm 0,09$ AU auf $0,7 \pm 0,13$ AU (24%) und nach 48 Stunden auf $0,41 \pm 0,06$ AU (64%). Ähnlich war bei den für 5 Minuten mit 100 nmol/l Insulin stimulierten Zellen die Assoziation nach 24 bzw. 48 Stunden von $1,6 \pm 0,13$ AU auf $1,17 \pm 0,16$ AU (27%) bzw. von $1,17 \pm 0,16$ AU auf $1,0 \pm 0,07$ AU (38%) signifikant gemindert.

Vergleicht man die nicht-stimulierten mit den stimulierten Zellen, kann man erkennen, dass die Stimulation bei 48-stündigem Insulinmangel einen stärkeren Effekt im Vergleich zu den mit normalem Kulturmedium behandelten Zellen zeigt. So konnte zum Zeitpunkt 0 Stunden durch die Stimulation die Assoziation von $1,13 \pm 0,09$ AU auf $1,6 \pm 0,13$ AU (23%) gesteigert werden. Zum Zeitpunkt 48 Stunden stieg die Assoziation von $0,41 \pm 0,06$ AU auf $1,0 \pm 0,07$ AU (45%) an.

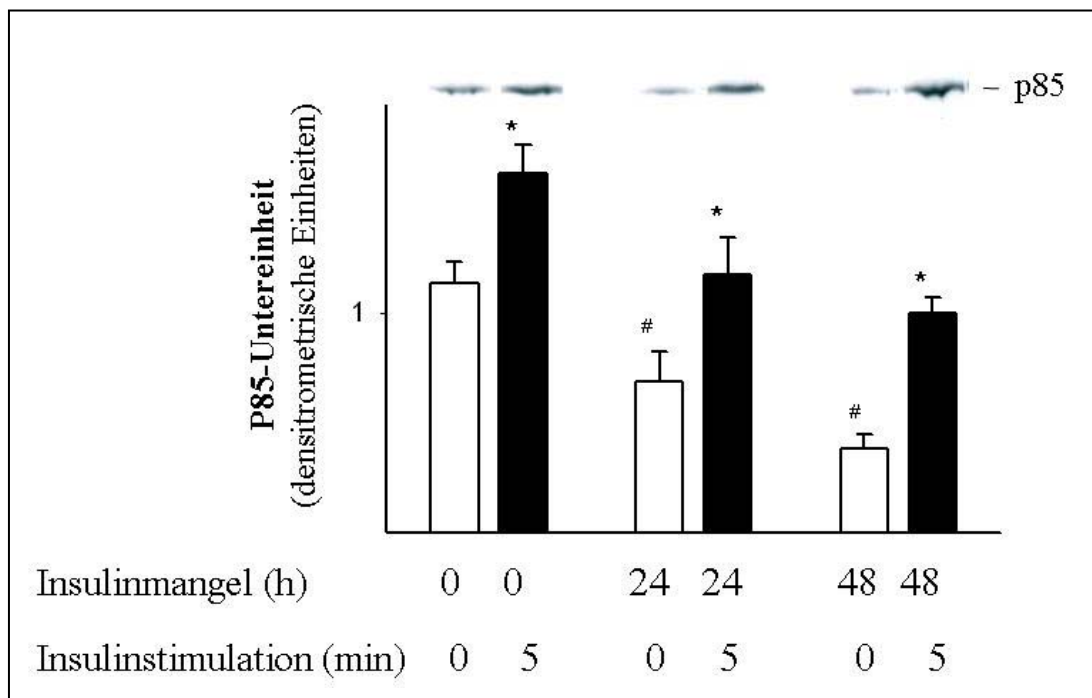


Abb. 9: Insulinstimulierte Assoziation der p85 Untereinheit der PI3-Kinase an das phosphorylierte IRS-1. Tubulusepithelzellen wurden für 0, 24 oder 48 Stunden ohne Insulin inkubiert und anschließend mit 100 nmol/l Insulin für 0 (□) oder 5 Minuten (■) stimuliert. Anschließend erfolgte die Solubilisierung der Zellen und Immunoimmobilisation von IRS-1. Nachfolgend wurden zwei Drittel der immunoimmobilisierten Proteine in der SDS-PAGE aufgetrennt und die p85 mit einem monoklonalen anti-p85-Antikörper im Immunoblot nachgewiesen. Die Auswertung erfolgte densitrometrisch mit einem Scanner. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM, n=6; *= $p < 0,05$ stimulierte Zellen vs. nicht-stimulierte; # = $p < 0,05$ nicht stimulierte vs. Basalwert.

3.5 Einfluss von Insulin auf die Proteinkinase B (Akt) in Tubulusepithelzellen

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass Insulin die ersten Proteine der Insulinsignalkaskade in humanen proximalen Tubulusepithelzellen beeinflusst. Es stellte sich die Frage, ob dieser Effekt auch im weiteren Verlauf der Insulinsignalkaskade nachzuweisen ist. Aus diesem Grunde wurde im Anschluss an die vorherigen Experimente der Aktivierungszustand der Proteinkinase B, einem weiteren wichtigen Signalprotein der Insulinkaskade, untersucht.

Der Mechanismus der Aktivierung der PKB ist komplex und noch nicht vollständig bekannt. Es gilt bislang als erwiesen, dass die PKB durch einen Komplex aus Phosphoinositiden und der Phosphoinositiden-abhängigen-Kinase (PDK1) an den Positionen Thr³⁰⁸ und Ser²⁷³ phosphoryliert wird, was für eine Aktivierung der PKB essentiell zu sein scheint [37].

Für die weiteren Untersuchungen wurde die Ser²⁷³-Phosphorylierung der PKB sowie die PKB Proteinmenge aus Lysaten von Zellen, die mit oder ohne Insulin inkubiert und stimuliert worden sind, im Western Blot bestimmt.

3.5.1 Bestimmung der Proteinexpression der Akt

Ähnlich wie beim Nachweis des IRS-1, der IRS-1 Phosphorylierung und der IRS-1 assoziierten p85 mussten zunächst die Proteinmengen charakterisiert werden, bei denen sich die Phosphorylierung der PKB und die PKB-Menge im linearen Messbereich bestimmen ließen. Abbildung 9 zeigt die Daten der entsprechenden Charakterisierungsexperimente, aus denen sich für die Ser²⁷³-Phosphorylierung der PKB ein linearer Messbereich bei einer Proteinmenge von 10-150 µg ergab. Die Charakterisierung des Messbereiches für die PKB-Menge ergab einen linearen Bereich zwischen 25-150 µg Protein.

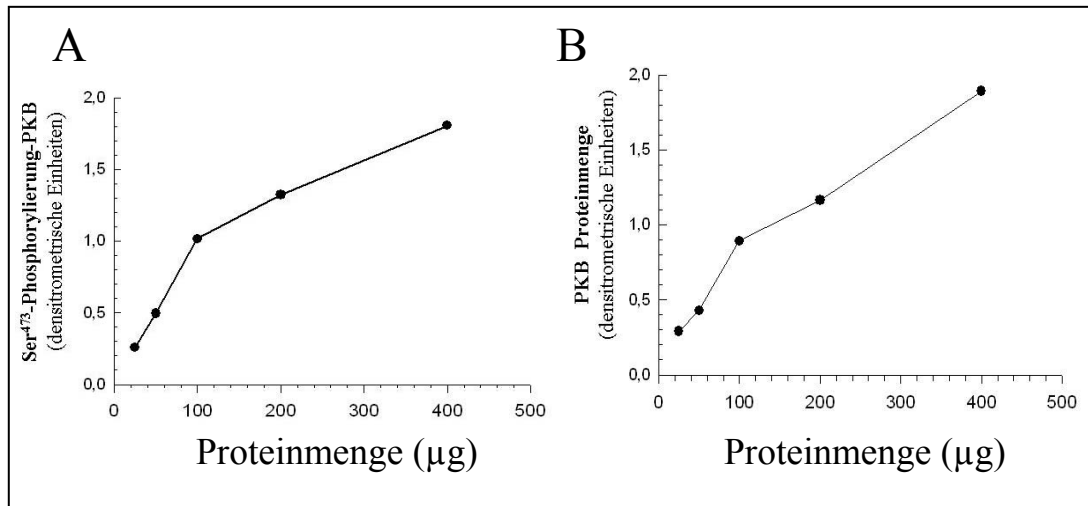


Abb. 10: Abhängigkeit der Phosphorylierung von Ser²⁷³-PKB (A) und PKB-Proteinmenge (B) in Abhängigkeit von der aufgetragenen Probenmenge. Nach Kultur der Tubulusepithelzellen erfolgte bei annähernd erreichter Konfluenz die Stimulation mit 100 nmol/l Insulin für 5 Minuten. Nach Solubilisierung und Proteinmessung wurden verschiedene Proteinmengen (25 µg, 50 µg, 100 µg, 200 µg, 400 µg) der Lysate in der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend in einem Western Blot auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Dann erfolgte die Detektion der entsprechenden Proteinbanden durch Chemilumineszenz. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte, n=2.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden sowohl für die Messung der Ser²⁷³-Phosphorylierung der PKB als auch für die Messung der PKB Proteinmenge 100 µg Protein aus den Lysaten verwendet.

3.5.2 Insulinstimulierte Ser²⁷³-Phosphorylierung der Proteinkinase B

Zur genaueren Charakterisierung des Insulineinflusses auf die PKB wurden Tubulusepithelzellen über 24 oder 48 Stunden mit insulinfreiem Medium inkubiert. Einige Zellen wurden in normalem *Kulturmedium* kultiviert. Anschließend erfolgte die Stimulation für 0 bzw. 5 Minuten mit 100 nmol/l Insulin.

