

INSTITUT FÜR ERNÄHRUNGSWISSENSCHAFT POTSDAM-REHBRÜCKE

ABTEILUNG BIOCHEMIE DER ERNÄHRUNG

**Modulation der Insulinsignalgebung durch Prostaglandin E₂
und Endocannabinoide**

DISSERTATION

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

in der Wissenschaftsdisziplin „Biochemie der Ernährung“

eingereicht an der

MATHEMATISCH-NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT

der UNIVERSITÄT POTSDAM

von

Daniela Strohm

geboren am 07.05.1980 in VS-Schwenningen

Potsdam, im Juli 2010

Dieses Werk ist unter einem Creative Commons Lizenzvertrag lizenziert:
Namensnennung - Keine kommerzielle Nutzung - Weitergabe unter gleichen
Bedingungen 3.0 Deutschland
Um die Bedingungen der Lizenz einzusehen, folgen Sie bitte dem Hyperlink:
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/>

Gutachter:

Prof. Dr. Gerhard Paul Püschel

Universität Potsdam, Institut für Ernährungswissenschaft, Abteilung Biochemie der
Ernährung, Potsdam-Rehbrücke

Prof. Dr. Peter Dieter

Technische Universität Dresden, Medizinische Fakultät, Institut für Physiologische
Chemie, Dresden

PD Dr. Ralf Schüle

Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie, Abteilung Signal Transduction / Molecular
Genetics, FMP Berlin-Buch

Tag der mündlichen Prüfung: 12.11.2010

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
URL <http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2011/4967/>
URN [urn:nbn:de:kobv:517-opus-4967](http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-4967)
<http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-49678>

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis.....	i
Verzeichnis der Abbildungen.....	x
Verzeichnis der Tabellen.....	xiii
1 Einleitung.....	1
1.1 Insulinstimulierte Signalwege.....	1
1.1.1 Insulin.....	1
1.1.2 Der Insulinrezeptor.....	1
1.1.3 Insulinrezeptorsubstrate.....	3
1.1.4 Signalketten zur Regulation metabolischer Prozesse.....	4
1.1.5 Signalkette zur Steigerung der Mitogenese.....	7
1.1.6 Negativer Rückkopplungsmechanismus der Insulinsignalkette.....	8
1.2 Die Rolle der insulinstimulierten Signalwege im ZNS.....	9
1.3 Die Insulinresistenz – Entzündungsprozesse bei Adipositas.....	12
1.4 Prostaglandin E ₂	15
1.5 Endocannabinoide.....	18
1.6 Ziel der Arbeit.....	19
2 Material.....	21
2.1 Tiere und Tierhaltung.....	21
2.2 Biochemikalien.....	21
2.3 Verbrauchsmaterialien.....	23
2.4 Geräte.....	24
2.5 Zellkultur-Medien und Zusätze.....	24
2.6 Käufliche Reinigungs- und Nachweissysteme.....	25
2.7 Molekulare Längenstandards.....	26
2.7.1 Protein-Längenstandards.....	26
2.7.2 DNA-Längenstandards.....	26
2.8 Enzyme.....	26

2.9	pcDNA3 Vektor	26
2.10	Oligonukleotide	27
2.11	E.coli XL-1 (blue) Bakterien	28
2.12	Antikörper	28
2.12.1	monoklonale Antikörper	28
2.12.2	polykonale Antikörper	28
2.13	Spezielles Präparationsbesteck	28
3	Methoden	29
3.1	Kultivierung permanenter Zelllinien	29
3.1.1	HepG2-Zellen	29
3.1.2	Fh-hTert-Zellen	31
3.1.3	SH-SY5Y-Zellen	33
3.1.4	N-41-Zellen	34
3.2	Stabile Transfektion der Zelllinien mit einer modifizierten Calcium-Phosphat-Methode	35
3.2.1	Prinzip	35
3.2.2	Puffer und Lösungen	36
3.2.3	Stabile Transfektion der Zelllinien	36
3.2.4	Selektion mit G418	37
3.3	Isolierung und Kultivierung von primären hypothalamischen Neuronen der Ratte	37
3.3.1	Puffer und Lösungen	37
3.3.2	Isolierung des embryonalen Hypothalamus der Ratte	39
3.3.3	Präparation der hypothalamischen Kulturen	39
3.3.4	Mikroskopische Zellzählung	39
3.3.5	Beschichtung der Zellkulturschalen	39
3.3.6	Kultivierung von primären Neuronen der Ratte	40
3.4	Zellkulturversuche	40
3.4.1	Puffer und Lösungen	40

3.4.2	Behandlungsschemata	41
3.5	Isolierung von Gesamt-RNA.....	43
3.5.1	Puffer und Lösungen	43
3.5.2	Isolierung von Gesamt-RNA mit Hilfe käuflicher Nachweis- und Reinigungssysteme	43
3.6	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	44
3.6.1	Puffer und Lösungen	44
3.6.2	Reverse Transkription	45
3.6.3	Allgemeines Protokoll für die PCR.....	46
3.6.4	Semiquantitative RT-PCR.....	46
3.6.5	Quantitative <i>Real-Time</i> -PCR (qPCR)	47
3.7	Agarosegelelektrophorese	49
3.7.1	Puffer und Lösungen	49
3.7.2	Auftrennung von DNA in Agarosegelen	49
3.8	Herstellung der EP-Rezeptorplasmide	50
3.8.1	Die Transformation kompetenter <i>E.coli</i> XL-1 (blue)-Zellen durch Elektroporation	50
3.8.2	Analyse rekombinanter Bakterienkolonien durch Plasmidpräparation im Mini-Maßstab.....	53
3.8.3	Isolierung der Plasmid-DNA im Maxi-Maßstab	54
3.9	Aufarbeitung der Zellkulturversuche für die Western-Blot-Analyse	57
3.9.1	Puffer und Lösungen	57
3.9.2	Herstellung der Zelllysate	58
3.9.3	Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976).....	58
3.10	Immunologischer Nachweis der Phosphorylierung von Akt, ERK1/2, mTOR und IRS durch Western-Blot-Analyse	59
3.10.1	Puffer und Lösungen	59
3.10.2	Vorbereitung der Proben für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	61

3.10.3	Vorbereitung der Polyacrylamidgele	62
3.10.4	Trennung der Proteine durch SDS-PAGE.....	63
3.10.5	Transfer der getrennten Proteine auf PVDF-Membran durch Western-Blot	63
3.10.6	Nachweis der geblotteten Proteine durch Ponceau S-Färbung.....	64
3.10.7	Immunologischer Nachweis der Proteine in der Western-Blot-Analyse durch eine peroxidasevermittelte Chemilumineszenzreaktion.....	64
3.10.8	Auswertung der Western-Blot-Analysen	65
3.11	Radioaktive Bestimmung der PGE ₂ -Bindung.....	65
3.11.1	Prinzip des PGE ₂ -Bindungs-Assays	65
3.11.2	Puffer und Lösungen	66
3.11.3	Herstellung der Homogenate.....	66
3.11.4	Messung der PGE ₂ -Bindung.....	66
3.12	Statistische Auswertung.....	67
4	Ergebnisse	68
4.1	Quantifizierung der PGE ₂ -Rezeptoren in primären Hepatozyten der Ratte und Hepatomzelllinien	68
4.1.1	Quantifizierung der PGE ₂ -Rezeptoren in primären Hepatozyten.....	68
4.1.2	Quantifizierung der PGE ₂ -Rezeptoren in HepG2-Zellen	69
4.1.3	Quantifizierung der PGE ₂ -Rezeptoren in Fh-hTert-Zellen	70
4.2	Modulation der Insulinsignalkette durch Vorinkubation mit PGE ₂ in HepG2-Zellen	70
4.2.1	Modulation der insulinabhängigen Akt-Phosphorylierung	70
4.2.2	Modulation der insulinabhängigen ERK1/2-Phosphorylierung	73
4.2.3	Modulation der insulinabhängigen mTOR-Phosphorylierung	75
4.2.4	Modulation der insulinabhängigen IRS-Phosphorylierung.....	75
4.3	Modulation der Signalketten durch die Behandlung mit Inhibitoren in HepG2-Zellen	78
4.3.1	HepG2-EP1-Zellen	79