Abbildung 10 zeigt den Zeitverlauf der Ser²⁷³-Phosphorylierung. Die Zellen ohne Insulinmangel zeigen einen deutlich höheren Phosphorylierungsgrad der PKB als die Solubilisate mit 24- oder 48-stündigem Insulinmangel. Bei den nicht-stimulierten Zellen war die Phosphorylierung nach 24 Stunden um 15% und nach 48 Stunden um 46% reduziert. Bei den stimulierten Zellen verhielt sich der Verlauf

der Phosphorylierung ähnlich, jedoch nicht so ausgeprägt. Hier führte der 24-stündige Insulinmangel zu einer Reduktion um 5,5%, nach 48 Stunden um 21%. Dies ist auch dadurch zu erklären, dass, ähnlich wie bei der Assoziation der p85 an IRS-1, der Stimulationseffekt mit längerem Insulinmangel verstärkt ist. So konnte durch Stimulation mit 100 nmol/l Insulin bei 0 Stunden Mangel die Phosphorylierung der PKB um 18%, bei 24 Stunden um 24% und bei 48 Stunden um 45% gesteigert werden.

3.6 Einfluss der Insulinstimulation auf die Caspase-3-Aktivität

Ein Endpunkt der Insulinkaskade ist die Aktivierung des präapoptischen Enzyms Caspase-3. Die Proteinkinase B reguliert über verschiedene Zwischenschritte den Aktivierungsgrad dieses Enzyms. Die Caspase-3 steuert die Apoptose der Tubulusepithelzellen. In einem Cleaved-Caspase-ELISA-Assay wurde die Aktivität der Caspase-3 gemessen. Nach einem Insulinmangel der Zellen für 0, 24 bzw. 48 Stunden und anschließender Stimulation für 0 oder 5 Minuten mit 100 nmol/l Insulin erfolgte die Solubilisierung und anschließend die Messung der Caspase-3-Aktivität im ELISA (s. Material und Methoden, 2.2.11).

Abbildung 12 zeigt, dass ein Insulinmangel die Caspase-Aktivität erhöht und die Insulinstimulation die Aktivität signifikant senken kann. Die mit Camptothecin inkubierten Zellen dienten als Positivkontrolle, um zu zeigen, dass dieser Stoff die Caspase-3 in humanen Tubulusepithelzellen tatsächlich aktiviert. Die nicht-stimulierten Zellen zeigten nach 24 Stunden Insulinmangel eine Aktivitätserhöhung von $0,4 \pm 0,08$ AU auf $0,5 \pm 0,08$ AU (15%). Nach 48 Stunden war diese von $0,5 \pm 0,08$ AU weiter auf $0,7 \pm 0,12$ AU (58%) erhöht. Bei den stimulierten Zellen war ein ähnlicher Effekt zu erkennen. Die Aktivität der Caspase war nach 24 Stunden Insulinmangel von $0,2 \pm 0,08$ AU auf $0,3 \pm 0,06$ AU (30%) und nach 48 Stunden um von $0,3 \pm 0,06$ AU auf $0,5 \pm 0,12$ AU (60%) gegenüber dem Ausgangswert erhöht.

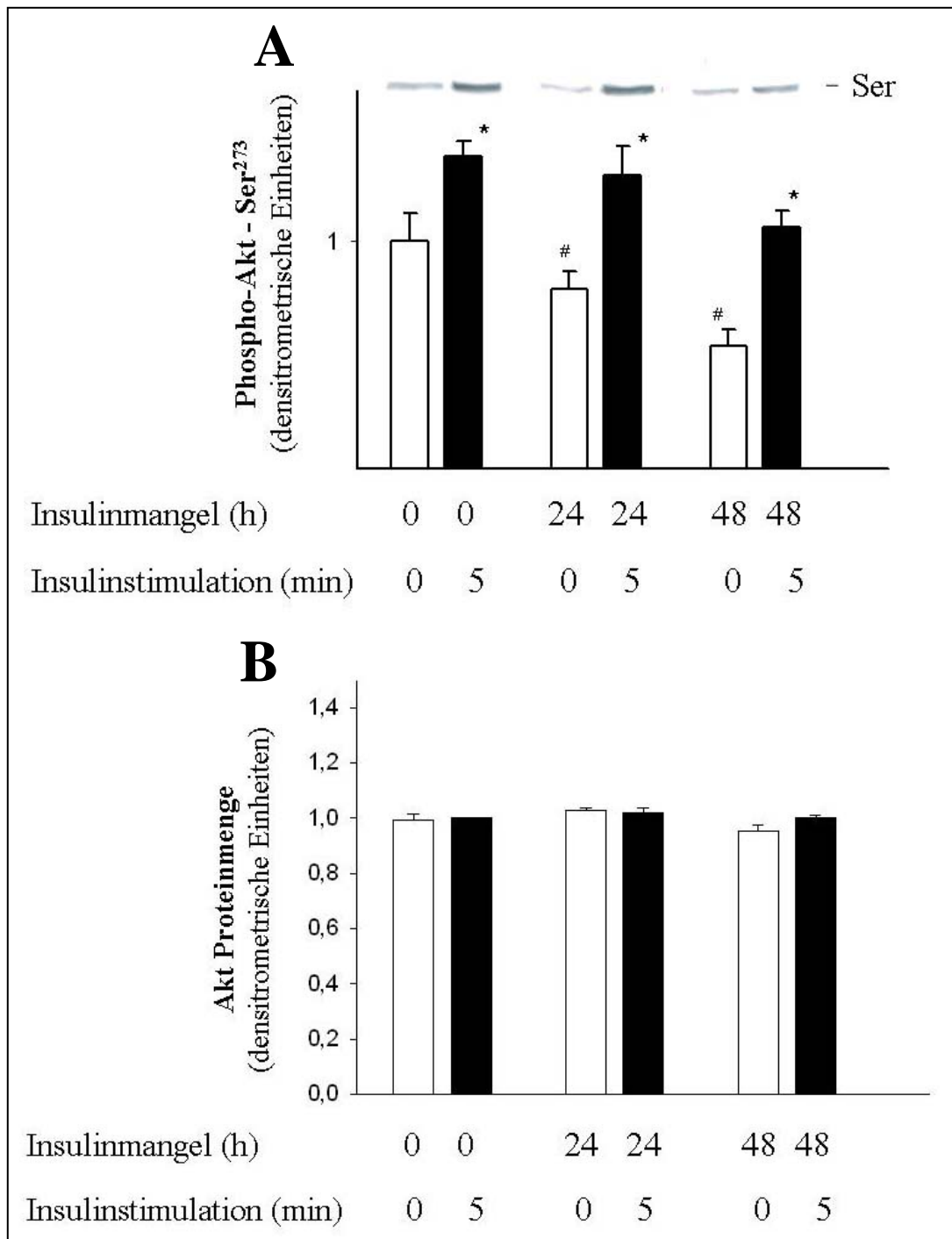


Abb. 11: Ser²⁷³-Phosphorylierung (A) und Akt-Menge (B) in Abhängigkeit von der Insulinmangelzeit und -stimulation. Tubulusepithelzellen wurden für 48, 24 oder 0 Stunden ohne Insulin kultiviert und anschließend mit 100 nmol/l Insulin für 0 (□) bzw. 5 (■) Minuten stimuliert. Nach Solubilisierung erfolgte die Auftrennung von 100 µg Protein in der SDS-PAGE und anschließend im Western Blot der Transfer auf Nitrocellulosemembranen. Die Membranen wurden mit entsprechenden Antikörpern inkubiert um anschließend die Proteine durch Chemilumineszenz nachweisen zu können. Die Auswertung erfolgte densitrometrisch mit einem Scanner. Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM, n=6; *=p<0,05 stimulierte Zellen vs. nicht-stimulierte; # = p < 0,05 nicht stimulierte vs. Basalwert.

3. Ergebnisse

Die Stimulation selbst konnte zu allen Zeitpunkten die Aktivität der Caspase-3 deutlich senken. Vergleicht man jeweils die nicht-stimulierten Zellen mit den mit 100 nmol/l stimulierten Zellen, so konnte zum Zeitpunkt 0 Stunden Insulinmangel eine Aktivitätsreduktion von $0,4 \pm 0,08$ AU auf $0,2 \pm 0,08$ AU (50%) erreicht werden. Nach 24 Stunden reduzierte sich die Aktivität von $0,5 \pm 0,09$ AU auf $0,3 \pm 0,06$ AU (40%) und bei 48 Stunden von $0,7 \pm 0,12$ AU auf $0,5 \pm 0,12$ AU (30%).

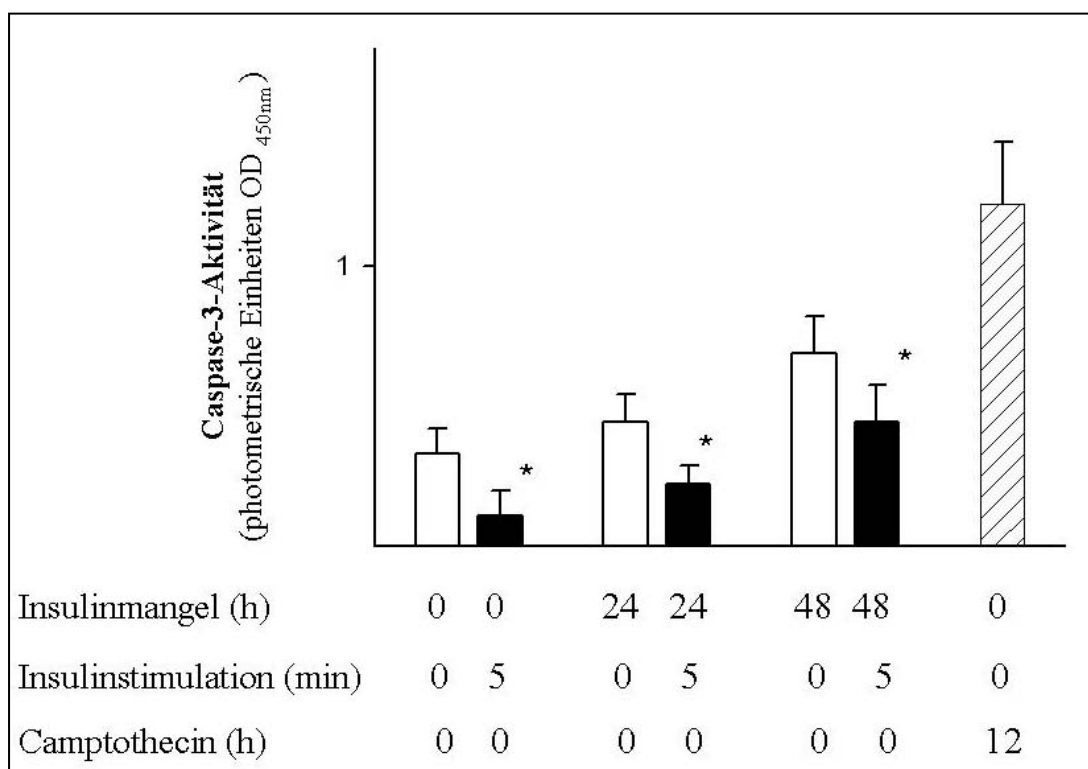


Abb. 12: Caspase-3 Aktivität in Abhängigkeit von Insulinmangelzeit und -stimulation. Tubulusepithelzellen wurden für 48, 24 oder 0 Stunden mit Insulinmangelmedium inkubiert und anschließend mit 100 nmol/l Insulin für 0 bzw. 5 Minuten stimuliert. Nach Solubilisierung wurden 100 µl Zellsolubilisat im ELISA-Cleaved-Caspase Assay analysiert. Die in den Solubilisaten enthaltene Caspase wurde durch Antikörper, die in Mikrotiterbuchten fixiert waren, gebunden. Anschließend erfolgte eine Substratreaktion in mehreren Schritten, die schließlich zu einem Farbumschlag führte. Dieser konnte densitrometrisch gemessen werden. Als Positivkontrolle dienten Zellen, die mit dem Apoptoseinduktor Camptothecin behandelt waren. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM, n=3.

3.6.1 Einfluss der Insulininkubation auf die IRS-1 Phosphorylierung bei gleichzeitiger Apoptoseinduktion durch Camptothecin und Blockierung der PI-3 Kinase durch Wortmannin

Um zu untersuchen, ob Insulin direkt die Apoptosevorgänge in humanen Tubulusepithelzellen vermindern kann, wurde in einem Experiment die Apoptose durch Camptothecin künstlich induziert. Zusätzlich wurde der PI3-Kinase/Akt-Signalweg mittels Wortmannin blockiert. Zellen wurden für 12 Stunden mit 100 nmol/l Insulin und mit bzw. ohne 2 mM Camptothecin oder mit bzw. ohne 100 nmol/l Wortmannin inkubiert. Anschließend wurde die Phosphorylierung des IRS-1 und Akt bestimmt.

Abb. 13 zeigt, dass die Insulininkubation für 12 Stunden die Phosphorylierung des IRS-1 und die Serinphosphorylierung auf das 4-fache des Basalwertes erhöht. Die alleinige Inkubation mit Camptothecin oder Wortmannin verändert die IRS-1 und Akt-Phosphorylierung gegenüber dem Ausgangswert der mit normalem *Kulturmedium* behandelten Zellen nur gering. Bei gleichzeitiger Insulin- und Camptothecininkubation war die IRS-1 Phosphorylierung um 150% und die Akt-Phosphorylierung an Ser²⁷³ um 225 % gegenüber der Werte der nur mit Camptothecin behandelten Zellen erhöht. Bei gleichzeitiger Insulin- und Wortmannininkubation kam es zur Zunahme der IRS-1-Phosphorylierung um 300% und der Akt-Phosphorylierung um 260% im Vergleich zu den jeweiligen Werten der nur mit Wortmannin behandelten Zellen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Insulin trotz Anwesenheit eines Apoptoseinduktors und Blockade eines Schlüsselenzyms Signalproteine der Insulinkaskade aktivieren kann.

Es erfolgte jeweils parallel eine Bestimmung der Proteinmengen (Daten nicht gezeigt), die durch die unterschiedlichen Inkubationsbedingungen nicht wesentlich verändert wurden.

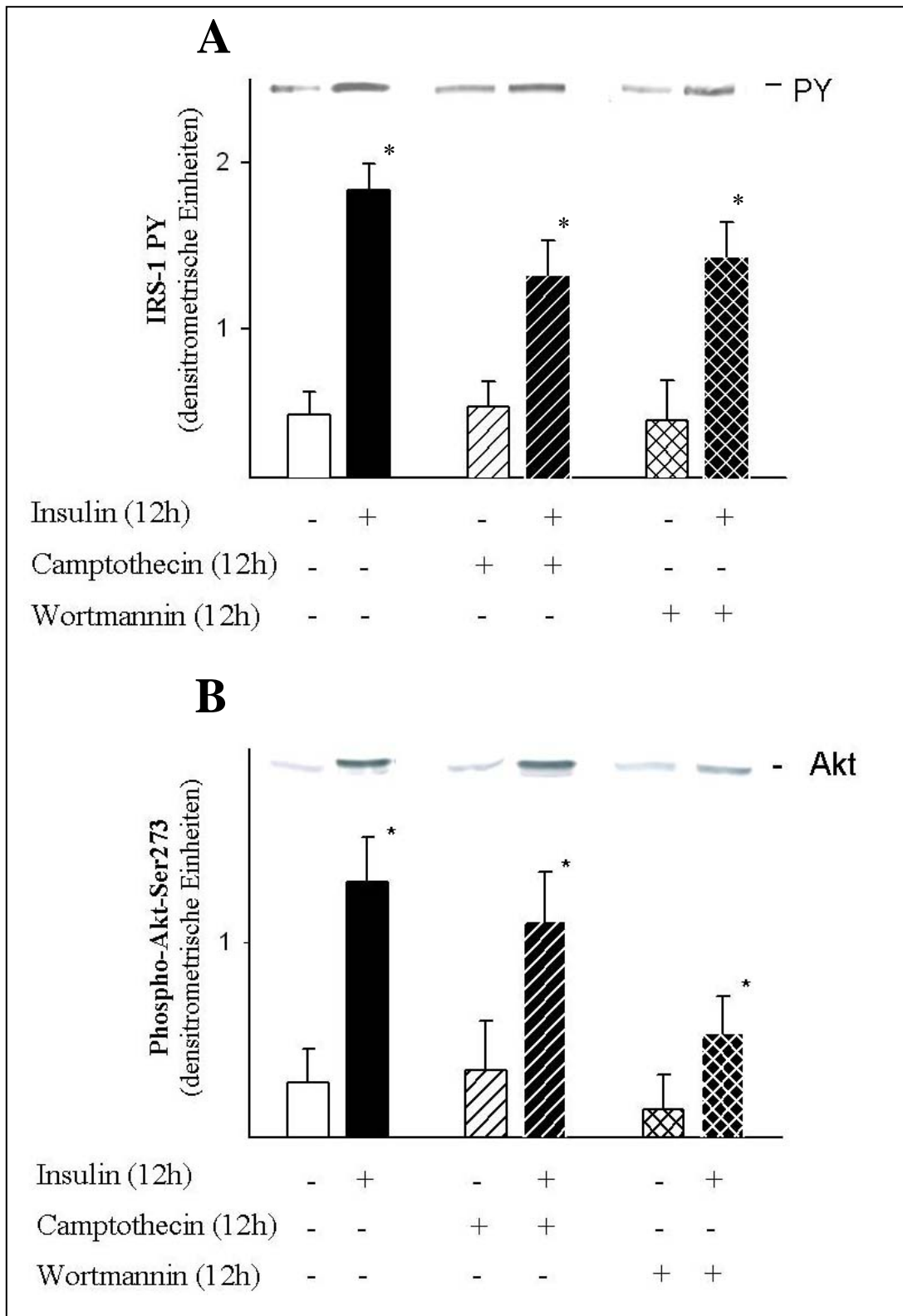


Abb. 13: Einfluss der Inkubation mit Insulin, Camptothecin und/oder Wortmannin auf IRS-1- (A) und Akt-Phosphorylierung (B). Zellen wurden mit bzw. ohne 100 nmol/l Insulin für 12 Std. inkubiert und zusätzlich mit bzw. ohne 2 mM Camptothecin oder mit bzw. ohne 100 nmol/l Wortmannin. Nach Solubilisierung der Zellen erfolgte die Immunoimmobilisation und die Auftrennung in der SDS-PAGE. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM, n=4, * = p<0,05 Zellen mit Insulininkubation für 12 Stunden vs. Zellen ohne Insulininkubation.