4.3.2	HepG2-EP3 β -Zellen	81
4.3.3	HepG2-EP4-Zellen	82
4.4	Fh-hTert-Zellen	85
4.4.1	Modulation der Insulinsignalketten durch die Vorinkubation mit PGE ₂	85
4.4.2	Modulation der Signalketten durch die Behandlung mit Inhibitoren.....	86
4.5	SH-SY5Y-Zellen.....	87
4.5.1	Charakterisierung der SH-SY5Y-Zellen	87
4.5.2	Quantifizierung der PGE ₂ -Rezeptoren	89
4.5.3	Kinetik und Dosiswirkungskurve der insulinabhängigen Akt- Phosphorylierung	90
4.5.4	Akutstimulation mit PGE ₂ und Insulin.....	91
4.5.5	Modulation der insulinabhängigen Phosphorylierung von Akt und ERK1/2 durch Vorinkubation mit PGE ₂	91
4.6	N-41-Zellen	95
4.6.1	Charakterisierung der N-41-Zellen.....	95
4.6.2	Quantifizierung der PGE ₂ -Rezeptoren in N-41-Zellen.....	95
4.6.3	Kinetik und Dosiswirkungskurve der insulinabhängigen Akt- Phosphorylierung	96
4.6.4	Akutstimulation mit PGE ₂ und Insulin in N-41-Zellen.....	97
4.6.5	Modulation der insulinabhängigen Phosphorylierung von Akt und ERK1/2 durch Vorinkubation mit PGE ₂ in N-41-Zellen.....	97
4.6.6	Akutstimulation mit ACEA in N-41-Zellen.....	98
4.6.7	Modulation der insulinabhängigen Phosphorylierung von Akt und ERK1/2 durch Vorinkubation mit ACEA in N-41-Zellen	100
4.6.8	Überprüfung der Expression von Insulinzielgenen in N-41-Zellen.....	101
4.7	Primäre hypothalamische Neuronen der Ratte.....	101
4.7.1	Charakterisierung der embryonalen hypothalamischen Zellen.....	101
4.7.2	Quantifizierung der PGE ₂ -Rezeptoren in primären hypothalamischen Neuronen	102

4.7.3	Kinetik und Dosiswirkungskurve der insulinabhängigen Akt-Phosphorylierung	104
4.7.4	Akutstimulation mit PGE ₂ und Insulin in primären hypothalamischen Neuronen	105
4.7.5	Modulation der insulinabhängigen Phosphorylierung von Akt und ERK1/2 durch Vorinkubation mit PGE ₂ in primären Neuronen	105
4.7.6	Überprüfung der Expression von Insulinzielgenen in primären Neuronen	106
5	Diskussion	107
5.1	Modulation der insulinstimulierten Signalwege durch PGE ₂	107
5.1.1	Modulation über den EP1-Rezeptor.....	108
5.1.2	Modulation über den EP3β-Rezeptor.....	111
5.1.3	Modulation über den EP2- und EP4-Rezeptor	113
5.2	Pathophysiologische Bedeutung der chronischen Exposition mit PGE ₂	115
5.2.1	Die PGE ₂ -Rezeptorausstattung neuronaler Zellen.....	115
5.2.2	Pathophysiologische Bedeutung in neuronalen Zellen.....	117
5.2.3	Pathophysiologische Bedeutung im peripheren Gewebe	120
5.3	Modulation der insulinstimulierten Signalwege durch Endocannabinoide	121
5.3.1	Modulation durch ACEA in N-41-Zellen	121
5.3.2	Pathophysiologische Bedeutung der chronischen Exposition mit ACEA.....	122
6	Zusammenfassung	124
	Literaturverzeichnis	126
	Danksagung	148

Abkürzungsverzeichnis

ACEA	Arachidonyl 2'-chlorethylamid
AgRP	<i>Agouti-related Protein</i>
AMPK	AMP-aktivierten Proteinkinase
Bad	Bcl-assoziertes Dimer
bp	Basenpaare
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
cAMP	3',5'-cyclisches Adenosinmonophosphat
CB1-R	Endocannabinoid-Rezeptor 1
CB2-R	Endocannabinoid-Rezeptor 2
cDNA	engl. <i>complementary</i> für komplementäre Desoxyribonukleinsäure
COX	Cyclooxygenase
Ct	engl. <i>cycle threshold</i> für Schwellenwertzyklus
DAG	Diacylglycerol
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EGFR	<i>Epidermal Growth Facor</i> -Rezeptor
EP(1,2,3,4)-R	Prostaglandin E ₂ -Rezeptor, Subtyp 1, 2, 3, 4
Epac	<i>exchange protein activated by cAMP</i>
ERK1/2	Extrazelluläre signalregulierte Kinasen 1 und 2 (auch p44/p42 MAPK)
EtOH	Ethanol
Fh-hTERT	<i>fetal hepatocytes - human telomerase reverse transcriptase</i>
FOXO	<i>Forkhead Box subclass O</i> Transkriptionsfaktoren
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GLUT4	Glucosetransporter 4
Grb2	<i>Growth Factor Receptor-bound Protein 2</i>
GSK3	Glykogensynthasekinase-3
HRP	engl. <i>horse raddish peroxydase</i> für Meerrettichperoxydase
IgG	Immunglobin G
IKK β	Inhibitor der NF- κ B Kinase
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
IP ₃	Inositoltriphosphat
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
JAK2	Januskinase 2
JNK	cJun-N-terminale Kinase
K _{ATP}	ATP-sensitive Kalium-Kanäle

MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
MC3R/MC4R	Melanocortin3/4-Rezeptoren
MEK	MAP/ERK-Kinase
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
α -MSH	<i>α-melanocyte-stimulating hormone</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
mTORC1/2	mTOR raptor <i>complex</i> 1/2
NF- κ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NPY	Neuropeptid Y
pAkt	phosphorylierte Akt-Kinase
PCR	<i>engl. Polymerase Chain Reaction</i> für Polymerasekettenreaktion
PDE3B	Phosphodiesterase 3B
PDK1	3'-Phosphatidylinositol-abhängige Kinase
pERK1/2	phosphorylierte ERK1/2-Kinase
PGE ₂	Prostaglandin E2
PH	Pleckstrin Homologie
PI3K	Phosphatidylinositol-3'-Kinase
PI(4,5)P ₂	Phosphatidylinositol-(3,4)-Bisphosphat
PI(3,4,5)P ₃	Phosphatidylinositol-(3,4,5)-Trisphosphat
pIRS	phosphoryliertes Insulinrezeptorsubstrat
PKA	Proteinkinase A
PKB / Akt	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
pmTOR	phosphorylierte mTOR-Kinase
POMC	Proopiomelanocortin
PP1	Proteinphosphatase 1
PTB	Phosphotyrosinbindedomäne
Raptor	<i>regulatory-associated protein of mTOR</i>
Rictor	<i>rapamycin-insensitive companion of mTOR</i>
RNase	Ribonuklease
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RPL19	Ribosomales Protein L19
rpm	<i>engl. rounds per minute</i> für Umdrehungen pro Minute
SH2	Src Homologie-Domäne 2

Shc	Src homology 2 domain containing
SHP2	Src Homologie 2-enthaltende Proteintyrosinphosphatase 2
SOCS	<i>supressor of cytokine signaling</i>
SOS	<i>son of sevenless</i>
STAT3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris- <i>buffered</i> Salzlösung
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TrkB	Tyrosinkinase B
TSC1/2	<i>tuberous sclerosis complex 1/2</i>
U	Unit [μ mol/min], internationale Einheit der Enzymaktivität
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	engl. <i>weight per volume</i> für Gewicht pro Volumen
X	unbekannte Aminosäure
ZNS	Zentrales Nervensystem