3.6.2 Einfluss der Insulininkubation auf die Caspase-3 Aktivität bei gleichzeitiger Apoptoseinduktion durch Camptothecin und Blockierung der PI-3 Kinase durch Wortmannin

Die Untersuchung der IRS-1- und Akt-Phosphorylierung nach Insulininkubation bei gleichzeitiger Apoptoseinduktion durch Camptothecin und Blockade der PI3-Kinase mittels Wortmannin hat gezeigt, dass Insulin trotz forcierter Apoptose IRS-1 und Akt aktivieren kann. Im Folgenden wurde einer der Endpunkte der Insulinkaskade, die Aktivität der Caspase-3, unter gleichen Inkubationsbedingungen untersucht um den möglichen anti-apoptischen Effekt von Insulin nachzuweisen.

In Abbildung 14 ist gezeigt, dass die Insulininkubation zu einer signifikanten Verringerung der Caspasenaktivität führt. Die Inkubation mit Camptothecin bewirkt die höchste Caspasenaktivität in diesem Experiment. Eine parallele Inkubation mit Camptothecin und Insulin reduzierte diesen Wert um 55%. Bei der Inkubation mit Wortmannin findet man eine Erhöhung der Caspasenaktivität um 180% gegenüber dem Basalwert. Diese Erhöhung konnte durch zusätzliche Insulinstimulation nicht signifikant gesenkt werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Inkubation mit Insulin trotz Apoptoseinduktion zu einer deutlich verminderten Aktivität des präapoptisch wirksamen Enzyms führt und Insulin der Apoptose in Tubulusepithelzellen entgegenwirkt.

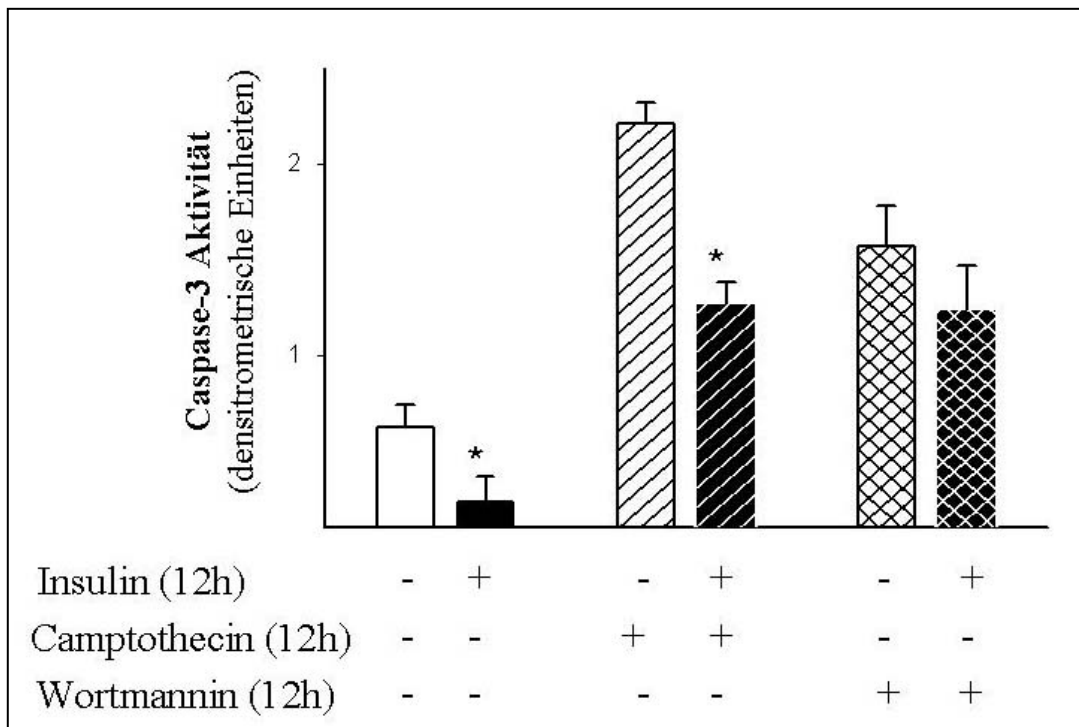


Abb. 14: Abhängigkeit der Caspase-Aktivität von der Inkubation mit Insulin, Camptothecin und/oder Wortmannin. Tubulusepithelzellen wurden über 12 Stunden kultiviert und mit 100 nmol/l Insulin und/oder 2 mM Camptothecin und/oder 100 nmol/l Wortmannin inkubiert. Anschließend erfolgte die Solubilisierung. Jeweils 100 µl Solubilisat wurden in Antikörper-beschichtete Buchten einer 96-Loch Mikrotiterplatte pipettiert. Nach Bindung der Caspase und mehreren Waschschritten folgte eine Substratreaktion die zu einer photometrisch messbaren Reaktion (Farbumschlag) führte. Diese Färbung wurde in einem Photometer bei 450 nm analysiert. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM, n=4, *= p<0,05 Zellen mit Insulininkubation für 12 Stunden vs. Zellen ohne Insulininkubation.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Insulin in humanen proximalen epithelialen Tubulusepithelzellen (PTEC) Apoptosevorgänge beeinflusst und ob ein solcher Effekt über die Insulinsignaltransduktion vermittelt wird. Hierfür wurde zunächst überprüft, ob sich in diesem Zellsystem wesentliche Proteine der Insulinsignalkaskade nachweisen und durch Insulin stimulieren lassen. In einem zweiten Schritt wurde dann untersucht, ob Insulin die Aktivität des Enzyms Caspase-3, das als wesentlicher Effektor der Apoptose in PTEC bekannt ist, reduziert und welche Wege der Insulinsignalkaskade hierbei eine Rolle spielen.

4.1 Nachweis und insulinabhängige Aktivierung wesentlicher Parameter der Insulinsignalkaskade in PTEC

Die Untersuchung der Insulinsignalkaskade konzentrierte sich auf die wesentlichen aus Insulinzielgeweben wie Hepatozyten, Adipozyten oder Skelettmuskelzellen bekannten Regulatoren der Weiterleitung des Insulinsignals [80]. Hierbei handelte es sich um die insulinabhängige Aktivierung der Insulinrezeptorkinase, die IRS-1 Phosphorylierung, die Assoziation der p85-Untereinheit der PI3-Kinase an das IRS-1 und die Ser²⁷³-Phosphorylierung von Akt. Sämtliche oben aufgeführten Proteine waren in den PTEC nachweisbar, die Proteinmengen unterschieden sich hierbei nur unwesentlich von denen, die in humanen Hepatoma G2-Zellen, einem typischen Insulinzielgewebe, nachweisbar sind [48]. Die Stimulation der Zellen mit Insulin über verschiedene Zeiten führte zu einer raschen Anstieg der Aktivierung der Insulinrezeptorkinase, der Tyrosinphosphorylierung des IRS-1, der p85-Assoziation an IRS-1 und der Ser²⁷³-Phosphorylierung der Akt. Die Dynamik sowie die Höhe des Anstiegs der Aktivierung waren vergleichbar mit den Daten, die in Studien zur insulinabhängigen Stimulation der Insulinsignalkaskade in Insulinzielgeweben erhoben wurden [48]. Es konnte somit gezeigt werden, dass die wichtigen Parameter der Insulinsignalkaskade in PTEC exprimiert werden und eine typische Aktivierung der Insulinsignalkaskade, wie sie aus Hauptzielgeweben von Insulin bekannt ist, durch Insulinstimulation erfolgt [48].

4.2 Beeinflussung der Camptothecin-induzierten Apoptose in PTEC durch Insulin

Das Ergebnis, dass die Caspase-3 Aktivität durch einen Insulinmangel über 24 und 48 Stunden stieg, demonstriert, dass die Caspase-3 auf kritische Zustände wie einen Energiemangelzustand als zentraler Effektor von Apoptosevorgängen in PTEC reagiert und, dass die von mir verwendete Methode zum Nachweis der Caspase-3 Aktivität für die weiteren Untersuchungen verwendet werden konnte. Trotz der Insulindeprivation über 48 Stunden konnte eine anschließende kurzzeitige Insulinstimulation über 5 Minuten die Caspase-3 Aktivität wieder signifikant reduzieren. Dieses Ergebnis zeigt, dass durch die Inkubation mit Insulin der Vorgang einer prolongierten zellulären Schädigung wieder teilweise rekompensiert werden konnte.

Nach Bestätigung dieser Vorversuche sollte geklärt werden, ob Insulin auch eine Reduktion der Caspase-3-Aktivität nach vorheriger Induktion einer Apoptose durch Camptothecin induzieren kann. Camptothecin ist ein Apoptoseinduktor, der häufig in experimentellen Versuchen zur Untersuchung zellulärer Apoptosevorgänge eingesetzt wird [73,74]. Wie erwartet, konnte durch Inkubation der PTEC mit Camptothecin ein Apoptosevorgang induziert werden, was mit einer 2-3fachen Erhöhung der Caspase-3 Aktivität sowie einer Reduktion der Zellzahl und Viabilität der Zellen einherging. Durch eine gleichzeitige Inkubation der Zellen mit Camptothecin und Insulin konnten diese Veränderungen signifikant reduziert werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass Insulin Camptothecin-induzierte Apoptosevorgänge in PTEC begrenzt und auf diese Weise zu einem Schutz der Zelle vor einem Zelltod führen kann.

4.3 Beeinflussung Camptothecin-induzierter Apoptosevorgänge in PTEC durch Aktivierung des PI3-Kinase/Akt-Signalwegs

Die insulinabhängige Stimulation der IRS-1- sowie der Akt-Phosphorylierung wurde nicht durch eine Induktion der Apoptose durch Camptothecin verändert. Dieses Ergebnis bestätigt, dass der Ablauf der Camptothecin-induzierten Apoptose nicht durch eine Beeinflussung der frühen Insulinsignalkaskade erfolgt, sondern

vielmehr eine direkte Aktivierung der Caspase-3 eine Rolle spielt [73]. Da der Ablauf der Camptothecin-induzierten Apoptose durch Insulin gehemmt werden konnte, sollte in weiteren Versuchen geklärt werden, welcher Mechanismus diesem Insulineffekt zugrunde liegt.

Bislang gibt es nur wenige Informationen zu einem solchen Zusammenhang und Daten, die humane Nierentubuluszellen betreffen, sind nicht bekannt. Es gibt aber Hinweise aus anderen experimentellen Studien, dass eine Aktivierung des PI3-Kinase/Akt-Signalwegs bei der Beeinflussung von Apoptosevorgängen eine Rolle spielen. So konnten Hiromura et al. an Mesangialzellen der Maus zeigen, dass die Aktivierung des PI3-Kinase/Akt-Signalwegs durch Insulin oder IGF-1 mit einer reduzierten Apoptose infolge UV-Lichtbestrahlung oder Verwendung eines serumfreien Kulturmediums (Induktion eines Hungerzustandes) assoziiert war [16]. Und auch Kulik et al. zeigten, dass eine Inkubation von Rattenfibroblasten mit IGF-1 zu einer Aktivierung der PI3-Kinase/Akt-Phosphorylierung führte und in diesem Zusammenhang eine Hemmung einer UV-Licht-induzierten Apoptose möglich war. Zudem fanden Shimamura et al., dass das Vorhandensein einer dominant-negativen Mutation von Akt in Mesangialzellen das Apoptosesignal verstärkt, während eine dominant-positive Akt-Mutation im gleichen Zellsystem mit einer reduzierten Apoptose, die durch Verwendung eines serumfreien Medium induziert wurde, einherging [15]. Schließlich zeigten Zhuang et al. in renalen proximalen Tubuluszellen des Kaninchens, dass eine Inhibition der PI3-Kinase durch den selektiven Inhibitor Wortmannin mit einer Verstärkung einer H₂O₂-induzierten Apoptose einherging [6]. Da diese Daten auf eine mögliche Rolle des PI3-Kinase/Akt-Signalwegs bei der Beeinflussung von Apoptosevorgängen hinweisen und der PI3-Kinase/Akt-Signalweg einen überragend wichtigen Bestandteil der Insulinsignalkaskade darstellt, habe ich mich bei der Fragestellung, durch welchen insulinabhängigen Mechanismus die Hemmung der Camptothecin-induzierten Apoptose durch Insulin vermittelt wird, auf eine Inhibition der PI3-Kinase durch Wortmannin konzentriert.

Erwartungsgemäß hatte Wortmannin in meinen Untersuchungen keinen Einfluss auf die insulinabhängige Aktivierung der IRS-1-Phosphorylierung, die in der

Insulinsignalkaskade vor der Aktivierung der PI3-Kinase erfolgt, während die insulinabhängige Akt-Phosphorylierung, die der PI3-Kinaseaktivierung nachgeschaltet ist, durch Wortmannin signifikant um ca. 50% reduziert werden konnte. Dieser Effekt einer Reduktion der insulinabhängigen Stimulation der Akt-Phosphorylierung durch den PI3-Kinase-Inhibitor Wortmannin war mit einer signifikanten Erhöhung der Caspasenaktivität um ca. 65% assoziiert. Es konnte auf diese Weise gezeigt werden, dass der insulinvermittelte Effekt auf eine Hemmung der Camptothecin-induzierten Apoptose in einem Zusammenhang mit dem PI3-Kinase/Akt-Signalweg steht.

4.4 Potentielle Rolle von IGF-1 bei der insulinstimulierten Aktivierung des PI3-Kinase/Akt-Signalwegs in PTEC

Der PI3-Kinase/Akt-Signalweg kann sowohl durch Insulin als auch durch IGF-1 aktiviert werden, da die intrazellulären Signalwege des aktivierten Insulin- wie auch des aktivierten IGF-1-Rezeptors die gleichen Signalproteine verwenden und beide Hormone jeweils an den IGF-1- oder Insulinrezeptor binden können. So bindet IGF-1 schon in physiologischer Konzentration an den Insulinrezeptor, während Insulin mit einer niedrigeren Affinität auch an den IGF-1-Rezeptor binden kann [51,52]. In den Studien von Kulik et al. und Hiromura et al. wurden in Fibroblasten der Ratte oder murinen Mesangialzellen Effekte von IGF-1 auf eine Aktivierung des PI3-Kinase/Akt-Signalwegs gefunden, was jeweils mit einer Reduktion einer Apoptose einherging [16,17]. Bei meinen Untersuchungen kann ein Effekt durch IGF-1 auf die Insulinsignalkaskade und das Verhindern von Apoptosevorgängen in PTEC allerdings ausgeschlossen werden, da ich für meine Untersuchungen ein Nährmedium verwendete, das kein IGF-1 enthielt. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass die Inkubation der Zellen mit Insulin zu einer Aktivierung von IGF-1-Rezeptoren und anschließenden Aktivierung des PI3-Kinase/Akt-Signalwegs führte, da humane PTEC IGF-1-Rezeptoren exprimieren [76]. Diese Hypothese hätte allerdings keine klinisch-therapeutische Bedeutung für eine eventuelle Beeinflussung eines akuten Nierenversagens durch Gabe von Insulin, da der Effekt auf die Apoptosevorgänge in den PTEC nicht von den IGF-1 oder Insulinrezeptoren sondern von dem Liganden Insulin abhängt.

4.5 Verbindung des PI3-Kinase/Akt-Signalweg mit der Caspasenaktivität

Es ist unklar, welcher Mechanismus zwischen einer Aktivierung des PI3-Kinase/Akt-Signalwegs und einer Inhibition von Apoptosevorgängen durch eine Reduktion der Caspaseaktivität besteht.

In der Literatur finden sich einige wenige Hinweise auf einen solchen Mechanismus der Signalweiterleitung zwischen Akt und der Caspase-3. Eine Rolle könnte Bad, ein Protein aus der Bcl-2-Familie spielen [81]. Es ist bekannt, dass aktiviertes Akt Bad an einem Serinrest phosphorylieren kann. Nach der Phosphorylierung erfolgt eine Dissoziation von Ser¹³⁶-phosphoryliertem Bad von Bcl-X1 und eine Assoziation an das Adapter-Protein 14-3-3 [41,42]. Das freigegebene Bcl-X1 wiederum fördert das Überleben der Zelle durch eine Inhibition der Caspasen [69, 70]. Hinweise auf diese Art der Signalweiterleitung fanden Kaushal et al. an PTEC von Schweinen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Cisplatin-induzierte Phosphorylierung von Akt mit einer Phosphorylierung von Bad und einer gleichzeitigen Suppression der Caspase-3 und -9 assoziiert war [12,13]. Und auch in einer Studie von Kiley et al. an PTEC von Ratten führte eine Inkubation der Zellen mit IGF-1 zu einer erhöhten Phosphorylierung von Bad [53].

Ein weiterer möglicher Mechanismus der Signalweiterleitung zwischen phosphoryliertem Akt und der Caspase-3 besteht in der Beeinflussung der Regulation von Transkriptionsfaktoren. Brunet et al. konnten zeigen, dass nach einer IGF-1 vermittelten Aktivierung von Akt eine Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors FKHRL1, der als Überlebenssignal für die Zelle entscheidend ist, nachweisbar war [78]. FKHRL1 kann nach Phosphorylierung die Transkription von Todesdomänen z.B. Fas-Liganden inhibieren und so die Aktivierung von Apoptose verhindern. Es ist zudem auch bekannt, dass phosphoryliertes Akt zu einer Aktivierung von NFkappaB, welches selbst die Expression von anti-apoptotischen Proteinen reguliert, führen kann [54]. Diese Effekte auf Ebene von Transkriptionsfaktoren sind vermutlich zellspezifisch und bei PTECs bislang nicht untersucht. Bei meinen Untersuchungen spielen solche Faktoren am ehesten nur

eine untergeordnete Rolle, da die verwendete Insulinstimulationszeit von 5 Minuten generell zu kurz war, um eine Beeinflussung der Genexpression zu ermöglichen.

Ein weiterer potentieller Weg für die beobachteten anti-apoptischen Effekte von Insulin in PTECs beinhaltet eine Aktivierung der extrazellulären Signalregulierenden Kinase (ERK) [16]. Die ERK gehört zu den mitogen-aktivierten Kinasen, welche die Zellproliferation und –differenzierung reguliert. Hiromura et al. konnten zeigen, dass die ERK-Aktivität in murinen Mesangialzellen während der Apoptose erhöht war und eine Insulinstimulation zu einer signifikanten Reduktion der ERK-Aktivität und gleichzeitiger Senkung der Apoptoserate führte [16].

4.6 Klinische Relevanz der Untersuchungsergebnisse

Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse basieren auf der Verwendung humaner proximaler Nierentubuluszellen. Es muss dennoch betont werden, dass generell ein Übertragen von experimentellen Daten auf die Situation von Patienten schwierig ist und weitere klinische Studien zu dieser Thematik erforderlich sind.

Apoptosevorgänge im Bereich des Tubulusepithels haben eine große Bedeutung für die Prognose des akuten Nierenversagens. Es ist davon auszugehen, dass die verbleibende Organfunktion entscheidend von dem Ausmaß der eingeleiteten Apoptose abhängt. Zudem weisen Daten von Zager et al. darauf hin, dass Apoptosevorgänge im Bereich des Tubulusepithels zu einer erhöhten Anfälligkeit der Zellen gegenüber Infektionen führen, was zusätzlich eine prognostische Relevanz hat [79].