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Insulinrezeptors	3
Abbildung 2: Übersicht über die insulinstimulierten Signalwege.....	5
Abbildung 3: Schema zur Kontrolle der Nahrungsaufnahme.....	9
Abbildung 4: Mechanismus der Insulin- und Leptinaktivität im Hypothalamus.....	11
Abbildung 5: POMC- und AgRP-Transkription durch Insulin und Leptin.....	12
Abbildung 6: Mediatoren und Signalwege die zur Insulinresistenz führen	15
Abbildung 7: Restriktionskarte des pcDNA3 Vektors.....	26
Abbildung 8: Behandlungsschemata für die Vorinkubation mit PGE ₂ und ACEA	42
Abbildung 9: Behandlungsschemata für die Behandlung mit Inhibitoren.....	42
Abbildung 10: Quantifizierung der PGE ₂ -Rezeptoren in primären Rattenhepatozyten	68
Abbildung 11: Quantifizierung der PGE ₂ -Rezeptoren in HepG2-Zellen	69
Abbildung 12: Quantifizierung der PGE ₂ -Rezeptoren in Fh-hTert-Zellen.....	71
Abbildung 13: Modulation der insulinabhängigen Phosphorylierung von Akt durch Vorinkubation mit PGE ₂ in HepG2-Zellen.....	72
Abbildung 14: Modulation der insulinabhängigen Phosphorylierung von Akt durch Vorinkubation mit PGE ₂ in HepG2-Zellen: Vergleich der Zelllinien ..	73
Abbildung 15: Modulation der insulinabhängigen Phosphorylierung von ERK1/2 durch Vorinkubation mit PGE ₂ in HepG2-Zellen.....	74
Abbildung 16: Modulation der insulinabhängigen Phosphorylierung von mTOR durch Vorinkubation mit PGE ₂ in HepG2-Zellen.....	76
Abbildung 17: Modulation der insulinabhängigen Serinphosphorylierung von IRS durch Vorinkubation mit PGE ₂ in HepG2-Zellen.....	77
Abbildung 18: Modulation der insulinabhängigen Phosphorylierung von Akt und ERK1/2 in HepG2-EP1-Zellen durch die Behandlung mit BIM und PD98059	79
Abbildung 19: Modulation der insulinabhängigen Phosphorylierung von Akt und ERK1/2 durch die Behandlung mit U0126 in HepG2-EP1-Zellen.....	80

Abbildung 20: Modulation der insulinabhängigen Phosphorylierung von Akt und ERK1/2 in HepG2-EP3 β -Zellen durch die Behandlung mit BIM und PD98059	81
Abbildung 21: Modulation der insulinabhängigen Phosphorylierung von Akt und ERK1/2 durch die Behandlung mit U0126 in HepG2-EP3 β -Zellen	82
Abbildung 22: Modulation der insulinabhängigen Phosphorylierung von Akt und ERK1/2 in HepG2-EP4-Zellen durch die Behandlung mit BIM und PD98059	83
Abbildung 23: Modulation der insulinabhängigen Phosphorylierung von Akt und ERK1/2 durch die Behandlung mit U0126 in HepG2-EP4-Zellen	84
Abbildung 24: Modulation der insulinabhängigen Phosphorylierung von Akt und ERK1/2 in Fh-hTert-Zellen.....	85
Abbildung 25: Modulation der insulinabhängigen Phosphorylierung von Akt und ERK1/2 in Fh-hTert-Zellen durch die Behandlung mit PD98059	86
Abbildung 26: Kultur der neuronalen SH-SY5Y-Zellen.....	87
Abbildung 27: Charakterisierung der SH-SY5Y-Zellen.....	88
Abbildung 28: Quantifizierung der PGE ₂ -Rezeptoren in SH-SY5Y-Zellen	89
Abbildung 29: Kinetik und Dosiswirkungskurve der insulinabhängigen Akt-Phosphorylierung in SH-SY5Y-Zellen.....	90
Abbildung 30: Akutstimulation mit PGE ₂ und Insulin in SH-SY5Y-Zellen.....	91
Abbildung 31a: Modulation der insulinabhängigen Phosphorylierung von Akt/ERK1/2 durch Vorinkubation mit PGE ₂ in SH-SY5Y-Zellen.....	93
Abbildung 31b: Modulation der insulinabhängigen Phosphorylierung von Akt/ERK1/2 durch Vorinkubation mit PGE ₂ in SH-SY5Y-Zellen.....	94
Abbildung 32: Charakterisierung der N-41-Zellen	95
Abbildung 33: Quantifizierung der PGE ₂ -Rezeptoren in N-41-Zellen.....	96
Abbildung 34: Kinetik und Dosiswirkungskurve der insulinabhängigen Akt-Phosphorylierung in N-41-Zellen	97
Abbildung 35 Akutstimulation mit PGE ₂ und Insulin in N-41-Zellen	98
Abbildung 36: Modulation der insulinabhängigen Phosphorylierung von Akt und ERK1/2 durch Vorinkubation mit PGE ₂ in N-41-Zellen	99

Abbildung 37: Akutstimulation mit ACEA und Insulin in N-41-Zellen	99
Abbildung 38: Modulation der insulinabhängigen Phosphorylierung von Akt und ERK1/2 durch Vorinkubation mit ACEA in N-41-Zellen	100
Abbildung 39: Embryonale hypothalamische Kulturen der Ratte.....	101
Abbildung 40: Neuronaler Marker in primären hypothalamischen Neuronen.....	102
Abbildung 41: Charakterisierung der primären Neuronen	103
Abbildung 42: Quantifizierung der PGE ₂ -Rezeptoren in primären hypothalamischen Neuronen sowie im adulten Rattenhypothalamus	103
Abbildung 43: Kinetik und Dosiswirkungskurve der insulinabhängigen Akt-Phosphorylierung in primären hypothalamischen Neuronen	104
Abbildung 44: Akutstimulation mit PGE ₂ und Insulin in primären hypothalamischen Neuronen	105
Abbildung 45: Modulation der insulinabhängigen Phosphorylierung von Akt und ERK1/2 durch Vorinkubation mit PGE ₂ in primären hypothalamischen Neuronen	106
Abbildung 46: Modell über die Mechanismen der EP1-vermittelten Modulation der Insulinsignalgebung durch PGE ₂	110
Abbildung 47: Modell über die Mechanismen der EP3 β -vermittelten Modulation der Insulinsignalgebung durch PGE ₂	112
Abbildung 48: Modell über die Mechanismen der EP2- und EP4-vermittelten Modulation der Insulinsignalgebung durch PGE ₂	115

VERZEICHNIS DER TABELLEN

Tabelle 1: Primertabelle	27
Tabelle 2: Allgemeines Protokoll für die PCR	46
Tabelle 3: PCR-Mix für eine Probe (semiquantitative RT-PCR)	47
Tabelle 4: PCR-Mix für eine Probe (qPCR) im C1000™ Thermal Cycler	47
Tabelle 5: EP-Rezeptorplasmide (pcDNA3)	56
Tabelle 5: BSA-Standardreihe	58
Tabelle 6: Trenngele für die Western-Blot-Analyse.....	62
Tabelle 7: Sammelgel für die Western-Blot-Analyse.....	63

1 EINLEITUNG

1.1 Insulinstimulierte Signalwege

1.1.1 Insulin

Insulin ist zusammen mit seinem Gegenspieler Glucagon der Hauptregulator des Kohlenhydratstoffwechsels. Störungen im Kohlenhydratstoffwechsel führen zu einer Entgleisung der Glucosehomöostase. Die Hyperglykämie, eine Störung der Glucosehomöostase, ist ein Symptom des metabolischen Syndroms und des sich häufig daraus entwickelnden Typ II Diabetes mellitus. Das metabolische Syndrom ist eine Stoffwechselstörung, bei der die zentrale Adipositas im Mittelpunkt steht. Vom metabolischen Syndrom spricht man, wenn neben der zentralen Adipositas mindestens zwei Befunde aus Hypertonie, reduziertem *High-Density* Lipoprotein-Cholesterol, Hypertriglyceridämie und Hyperglykämie vorliegen (INTERNATIONALE DIABETES FEDERATION 2006). Man geht davon aus, dass weltweit mehr als eine Milliarde Menschen übergewichtig sind, mindestens 300 Millionen davon sind adipös (DAS 2009). Nach Schätzung des internationalen Diabetesverbandes leiden weltweit 250 Millionen Menschen an Diabetes mellitus Typ II. Diese Zahl wird bis zum Jahr 2025 voraussichtlich auf 380 Millionen ansteigen. Dann könnte bereits jeder zehnte Erwachsene betroffen sein (INTERNATIONALE DIABETES FEDERATION 2009).