Mittlerweile konnten mehrere klinische Studien an kritisch Kranken zeigen, dass eine Einstellung des Glucosestoffwechsels in den normnahen Bereich mittels Insulintitration einen positiven Einfluss auf die Mortalität und Morbidität der Patienten hat [19-21]. Interessant ist insbesondere, dass in einer multivariaten Regressionsanalyse der Daten von Frau van den Berghe der positive Effekt auf das Verhindern eines ANVs allein von der Insulindosis und nicht von der Senkung des

Blutzuckerspiegels abhängig war [20]. Diese klinischen Daten würden zu dem Befund meiner Untersuchungen, die einen positiven Einfluss von Insulin auf die Apoptosevorgänge in PTEC zeigten, passen.

Auf der anderen Seite könnten die Ergebnisse meiner Arbeit auch zeigen, warum vor allem Menschen mit Diabetes und / oder kritischer Krankheitszustände ein hohes Risiko für ein ANV haben. Es ist davon auszugehen, dass Menschen mit Typ 2 Diabetes und / oder metabolischem Syndrom und / oder kritischer Krankheit an einer reduzierten Insulinempfindlichkeit, einer so genannten Insulinresistenz, leiden [55, 56, 75]. Ein eventueller Schutz der Nierentubuluszellen vor Apoptosevorgängen ist bei einer solchen Insulinresistenz durch eine verminderte Überleitung des Insulinsignals eingeschränkt, so dass Apoptosevorgänge schneller und ausgeprägter auftreten können.

In diesem Zusammenhang spielen auch chronische oder akute Phasen einer Inflammation eine Rolle. Inflammation und Insulinwirkung können sich gegenseitig beeinflussen. Bei Patienten mit Insulinresistenz, chronisch kranken Menschen mit Typ 2 Diabetes / metabolischem Syndrom oder akut kranken Intensivpatienten, finden sich regelmäßig erhöhte Konzentrationen von Zytokinen, wie beispielsweise das Interleukin-18 und Tumornekrosefaktor-alpha [65-67]. So konnten Kroder et al. zeigen, dass Tumornekrosefaktor-alpha in murinen NIH3T3 Skelettmuskelzellen die Autophosphorylierung des Insulinrezeptors und die Phosphorylierung von IRS direkt hemmt und so die Weiterleitung des Insulinsignals unterdrückt [18]. Es konnte zudem gezeigt werden, dass eine Infusion mit rekombinantem TNF-alpha die Glukoseaufnahme in humane Muskelzellen über Beeinflussung der Insulinsignaltransduktion vermindert [56]. Hotamisligil et al. konnten den direkten Zusammenhang zwischen erhöhter Tumornekrosefaktor-alpha-Produktion und Insulinresistenz an Nagetieren zeigen [68]. Mäuse, die aufgrund eines Gendefektes kein TNF-alpha ausschütten konnten, zeigten eine deutlich bessere und sensitivere Reaktion auf eine Insulin-Glukose-Infusion gegenüber Wildtyp-Mäusen. Zudem zeigten die genetisch veränderten Versuchstiere eine zweifach erhöhte IRS-1 Phosphorylierung.

Es gibt klinische Hinweise darauf, dass Interleukin-18, das durch die Caspase-1 produziert wird und während inflammatorischer Vorgänge und Insulinresistenz / Typ 2 Diabetes verstärkt exprimiert wird, eine wichtige Rolle in der Pathogenese des ANV spielt. So zeigten Melnikov et al. in einer Studie an Mäusen, deren Caspase-1 ausgeschaltet war, dass die verminderte Interleukin-18 Produktion mit einem geringeren Auftreten von akutem Nierenversagen einherging [66]. Aufgrund der zumeist erhöhten Konzentration von Interleukin-18 im Serum von Patienten mit manifestem ANV wird diskutiert, ob die im Urin bestimmte Interleukin-18-Konzentration einen früher Biomarker oder sogar Prognosefaktor bei Patienten mit gestörter Nierenfunktion darstellt [67].

Generell ist davon auszugehen, dass das Insulinsignal bei primär oder sekundär vermittelter Insulinresistenz abgeschwächt ist und eventuelle insulinsignalvermittelte Effekte auf eine Reduktion von Apoptosevorgängen in Tubulusepithelzellen vermindert sind. Durch eine Akutbehandlung mit Insulin könnte dosisabhängig eine Verstärkung des Insulinsignals mit den oben beschriebenen Effekten auf die Apoptosevorgänge eintreten und auf diese Weise das Auftreten oder die Prognose eines ANV entscheidend beeinflusst werden.

5. Zusammenfassung

Das akute Nierenversagen ist trotz aller klinischen und wissenschaftlichen Fortschritte mit einer erheblichen Morbidität und Mortalität assoziiert. Es besteht deshalb ein großes Interesse an einer Optimierung der zur Verfügung stehenden Behandlungsoptionen und an einem besseren Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen, die bei der Entstehung und Prognose eines akuten Nierenversagens eine Rolle spielen.

Klinische und experimentelle Daten weisen darauf hin, dass bei der Entwicklung des akuten Nierenversagens neben Hypoxie und Inflammation Apoptosevorgänge im Bereich des Tubulusepithels der Niere eine wichtige Rolle spielen. So scheint das Ausmaß der Organschädigung entscheidend von den eingeleiteten Apoptosevorgängen abzuhängen. Die Regulation solcher Apoptosevorgänge auf zellulärer Ebene ist weitestgehend unklar, es gibt jedoch Hinweise, die einen Zusammenhang zwischen Apoptosevorgängen und der zellulären Insulinwirkung vermuten lassen. Es konnte gezeigt werden, dass bei kritisch Kranken, die generell eine hohe Rate an akuten Nierenversagen aufweisen, dosisabhängig durch eine intensivierete Insulintherapie das Auftreten von akuten Nierenversagen reduziert werden kann. Darüber hinaus weisen experimentelle Studien an Mesangialzellen von Ratten oder Mäusen darauf hin, dass die Insulinsignalkaskade eine wichtige Funktion bei der Regulation apoptotischer Vorgänge zu spielen scheint. Eine solche Verbindung zwischen intrazellulären Insulinsignaltransduktionswegen und Apoptosevorgängen könnte beispielsweise auf der Ebene von Caspasen, die als Cysteinproteasen zu den wesentlichen Effektoren der Apoptose zählen, bestehen. Ziel meiner Arbeit war es, unter Verwendung von humanen Tubulusepithelzellen, die aus Nephrektomiegeweben gewonnen wurden, herauszufinden, ob wesentliche Schritte der Insulinsignalkaskade in einem solchen, klinisch relevanten Zellmodell vorhanden sind, und ob durch eine insulinabhängige Aktivierung dieser Signalkaskade Apoptosevorgänge, gemessen an der Aktivität der in proximalen Tubulusepithelzellen hauptsächlich exprimierten Caspase-3, beeinflusst werden.

Im ersten Schritt dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass humane Tubulusepithelzellen, ähnlich wie Adipozyten, Hepatozyten oder Skelettmuskelzellen, entscheidende Parameter der Insulinsignalkaskade exprimieren und dass sich diese Parameter insulinabhängig aktivieren lassen. Hierbei handelte es sich um das Insulinrezeptorsubstrat-1, dessen Tyrosinphosphorylierung, die Assoziation von p85 der PI-3 Kinase an das Insulinrezeptorsubstrat-1 und die Ser²⁷³-Phosphorylierung der Proteinkinase B (Akt).

Im zweiten Schritt konnte ich zeigen, dass die Induktion eines Hungerzustandes der Zellen infolge eines längeren Insulinmangels sowohl mit einer verminderten Aktivität o.g. Parameter der Insulinsignalkaskade als auch Apoptosevorgängen, einhergehend mit einer erhöhten Aktivität der Caspase-3, einer reduzierten Zellzahl sowie einer reduzierten Zellviabilität, assoziiert ist. Dieser Zustand einer ablaufenden Apoptose konnte durch eine nachfolgende Insulinstimulation signifikant reduziert werden. Es war zudem auch möglich, solche Apoptosevorgänge, die durch Verwendung des Apoptoseinduktors Camptothecin hervorgerufen werden konnten, durch eine gleichzeitige Inkubation der Zellen mit Camptothecin und Insulin wieder weitestgehend zu korrigieren.

In weiteren Untersuchungen bin ich der Frage nachgegangen, welcher Mechanismus einem solchen Insulineffekt auf zelluläre Apoptosevorgänge zugrunde liegen könnte. Hierbei habe ich mich an experimentellen Daten anderer Arbeitsgruppen aus Studien an renalen Zellreihen von Nagetieren orientiert, die auf eine mögliche Rolle des PI3-Kinase/Akt-Signalwegs, einem wesentlichen Bestandteil der Insulinsignalkaskade, hinweisen. Durch Verwendung des PI3-Kinaseinhibitors Wortmannin konnte ich zeigen, dass eine Wortmannin-induzierte Reduktion der insulinabhängigen Akt-Phosphorylierung mit einer signifikanten Erhöhung der Caspasenaktivität assoziiert ist. Dieser Hinweis auf einen möglichen apoptosebeeinflussenden Insulineffekt durch den PI3-Kinase/Akt-Signalweg konnte anschließend dadurch unterstrichen werden, dass in nachfolgenden Untersuchungen der Effekt einer Insulinstimulation nach einem Insulinmangel bei gleichzeitiger Verwendung des PI3-Kinaseinhibitors Wortmannin nicht, wie in vorherigen Versuchen ohne Wortmannin, mit einer

Reduktion der Caspasenaktivität, sondern einer Zunahme von Apoptosevorgängen einherging.