Insulin ist ein Peptidhormon aus 51 Aminosäuren, bestehend aus einer A- und B- Kette, die über zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Eine seiner Hauptaufgabe ist die Senkung des Blutglucosespiegels. Insulin wird bei einer Erhöhung der Glucosekonzentration im Blut verstärkt aus den Langerhans'schen Inseln des Pankreas freigesetzt. Das sezernierte Insulin stimuliert die Glucoseaufnahme in die peripheren Gewebe, vor allem Muskel- und Fettgewebe, steigert die hepatische Glucoseverwertung und reduziert die hepatische Gluconeogenese. Nach Transport über die Blut-Hirn-Schranke wirkt Insulin auch auf das Regulationszentrum der Nahrungsaufnahme im Gehirn. Dort hemmt es als sogenanntes Sättigungssignal die Nahrungsaufnahme (WOODS & SEELEY 2001).

1.1.2 Der Insulinrezeptor

Der Insulinrezeptor ist ubiquitär exprimiert und gehört zusammen mit dem Insulin-*like Growth-Factor* 1 (IGF1)-Rezeptor der Klasse II der Rezeptortyrosinkinasen an (ULLRICH und SCHLESSINGER 1990) (siehe Abb. 1). Er besteht aus jeweils zwei α - und zwei β -Untereinheiten, die über Disulfidbrücken verbundene Heterotetramere darstellen. Die extrazellulär lokalisierte α -Untereinheit beherbergt die Insulinbindungsdomäne (YIP et al. 1992). Die β -Untereinheit verfügt über eine kurze extrazelluläre Domäne, die über

Disulfidbrücken mit der α -Untereinheit verbunden ist. Darüber hinaus besitzt die β -Untereinheit eine Transmembrandomäne sowie eine intrazelluläre Tyrosinkinasedomäne. Die Bindung von Insulin an die α -Untereinheit löst eine Konformationsänderung aus (HUBBARD 1997), die in der Autophosphorylierung von drei Tyrosinresten der β -Untereinheit resultiert (Tyr¹¹⁵⁸, Tyr¹¹⁶², Tyr¹¹⁶³)¹, was wiederum die Bindung von ATP und anderer Substrate an die katalytische Einheit ermöglicht (WHITE & KAHN 1994). Für die maximale Tyrosinkinaseaktivität ist die Phosphorylierung aller drei Tyrosinreste notwendig. Der intrazelluläre Teil der β -Untereinheit enthält außerdem eine Juxtamembrandomäne, in der sich zudem das Motiv für die Internalisierung des Rezeptors befindet (VIRKAMÄKIE et al. 1999), und die C-terminale Domäne. In der Juxtamembrandomäne dienen phosphorylierte Tyrosinreste als Bindungsstelle für Proteine mit einer sogenannten Phosphotyrosinbindedomäne (PTB)². An den Insulinrezeptor binden die Insulinrezeptorsubstrate (IRS), Adapterproteine mit PH- und SH2-Domäne, sowie Shc-Proteine (*SH2 domain containing*) (CHANG et al. 2004; YOUNGREN 2007). Serin/Threoninphosphorylierungsstellen befinden sich in der C-terminalen Domäne, hier ist der Insulinrezeptor im basalen Zustand phosphoryliert. Hyperphosphorylierungen dieser Serin/Threoninstellen hemmen die Weiterleitung des Insulinsignals (CHEATHAM & KAHN 1995; WHITE & KAHN 1994).

¹ Die Positionsangaben beziehen sich auf den humanen Insulinrezeptor.

² In der Literatur wird dieser Bereich auch oft als Src Homologie 2 (SH2)-Domäne bezeichnet.

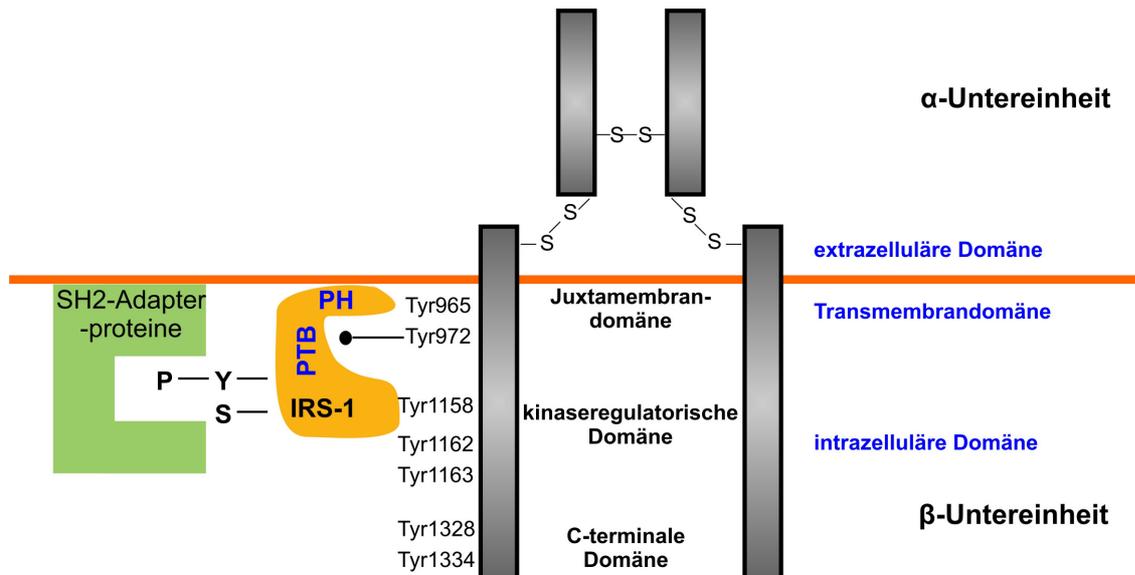


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Insulinrezeptors

Der Insulinrezeptor ist ein Tetramer aus zwei α - und zwei β -Untereinheiten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Insulin bindet extrazellulär an die α -Untereinheiten. Die β -Untereinheit besitzt eine kurze extrazelluläre Domäne, eine Transmembrandomäne, sowie eine intrazelluläre Tyrosinkinasedomäne, welche sich in drei Bereiche unterteilen lässt: die Juxtamembrandomäne weist eine Autophosphorylierungsstelle bei Tyr⁹⁶⁵ auf; die kinaseregulatorische Domäne enthält verschiedene Tyrosinreste, die durch Rezeptoraktivierung phosphoryliert werden können. Für die vollständige Aktivierung der Tyrosinkinase ist die Phosphorylierung dreier Tyrosinreste notwendig (Tyr¹¹⁵⁸, Tyr¹¹⁶² und Tyr¹¹⁶³). IRS-1 bindet mit seiner PTB-Domäne an Tyr⁹⁷² in der Juxtamembrandomäne des Insulinrezeptors. Die PH-Domäne des IRS-1 rekrutiert das Protein an die Plasmamembran. Im Rahmen der Interaktion werden IRS-1 Proteine durch den Insulinrezeptor an Tyrosinresten phosphoryliert, wodurch die Bindung von SH2-Adapterproteinen ermöglicht wird.

1.1.3 Insulinrezeptorsubstrate

Die Insulinrezeptorsubstrate (IRS) sind Schlüsselemente der intrazellulären Insulin-signalübertragung. Die IRS weisen selbst keine katalytische Aktivität auf, sie besitzen jedoch multiple Wechselwirkungsdomänen und Phosphorylierungsmotive (WHITE 2002). Es existieren vier Isoformen von IRS. IRS-1 und IRS-2 sind am weitesten verbreitet und repräsentieren die wichtigsten Substrate dieser Gruppe, wobei IRS-1 die Hauptfunktion im Skelettmuskel und IRS-2 die Hauptfunktion in Hepatozyten übernimmt (KIDO et al. 2001). IRS-3 konnte bisher nur in Adipozyten von Nagern nachgewiesen werden (LAVAN et al. 1997a). Die Expression von IRS-4 ist begrenzt auf das Gehirn und die Niere (LAVAN et al. 1997b). IRS-4 ist jedoch wahrscheinlich nicht in für die in Abb. 2 dargestellten Signalketten zur Modulation von Stoffwechselflüssen zwischengeschaltet (THIRONE et al. 2006). Für alle IRS charakteristisch ist das Vorhandensein einer N-terminalen Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH), einer angrenzenden PTB-Domäne, sowie C-terminal Tyrosin- und Serinphosphorylierungsstellen (siehe Abb. 1). IRS-1 und IRS-2 besitzen mehr als zwanzig Bindestellen für Adapterproteine, IRS-3 und IRS-4 deutlich weniger (WHITE 2002). Die PH- und die PTB-Domäne sind für die spezifischen Wechselwirkungen des

IRS mit dem Insulinrezeptor verantwortlich. Die PTB-Domäne des IRS interagiert mit dem NPX(p)Y⁹⁷²-Motiv (Aminosäuren Asparagin-Prolin-X-(phospho)Tyrosin) im Juxtamembranbereich des Insulinrezeptors (KABURAGI et al. 1995). IRS binden nur transient an den Insulinrezeptor (WHITE 1998). Die N-terminale PH-Domäne des IRS ist für die Bindung an Phospholipide verantwortlich, die eine Rekrutierung der IRS an die Plasmamembran ermöglichen, um dort die Phosphatidylinositol-3'-Kinase (PI3K) aktivieren zu können (siehe 1.1.4). Im Rahmen der Interaktion werden IRS-Proteine durch den Insulinrezeptor tyrosinphosphoryliert. Dies ermöglicht die Bindung von Effektorproteinen mit ihrer SH2-Domäne, sogenannte SH2-Adapterproteine (VIRKAMÄKI et al. 1999). Zu den SH2-Adapterproteinen, von denen die meisten keine intrinsische Aktivität besitzen, sondern das Signal durch Protein-Protein-Wechselwirkungen weiterleiten, gehört die regulatorische Untereinheit p85 der PI3K, das *Growth Factor Receptor-bound Protein 2* (Grb2), sowie die Phosphotyrosinphosphatase SHP-2 (VIRKAMÄKI et al. 1999; YOUNGREN 2007).

1.1.4 Signalketten zur Regulation metabolischer Prozesse

Eine Schlüsselrolle in der Regulation metabolischer Prozesse spielt die Phosphatidylinositol-3'-Kinase (**PI3K**). Sie ist eine Lipidkinase, die aus einer regulatorischen Untereinheit (p85) und einer katalytischen Untereinheit (p110) besteht. Zwei SH-Domänen in der regulatorischen Untereinheit interagieren mit einem PTB-Motiv des IRS, wodurch die PI3K an die Plasmamembran rekrutiert und aktiviert wird (siehe Abb 2). Dort katalysiert die PI3K die Phosphorylierung der 3'-Position des Inositolrings von membranständigen Inositolphospholipiden und generiert Phosphatidylinositol-(3,4,5)-Trisphosphat (PI(3,4,5)P₃) aus Phosphatidylinositol-(4,5)-Bisphosphat (PI(4,5)P₂). PI(3,4,5)P₃ rekrutiert nun PH-Domäne-enhaltene Proteine, wie die 3'-Phosphatidylinositol-abhängige Kinase 1 (PDK1) und die Proteinkinase B/Akt zur Plasmamembran (SALTIEL & KAHN 2001; SHEPHERD et al. 1998).

Die **3'-Phosphatidylinositol-abhängige Kinase 1 (PDK1)** ist eine ubiquitär exprimierte Serin/Threoninkinase. Sie besitzt eine N-terminale Kinasedomäne und eine C-terminale PH-Domäne, mit der sie PI(3,4,5)P₃ mit einer hohen Affinität binden kann (siehe Abb. 2). PDK1 phosphoryliert und somit aktiviert die Proteinkinase B/Akt (SCHEID & WOODGETT 2003; VANHAESEBROECK & ALESSI 2000). PDK1 aktiviert darüber hinaus die Proteinkinase C (PKC) (VANHAESEBROECK & ALESSI 2000), die Phosphatasen PTEN (*phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10*) und SHIP (SH2-Domäne-enhaltende Inositol 5'-Phosphatase) (CHANG et al. 2004). Letztere reduzieren PI(3,4,5)P₃-Level und schalten so den PI3K/Akt-Signalweg wieder ab (MATHENEY & ADAMO 2009).