Ich konnte somit in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Insulin über eine Aktivierung des PI3-Kinase/Akt-Signalwegs einen protektiven Effekt auf eine Reduktion zellulärer Apoptosemechanismen hat. Dieses Ergebnis könnte zum einen die erhöhte Rate von akutem Nierenversagen bei Menschen mit einer verminderten Insulinempfindlichkeit, wie bei Typ 2 Diabetes und / oder Zuständen einer kritischen Erkrankung, erklären. Unter dem Vorbehalt, dass diese Ergebnisse durch *in vitro* Experimente gewonnen wurden, könnten meine Daten auch auf mögliche Handlungsstrategien zur Prävention und Therapie des akuten Nierenversagens bei Hochrisikogruppen durch eine passagere Insulintherapie hinweisen. In jedem Fall bestätigen die Ergebnisse meiner Untersuchungen die Hinweise aus anderen wissenschaftliche publizierten Studien, dass Insulin proximale Tubulusepithelzellen vor verstärktem Zelluntergang schützen kann.

6. Literaturverzeichnis

1. Ympa YP, Sakr Y, Reinhart K et al. Has mortality from acute renal failure decreased? A systemic review of the literature. *Am J Med* 2005; 118: 827-32.
2. Bagshaw SM, Laupland KB, Doig CJ, Mortis G, Fick GH, Mucenski M, Godinez-Luna T, Svenson LW, Rosenal T. Prognosis for long-term survival and renal recovery in critically ill patients with severe acute renal failure : a population-based study. *Crit Care* 2005; 9: 700-9.
3. Devarajan P. Update on Mechanisms of Ischemic Acute Kidney Injury. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 1503-20.
4. Gobe G, Willgoss D, Hogg et al. Cell survival or death in renal tubular epithelium after ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int* 1999; 56: 1299-1304.
5. Daemen M, Van't Veer C, Denecker G, Heemskerk VH, Wolfs T, Clauss M, Vandenabeele P, Buurman W. Inhibition of apoptosis induced by ischemia-reperfusion prevents inflammation. *J Clin Invest* 1999; 104: 541-49.
6. Zhuang S, Yan Y, Dauber RA et al. ERK promotes hydrogen peroxide-induced apoptosis through caspase-3 activation and inhibition of Akt in renal epithelial cells. *Am J Renal Physiol* 2007; 292: F440-7.
7. Lameire NH, Van Biessen W, Vanholder RC. Acute renal failure: Pathophysiology and prevention. *Lancet* 2005; 365(9457): 417-30
8. Brivet FG, Kleinknecht DJ, Loirat P, Landais PJ. Acute renal failure in intensive care units-causes, outcome and prognostic factors of hospital mortality; a prospective multicenter study. *Crit Care Med* 1996; 24: 192-198
9. Schrier R, Wang W, Poole B, Mitra A. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis and therapy. 2004; 114: 5-14.
10. Conger JD, Falk SA. Abnormal vasoreactivity of isolated arterioles from rats with ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 1993; 4: 733A
11. Oliver J, MacDowell M, Tracy A. The pathogenesis of acute renal failure associated with traumatic and toxic injury; renal ischemia, nephrotoxic damage and the ischemic episode. *J Clin Invest* 1951; 30:1307-439.
12. Kaushal GP. Role of caspases in renal tubular epithelial cell injury. *Semin nephrol* 2003; 5: 425-431

13. Kaushal GP, Singh A, Shah S. Identification of caspase (ICE like proteases) gene family in rat kidney and altered expression of rat caspase-6 and its localization in renal ischemia/reperfusion injury. *Am J Physiol* 2003; 274: F587-595
14. Homsí E, Janino P, Faria JBL. Role of caspases on cell death, inflammation and cell cycle in glycerol-induced acute renal failure. *Kidney Int* 2006; 69: 1385-92.
15. Shimamura H, Terada Y, Okado T et al. PI3-kinase pathway promotes mesangial cell survival and inhibits apoptosis in vitro via NF- κ B and Bad. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 1427-34
16. Hiromura K, Monkawa T, Petermann AT et al. Insulin is a potent survival factor in mesangial cells: role of the PI3/Akt-Pathway. *Kidney Int* 2006; 61: 1312-21
17. Kulik G, Klippel A, Weber MJ. Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor 1 receptor, phosphatidylinositol 3-kinase and Akt. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 1595-1606.
18. Kroder G, Bossenmaier B, Kellerer M, Capp E, Stoyanov B et al. Tumor necrosis Factor alpha – and Hyperglycemia-induced Insulin Resistance. *J Clin Invest* 1996; 97: 1471-77.
19. Van den Berghe G, Wouters P, Weekers F, Verwaest C, Bruyninckx F, et al. Intensive insulin therapy in the critically ill patients. *N Engl J Med* 2001; 345:1359-67
20. Van den Berghe G, Wouters PJ, Boullion R, Weekers F, Verwaest C et al. Outcome benefit of intensive insulin therapy in the critically ill: insulin dose versus glycemic control. *Crit care Med* 2003; 31: 359-66.
21. Finney SJ, ZEKveld C, Elia A, Evans TW. Glucose control and mortality in critically ill patients. *JAMA* 2003; 290: 2041-47.
22. Kahn CR. Insulin action, diabetogenesis, and the cause of type II diabetes. *Diabetes* 1994; 43: 1066-84.
23. Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 2001; 106: 473-81.
24. Olefsky JM. The insulin receptor. A multifunctional protein. *Diabetes* 1990; 39: 1009-16.
25. Kasuga M, Zick Y, Blith DL, Karlsson FA, Häring HU, Kahn CR. Insulin stimulation of phosphorylation of the betasubunit of the insulin receptor: formation of both phosphoserine and phosphotyrosine. *J Biol Chem* 1982; 257: 9891-94.

26. Yu KT, Czech MP. Tyrosine phosphorylation of the insulin receptor beta subunit activates the receptor-associated tyrosine kinase activity. *J Biol Chem* 1984; 259: 5277-86.
27. Czech MP; Corvera S. Signaling mechanisms that regulate glucose transport. *J Biol Chem* 1999; 274: 1865-68.
28. Taha C, Klip A. The insulin signalling pathway. *J Mem Biol* 1999; 169: 1-12.
29. White F, Maron R, Kahn CR. Insulin rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of a M_r -185,000 protein in intact cells. *Nature* 1985; 182: 3-11.
30. Sun XJ, Wang LM, Zhang Y, Yenush L, Meyers MG, Glasheen E, Lane WS, Pierce JH, White MF. Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. 1995; 377: 173-77.
31. Smith-Hall J, Pons S, Patti ME, Burks DJ, Yenush L, Sun XJ, Kahn CR, White MF. The 60 kDa insulin receptor substrate functions like an IRS protein (pp60IRS3) in adipose cells. *Biochemistry* 1997; 36: 8304-10.
32. Lavan BE, Fantin VR, Chang ET, Lane WS, Keller SR, Lienhard GE. A novel 160-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated embryonic kidney cells is a new member of the insulin receptor substrate family. *J Biol Chem* 1997; 272: 21403-7.
33. Shepherd PR, Whitters DJ, Siddle K. Phosphoinositide-3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem J* 1998; 333: 471-90.
34. Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, Hemmings BA. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J* 1996; 23: 6541-51.
35. Coffey PJ, Jin J, Woodgett JR. Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol-3-kinase activation. *Biochem J* 1998; 335: 1-13.
36. Ueki K, Yamamoto-Honda R, Kaburagi Y, Yamauchi T, Tobe K, Boudewijn M, Burgering BM, Coffey PJ, Komura I, Akanuma YY, Yazaki Y, Kodawaki T. Potential role of protein kinase B in insulin-induced glycogen synthesis and protein synthesis. *J Biol Chem* 1998; 273: 5315-22.
37. Vanhaesebroek B, Alessi DR. The PI3-PDK1 connection: More than just a road to PKB. *Biochem J* 2000; 346: 561-76.
38. Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, Cohen P. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B. *Curr Biol* 1997; 7: 261-9.

39. Whitters DJ, White MF. Perspective: The insulin signalling system-A common link in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocrinology* 2000; 141: 1917-21.
40. White M. The IRS-signalling system: A network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol Cell Biochem* 1998; 182: 3-11.
41. Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not Bcl-XL. *Cell* 1996; 87: 619-28. 28.
42. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. Akt phosphorylation of Bad couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 1997; 91: 231-41.
43. Cai D, Dhe-Paganon S, Melendez PA, Lee J, Shoelson SE. Two new substrates in insulin signalling, IRS5/DOK4 and IRS6/DOK5. *J Biol Chem* 2003; 278: 25323-30.
44. Detrisac CJ, Sens MA, Garvin AJ, Spicer SS, Sens DA. Tissue culture of human kidney epithelial cells of proximal tubule origin. *Kidney Int* 1984; 25: 383-390.
45. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.
46. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-85.
47. Nolte LA, Yarasheski KE, Kawanaka K, Fisher J, Le N, Holloszy JO. The HIV Protease inhibitor Indinavir decreases insulin- and contraction-stimulated glucose transport in skeletal muscle. *Diabetes* 2001; 50: 1397-1401.
48. Schütt M, Meier M, Meyer M, Klein J, Aries SP, Klein HH. The HIV-1 protease inhibitor indinavir impairs insulin signalling in HepG2 hepatoma cells. *Diabetologia* 2000; 43: 1145-1148.
49. Van den Berghe. How does blood glucose control with insulin save lives in intensive care? *J Clin Invest* 2004; 114: 1187-95.
50. Virkamäki A, Ueki K, Kahn CR. Protein-protein interaction in insulin signalling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 1999; 103: 931-43.