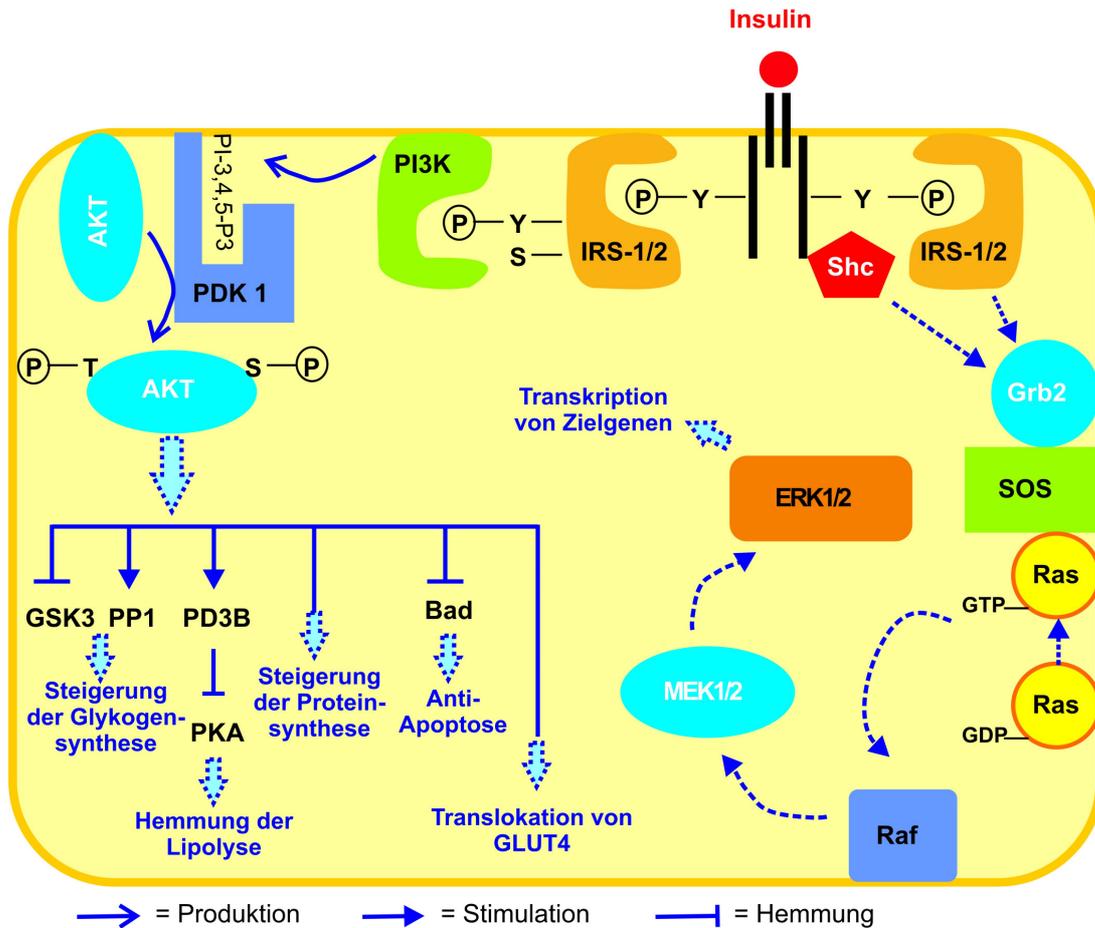


Abbildung 2: Übersicht über die insulinstimulierten Signalwege

Die Bindung von Insulin an seinen Rezeptor führt zur Autophosphorylierung des Rezeptors, wodurch dieser verschiedene Substrate binden und aktivieren kann. Zu ihnen gehören IRS-Proteine, die über die Aktivierung der PI3K metabolische Prozesse in der Zelle auslösen. Die PI3K generiert $PI(3,4,5)P_3$ in der Plasmamembran, wodurch PH-Domäne-enthaltene Proteine wie PDK1 und Akt an die Membran rekrutiert werden. Akt wird PDK1-abhängig phosphoryliert und aktiviert und übt so seine zellulären Wirkungen aus. Die Bindung von IRS-Proteinen und Shc an den phosphorylierten Rezeptor leiten die insulinabhängige Steigerung der Transkription weiterer Zielgene ein. IRS-Proteine und Shc werden phosphoryliert und binden das Adapterprotein Grb2, welches sich an SOS anlagert und so die GTP-Bindung des kleinen G-Proteins Ras ermöglicht. Ras aktiviert Raf und stimuliert dadurch eine Kinase-Kaskade, die über MEK1/2 zur Phosphorylierung und damit zur Aktivierung von ERK1/2 führt. Abkürzungen: Bad = Bcl-assoziiertes Dimer, ERK1/2 = extrazelluläre signal-regulierte Kinasen 1 und 2, GLUT4 = Glucosetransporter 4, GSK3 = Glykogensynthasekinase-3, IRS = Insulinrezeptorsubstrat, MEK1/2 = MAP/ERK-Kinase, PD3B = Phosphodiesterase 3B, PDK1 = 3'-Phosphatidylinositol-abhängige Kinase, PI3K = Phosphatidylinositol-3'-Kinase, PKA = Proteinkinase A, PP1 = Proteinphosphatase 1.

Die **Proteinkinase B/Akt** ist eine Serin/Threoninkinase und gehört zur AGC³-Superfamilie der Proteinkinasen. Das 56 kDa große Phosphoprotein wurde 1977 von STAAL et al. als *c-Akt* (*cellular homology of the transforming retrovirus Akt8*) entdeckt. Durch die

³ AGC steht für: cAMP-abhängige Proteinkinase **A**/Proteinkinase **G**/Proteinkinase **C** (PARKER & PARKINSON 2001).

starke Ähnlichkeit mit der Proteinkinase A (PKA) und der PKC, bekam sie ihren zweiten Namen PKB. Bisher wurden drei Isoformen von Akt identifiziert: Akt1, Akt2, Akt3 bzw. PKB α , PKB β , PKB γ . Sie weisen eine hohe Aminosäurehomologie auf und bestehen aus drei funktionell verschiedenen Regionen: der N-terminalen PH-Domäne, die mit den Lipiden der Plasmamembran interagiert, der zentralen katalytischen Domäne und dem C-terminalen hydrophoben Motiv. Akt1 und Akt2 werden ubiquitär exprimiert, wobei Akt2 die vorherrschende Isoform in insulinempfindlichen Geweben, wie Leber, Skelettmuskel und Fett, ist (DUMMLER & HEMMINGS 2007; MATHENY & ADAMO 2009). Akt2-*knockout*-Mäuse haben einen Defekt in der intrazellulären Weiterleitung des Insulinsignals (CHO et al. 2001). Akt3 hat man bisher nur im Gehirn und Testes in höheren Konzentrationen nachgewiesen (HANADA et al. 2004).

Für die Aktivierung von Akt sind Serin- und Threoninphosphorylierungen notwendig, der Mechanismus ist bei allen Akt-Isoformen identisch. Durch die PI3K-abhängige Bildung von PIns(3,4,5)P₃ wird die Akt-Kinase aus dem Cytosol an die Plasmamembran rekrutiert. Die dadurch vollzogene Konformationsänderung ermöglicht es der ebenfalls an die Plasmamembran rekrutierten PDK1 (siehe Abb. 2), Akt in der Aktivierungsschleife an einem Threoninrest (zwischen PH- und Kinase-Domäne) zu phosphorylieren. Diese Phosphorylierung in der Aktivierungsschleife ist hinreichend für die Aktivierung des Enzyms, seine volle Aktivität wird aber erst durch die Serinphosphorylierung im hydrophoben Bereich erzielt, die das Enzym zudem stabilisiert (ALESSI et al. 1996; FACCHINETTI et al. 2008). Die durch Insulin vermittelte Serinphosphorylierung von Akt wird hauptsächlich mTORC2 (mTOR (*mammalian target of rapamycin*) rictor (*rapamycin-insensitive companion of mTOR*) complex) zugesprochen (CAMERON et al. 2007; SARBASSOV et al. 2005).

Akt stimuliert die Glykogensynthese durch eine Phosphorylierung und Inaktivierung der Glykogensynthasekinase-3 (GSK3) (siehe Abb. 2), die in einer reduzierten Phosphorylierung und demzufolge Aktivierung des Schlüsselenzyms der Glykogensynthese der Glykogensynthase resultiert (CROSS et al. 1995). Darüber hinaus vermag Akt die Proteinphosphatase 1 (PP1) zu aktivieren, ein Enzym das die Glykogensynthase durch Dephosphorylierung aktiviert (LAWRENCE & ROACH 1997). Die Steigerung der Nettoglykogensynthese erfolgt über die insulinabhängige Dephosphorylierung und Hemmung der Glykogenphosphorylase, dem Schlüsselenzym der Glykogenolyse (AISTON et al. 2003). Akt-abhängig wird zudem die Phosphodiesterase 3B (PDE3B) aktiviert (KITAMURA et al. 1999), die den intrazellulären cAMP-Spiegel senkt und somit die Aktivität der PKA vermindert (KITAMURA et al. 1999). Durch die insulinvermittelte Hemmung der PKA-Aktivität wird die Acetyl-CoA-Carboxylase aktiviert, die den geschwindigkeitsbestimmen-

den Schritt in der Fettsäuresynthese darstellt (NAKAE et al. 1999). Dadurch hat Insulin über die Aktivierung von Akt auch einen positiven Effekt auf die Lipacidogenese (Umwandlung von Kohlenhydraten in Fettsäuren). Die insulinstimulierte Akt-Aktivierung steigert auch die Proteinsynthese, indem sie die Translationsmaschinerie aktiviert und die Ribosomenzahl erhöht (PROUD 2006). Insulin vermittelt die Aufnahme von Glucose in Muskel- und Fettgewebe vor allem über die Akt-induzierte Translokation des Glucosetransporters 4 (GLUT4) von vesikulären intrazellulären Kompartimenten zur Plasmamembran (SAKAMOTO & HOLMAN 2008).

Die Aktivierung von Akt führt zur Phosphorylierung von FOXO (*Forkhead Box subclass O*) Transkriptionsfaktoren. Phosphoryliertes FOXO wird aus dem Zellkern geschleust und somit inaktiviert. Über die Inaktivierung von FOXO hemmt Akt die Transkription der Glucose-6-Phosphatase und der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase und somit die Gluconeogenese (PLAS & THOMPSON 2005; ZHANG et al. 2006). Das proapoptotische Molekül Bcl⁴ (Bcl⁴-assoziiertes Dimer) kann durch Akt phosphoryliert werden, wodurch es seine proapoptotische Funktion verliert (DATTA et al. 1997). Dadurch hemmt Akt die Apoptose und verstärkt die Zellproliferation.