51. Gonzalez-Rodriguez E, Gaeggeler HP, Rossier BC. IGF-1 vs insulin: respective roles in modulating sodium transport via the PI3-kinase/SGk1 pathway in a cortical collecting duct cell line. *Kidney Int* 2007; 71:116-25
52. Denley A, Brierley GV, Carroll JM, Lindenberg A, Booker GW, Cosgrove LJ, Wallace JC, Forbes BE, Roberts CT JR. Molecular interactions of the IGF system. *Cytokine growth factor Rev* 2005; 16: 421-39.
53. Kiley SC, Thornhill BA, Tang SS, Ingelfinger JR, Chevalier RL. Growth factor-mediated phosphorylation of proapoptotic BAD reduces Tubule cell death in vitro and in vivo. *Kidney Int* 2003; 63:33-42.
54. Khwaja A. Akt is more than just a Bad Kinase. *Nature* 1999; 401:33-34.
55. Retnarkan R, Cull CA, Thorne KI, Adler A, Holman R. Risk factors for renal Dysfunction in Typ 2 Diabetes. *Diabetes* 2006; 55: 1832-39.
56. Ploomgard P, Bouzakri K, Krogh-Madsen R, Mittendorfer B, Zierath JR, Pedersen BK. Tumor necrosis factor-alpha induces skeletal muscle insulin resistance in healthy human subjects via inhibition of Akt substrate 160 phosphorylation. *Diabetes*. 2005; 54(10):2939-45.
57. Hotamisligil GS, Murray DL, Choy LN, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor alpha inhibits signalling from the insulin receptor. *Proc Natl acad Sci* 1994; 91: 4854-58.
58. Krogh-Madsen R, Ploomgard P, Keller P, Keller C, Pedersen BK. Insulin stimulates interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha gene expression in human subcutaneous adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 286: 234-38.
59. Krogh-Madsen R, Ploomgaard P, Möller K, Mittendorfer B, Pedersen BK. Influence of TNF-Alpha and IL-6 infusions on insulin sensitivity and expression of IL-18 in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 291: E108-14
60. Steinberg G. Inflammation in Obesity is the Common Link between defects in fatty acid Metabolism and Insulinresistance. *Cell Cycle* 2007; 6: 888-94.
61. Aguirre V, Werner ED, Giraud J, Lee YH, Shoelson SE, White MF. Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *J Biol Chem*. 2002; 277(2):1531-7
62. Vedder AC, Weening JJ, Krediet RT. Intracapillary proliferative glomerulonephritis due to heavy chain deposition disease. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19(5):1302-4.

63. Tzatsos A, Kandror KV. Nutrients Suppress Phosphatidylinositol-3 Kinase/ Akt Signaling via Raptor-Dependent mTOR-Mediated Insulin Receptor Substrate-1 phosphorylation. *Mol Cell Biol* 2006; 26: 63-76.
64. Hirsch E, Costa C, Ciralo E. Phosphoinositide 3-Kinase as a common platform for multi-hormone signalling. *J Endocrinol* 2007; 194: 243-56.
65. Melnikov V, Faubel S, Siegmund B, Lucia MS, Ljubanovic D, Edelstein C. Neutrophil-independent mechanisms of caspase-1- and IL-18-mediated ischemic acute tubular necrosis in mice. *J Clin Invest* 2002; 110: 1083-1091
66. Melnikov V, Ecker T, Fantuzzi G, Siegmund B, Lucia MS, Dinarello CA, Schrier RW, Edelstein C. Impaired IL-18 processing protects caspase-1-deficient mice from ischemic acute renal failure. *J Clin Invest* 2001; 107: 1145-52.
67. Parikh CR, Abraham E, Ancukiewicz M, Edelstein CL. Urine IL-18 is an early diagnostic Marker for acute kidney injury and predicts Mortality in the Intensive Care Unit. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 3046-52.
68. Hotamisligil GS. Mechanisms of TNF-alpha-induced insulin resistance. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1999;107(2):111-2.
69. Stennicke HR, Salvesen GS. Properties of the caspases. *Biochem Biophys Acta* 1998; 8: 17-31.
70. Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang W. Prevention of apoptosis by Bcl-2: Release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997; 275: 1129-1132.
71. Klein HH, Müller R, Vestergaard H, Pederson O. Implications of compound heterozygous insulin receptor mutations in congenital muscle fibre type disproportion myopathy for the receptor kinase activation. *Diabetologia* 1999; 42: 245-249
72. Krützfeld J, Kausch C, Volk A, Klein HH, Rett C, Häring HU, Stumvoll M. Insulin Signaling and Action in cultured skeletal muscle cells from lean healthy humans with high and low insulin sensitivity. *Diabetes* 2003; 49: 992-997
73. Gunawardana CG, Martinez RE, Xiao W, Templeton DM. Cadmium inhibits both intrinsic and extrinsic apoptotic pathway in renal mesangial cells. *Am J Physiol renal Physiol* 2006; 290: F 1074-82.

6. Literaturverzeichnis

74. Maesaka JK, Palaia T, Frese L, Fishbane S, Ragolia L. Prostaglandin D (2) synthase induces apoptosis in pig kidney LLC-PK1 cells. *Kidney Int.* 2001; 60: 1692-8.
75. Basi S, Pupim LB, Simmons EM, Sezer MT, Shyr Y et al., Insulin resistance in critically ill patients with acute renal failure. *Am J Physiol renal physiol* 2005; 289: F259-F264.
76. Chin E, Zhou J, Bondy C. Anatomical Relationships in the Patterns of Insulin-like Growth factor (IGF)-1, IGF Binding Protein-1, and IGF-1 Receptor Gene expression in the Rat Kidney. *Endocrinology* 1992; 130: 3237-45.
77. Reese JA, Byard JL. Isolation and culture of adult hepatocytes from liver biopsies. *In Vitro* 1981; 17: 935-940.
78. Brunet A, Bonni A, Zigmond MH, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greensberg ME. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a forkhead transcription factor. *Cell* 1999; 96: 857-868.
79. Zager RA, Johnson A, Lund S, Hanson S. Acute renal failure: determinants and characteristics of the injury-induced hyperinflammatory response. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 291: F547-556
80. Pirola L, Johnston AM, Van Obberghen E. Modulation of insulin action. *Diabetologia* 2004; 47:170-84
81. Saikumar P, Venkatachalam MA. Role of apoptosis in hypoxic/ischemic damage in the kidney. *Semin Nephrol* 2003; 23(6): 511-21

7. Danksagung

Am Ende einer solchen Arbeit gilt es, allen Menschen Dank zu sagen, die am Gelingen dieses Projektes beteiligt waren.

Herrn Prof. Dr. med. Hendrik Lehnert danke ich für die Möglichkeit, an der Medizinischen Klinik I des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, meine Dissertation durchführen zu können. Für die gute und reibungslose Zusammenarbeit bedanke ich mich bei dem Chef der Klinik für Urologie, Herrn Prof. Dr. med. Jocham.

Besonderen Dank richte ich an meinen Doktorvater Herrn PD Dr. med. Morten Schütt, der mich mit großer Geduld und ermutigenden Gesprächen für die Bearbeitung des Themas begeistern und stets motivieren konnte. Seine Präsenz und Unterstützung bei der Erstellung schwieriger Passagen der Arbeit waren mir eine einmalige Hilfe.

Danke an Herrn Dr. med. Markus Meier für seine Hilfe bei der Laborarbeit, Statistik, Literaturrecherche und seine Tipps für die Fertigstellung meiner Doktorarbeit. Eine solch intensive Betreuung ist ungewöhnlich und nicht selbstverständlich.

Vielen Dank an Herrn Dr. med. Martin Nitschke für die Möglichkeit, in seinem Labor zu arbeiten und die Zellkultur zu betreuen. Zudem möchte ich ihm für die Hilfestellung bei der Bearbeitung des Themas danken.

Herrn Prof. Dr. med. Johannes Klein danke ich für die Überlassung der Laborräume.

Vielen Dank an alle Labormitarbeiter, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen. Besonderer Dank gilt Ludmilla und Maren für die Unterstützung bei den Laborarbeiten.

Und schließlich danke ich Gerrit, Meiki, Philipp, Marc, Oma Alice und meinen Eltern für das Interesse an meinem Projekt und die stetigen Ermutigungen weiter zu machen. Danke, dass ihr an mich geglaubt habt!

8. Lebenslauf

8. Curriculum vitae



Name: *Caroline Johanna Deisel, geb. Hocke*

Geburtsdatum, -ort: 23.04.1982 in Wetzlar, Hessen

Familienstand: verheiratet

Ehemann: *Gerrit Deisel, 29 Jahre, Industriekaufmann*

Eltern: *Dr. med. F. Michael. Hocke* 64 Jahre, Chirurg
Christa Hocke geb. Breithaupt 62 Jahre, Krankenschwester

Geschwister: *Marc Michael, 28 Jahre, Diplomingenieur der Medizintechnik*

Schulische Laufbahn: 1988 - 1992 Grundschule „Roteberg“ in Dillenburg
1992 – 2001 Altsprachliches Gymnasium „Wilhelm-von-Oranien Schule“ in Dillenburg, Abschluss: Abitur
2001 – 2003 Studium der Medizin an der Justus-Liebig-Universität in Gießen, Abschluss: Physikum
2003-2007 Studium der Medizin an der Universität zu Lübeck
PJ-Wahlfach: Augenheilkunde
Abschluss: Staatsexamen

Beruf: Seit 01.01.2008 Tätigkeit als Weiterbildungsassistentin im Fach Augenheilkunde an der Artemis Laserklinik Frankfurt.