1.1.5 Signalkette zur Steigerung der Mitogenese

Die Aktivierung von mitogenaktivierten Proteinkinase (MAPK) initiiert Insulin über die Bindung des Adapterproteins Grb2 mit seiner SH2-Domäne an die phosphorylierten Tyrosinreste des IRS (siehe Abb. 2) (PEARSON et al. 2001). Grb2 kann sich aber auch an das phosphorylierte Protein Shc anlagern, das direkt mit seiner SH2-Domäne an den Insulinrezeptor bindet (YONEZAWA et al. 1994). Shc besitzt eine spezifische PTB-Domäne, die die Interaktion mit dem Insulinrezeptor ermöglicht. Die Bindung von Grb2 resultiert in der Rekrutierung des GTP-Austauschfaktors *son of sevenless* (SOS) zur Plasmamembran, der wiederum die GDP-gebundene Form von Ras in die aktive GTP-gebundene Form überführt (TAKAI et al. 2001). Zur vollständigen Aktivierung von Ras wird die cytoplasmatische Tyrosinphosphatase SHP-2 benötigt, die die Signalgebung oberhalb von Ras reguliert. SHP-2 kann über seine SH2-Domäne an tyrosinphosphorylierte Rezeptoren, sowie an tyrosinphosphorylierte Adapterproteine wie die IRS-Proteine binden. Im Gegensatz zu anderen Proteintyrosinphosphatasen fördert SHP-2 dadurch die Aktivierung von Ras (MATOZAKI et al. 2009).

Das aktivierte kleine G-Protein Ras aktiviert eine Proteinkinasekaskade. Ras bindet und

⁴ Bcl ist ein Protein der gleichnamigen Proteinfamilie. Die Mitglieder der Familie wirken sowohl pro- als auch antiapoptotisch.

aktiviert die Proteinkinase Raf, die wiederum durch Serin/Threoninphosphorylierungen die MAP-Kinase-Kinase phosphoryliert und stimuliert (MKK)⁵. Die Isoformen MEK1 und MEK2 aktivieren ihrerseits die Mitglieder der MAPK-Familie (PEARSON et al. 2001; SALTIEL & KAHN 2001). Zu der Familie der MAP-Kinasen gehören die cJun-N-terminalen Kinasen (JNK), die Isoformen der p38 MAPK, die extrazelluläre signalregulierte Kinase 5 (ERK5), sowie **ERK1** und **ERK2** (HILLS & BRUNSKILL 2008). Letztere gehören zu den am besten untersuchten Mitgliedern der MAPK-Familie. Aufgrund ihrer Größe werden ERK1 und ERK2 auch als p42/p44 MAPK bezeichnet. Sie besitzen zwei Threoninphosphorylierungsstellen in der Aktivierungsschleife, die durch MEK1 und MEK2 phosphoryliert werden (PEARSON et al. 2001). Die aktivierten ERK1/2 interagieren entweder mit cytoplasmatischen Komponenten oder translozieren in den Nukleus. Dort können ERK1/2 die Regulation von sogenannten *immediate early genes*, wie zum Beispiel cFos, steigern. Das Produkt des Protoonkogens cFos ist selbst ein Transkriptionsfaktor der für die Zellproliferation unerlässlich ist (HOCHHOLDINGER et al. 1999).

Ras kann die PI3K durch seine Bindung an die GTP-responsive Domäne der p85-Untereinheit aktivieren (RODRIGUEZ-VICIANA et al. 1994). Dies spricht für einen Crosstalk zwischen dem PI3K- und dem Ras/ERK-Signalweg. Ebenso kann ERK1/2 durch die PKC und die PI3K aktiviert werden (MORRISON & CUTLER 1997). PI3K-Lipidprodukte, wie zum Beispiel PIns(3,4,5)P₃, aktivieren Mitglieder der PKC-Familie (TOKER et al. 1994), die den MAPK-Signalweg durch die Phosphorylierung von Raf aktivieren (DUCKWORTH & CANTLEY 1997).

1.1.6 Negativer Rückkopplungsmechanismus der Insulinsignalkette

Es gibt Mechanismen, die zu einer negativen Rückkopplung der Insulinsignalkette führen. Durch Insulin aktivierte Serinkinasen, wie zum Beispiel die JNK, können IRS an kritischen Serinresten phosphorylieren und somit die Weiterleitung des Signals blockieren (AGUIRRE et al. 2002). IRS-Proteine können durch Serinphosphorylierung nicht mehr als Substrat für den Insulinrezeptor fungieren (GUAL et al. 2005). Die insulinabhängige Aktivierung der Kinase mTOR kann ebenfalls durch Serinphosphorylierung des IRS zur Unterbrechung der Insulinsignalkette führen (TZATSOS & KANDROR 2006). Der negative Rückkopplungsmechanismus findet aber auch auf transkriptioneller Ebene statt, indem die Genexpression des Insulinrezeptors reguliert wird. In Abwesenheit von Insulin, also während des Fastens, bindet FOXO an den Promotor des Insulinrezeptors und stimuliert die Genexpression. Die insulinabhängige Phosphorylierung von FOXO hemmt somit die

⁵ MKK wird auch als MAP/ERK-Kinase (MEK) bezeichnet.

FOXO-abhängige Transkription des Insulinrezeptors (PUIG & TIJAN 2005). Darüber hinaus reduziert Insulin selbst die Konzentration zellulärer Insulinrezeptoren, indem es die Internalisierung und den Abbau des Proteins fördert (OKABAYASHI et al. 1989).

1.2 Die Rolle der insulinstimulierten Signalwege im ZNS

Insulin spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation der Energiehomöostase durch das ZNS. Es wird glucoseabhängig freigesetzt und hemmt durch seine Wirkung im Hypothalamus die Nahrungsaufnahme, steigert den Energieverbrauch und verringert die hepatische Glucoseproduktion (siehe Abb. 3). Leptin, das proportional zur Körperfettmasse sezerniert wird, aber auch Nährstoffe selbst, wie Glucose und freie Fettsäuren, wirken ebenfalls im Hypothalamus und führen zu einer verringerten Nahrungsaufnahme. Leptin und Insulin informieren das Gehirn somit fortwährend über die Körperfettmasse und die aufgenommene Glucose. Beide Hormone werden über die Blut-Hirn-Schranke transportiert (SCHWARTZ & PORTE et al. 2005; WOODS & D'ALLESSIO 2008).

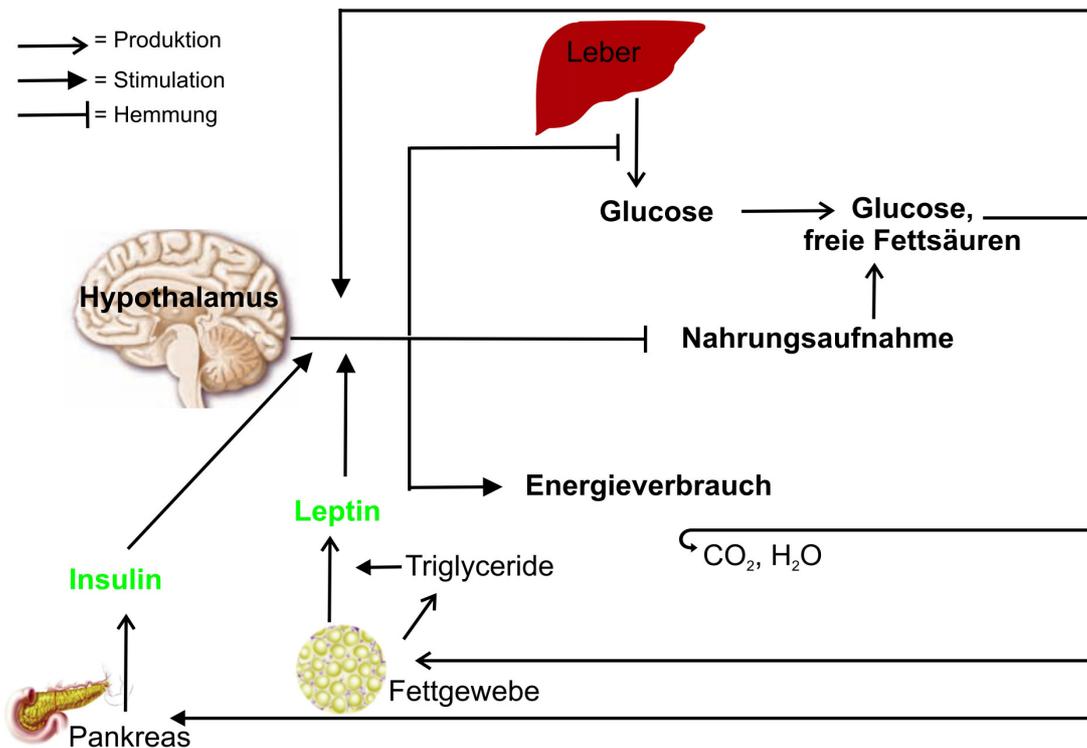


Abbildung 3: Schema zur Kontrolle der Nahrungsaufnahme

Dieses Schema zeigt ein Modell zur Kontrolle des Energiegleichgewichts und der hepatischen Glucoseproduktion durch Glucose und freie Fettsäuren. Der Hypothalamus verarbeitet die Information von Hormonen wie Insulin und Leptin, die proportional zur Körperfettmasse und der aufgenommenen Nahrung sezerniert werden. Der Organismus reagiert auf diese Signale (Glucose und freie Fettsäuren) mit einer Hemmung der hepatischen Glucoseproduktion, einem gesteigerten Energieverbrauch und einer Hemmung der Nahrungsaufnahme.

Die wichtigsten Zentren des Hypothalamus, die in die Nahrungsaufnahme involviert sind, sind der *Nucleus arcuatus* und der *Nucleus paraventricularis*. Im *Nucleus arcuatus* sind Insulin- und Leptinrezeptoren co-exprimiert mit dem anorexigenen Neuropeptid Proopiomelanocortin (**POMC**), welches die Vorstufe des Neurotransmitters *α-melanocyte-stimulating hormone* (**α-MSH**) darstellt, sowie mit den orexigenen Peptiden Neuropeptid Y (**NPY**) und dem Agouti-related Protein (**AgRP**) (BENOIT et al. 2002). α-MSH bindet an neuronale Melanocortin3/4-Rezeptoren (MC3R/MC4R) und aktiviert dadurch den anorexigenen Melanocortinsignalweg. AgRP wirkt antagonistisch an den MC3R/MC4R. Der Signalweg über die POMC-Neuronen verringert die Nahrungsaufnahme und steigert den Energieverbrauch, indem es die Fettverbrennung erhöht. Bei langanhaltender Aktivität geht Körperfettanteil verloren. Im Gegensatz dazu resultiert der Signalweg über die NPY/AgRP-Neuronen in einer gesteigerten Nahrungsaufnahme. Insulin und Leptin hemmen die Bildung und Freisetzung der orexigenen Neuropeptide NPY und AgRP und stimulieren die Bildung und Freisetzung des anorexigenen Neuropeptids POMC (siehe Abb. 4). Die verringerte Freisetzung von NPY und dem AgRP, sowie die gesteigerte Freisetzung von α-MSH resultieren in einer Hemmung der Nahrungsaufnahme. Neuronen des *Nucleus paraventricularis* werden darüber hinaus von Neuriten des *Nucleus arcuatus* erreicht⁶. Diese Neuronen exprimieren MC3R/MC4R und werden von AgRP/NPY-Neuronen gehemmt und von POMC-Neuronen stimuliert, da das AgRP antagonistisch an MC3R/MC4R wirkt und α-MSH an diesen Rezeptor bindet. Die Insulin- und Leptinsignalgebung über Neuronen des *Nucleus paraventricularis* führt demzufolge ebenso zur Hemmung der Nahrungsaufnahme (PLUM et al. 2006; WOODS & D'ALESSIO 2008).

⁶ Deswegen werden Neuronen aus dem *Nucleus arcuatus* als ‚first order neurons‘ und Neuronen aus dem *Nucleus paraventricularis* als ‚second order neurons‘ bezeichnet (SMITH & FERGUSON 2008).

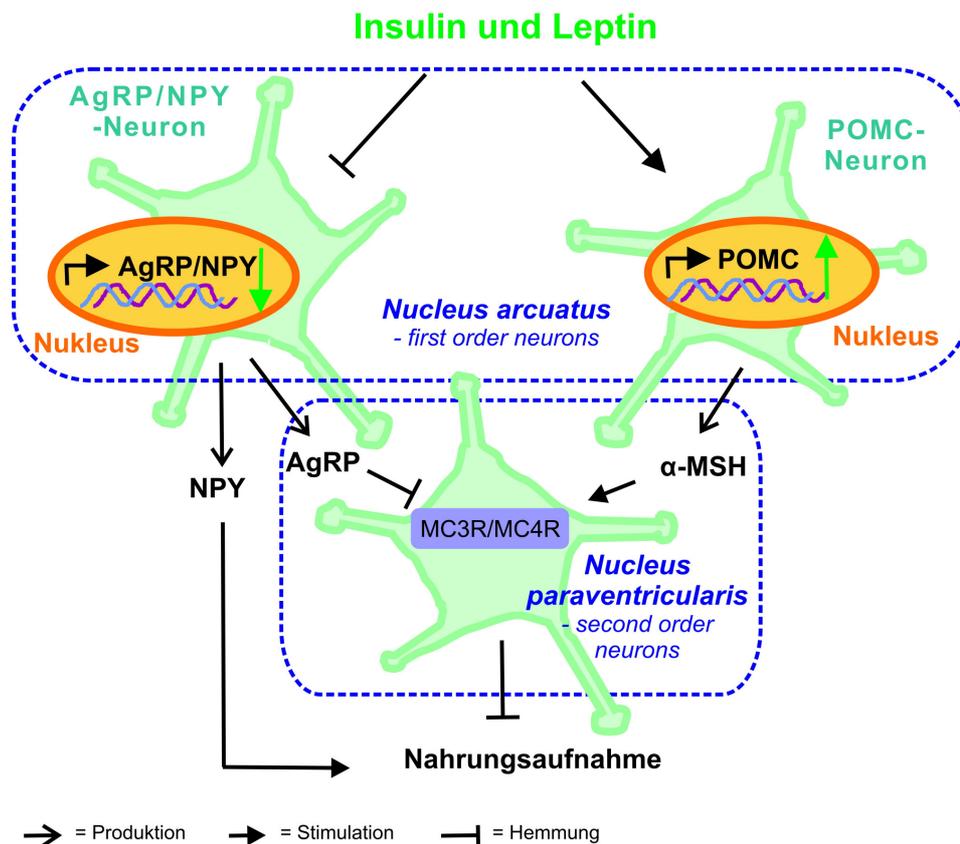


Abbildung 4: Mechanismus der Insulin- und Leptinaktivität im Hypothalamus

Insulin und Leptin üben im *Nucleus arcuatus* des Hypothalamus eine hemmende Wirkung auf NPY/AgRP-Neuronen und eine stimulierende Wirkung auf POMC-Neuronen aus. Dies führt zur Freisetzung des anorexigenen Peptides α -MSH, welches aus POMC gebildet wird, sowie zu einer verringerten Freisetzung der orexigenen Peptide NPY und AgRP. Dadurch kommt es zur Hemmung der Nahrungsaufnahme. Neuriten des *Nucleus arcuatus* erreichen darüber hinaus Neuronen des *Nucleus paraventricularis*. Das freigesetzte α -MSH bindet dort an seinen MC3R/MC4R und aktiviert den anorexigenen Melanocortinsignalweg. Da das AgRP antagonistisch an MC3R/MC4R wirkt, kommt es folglich durch die Insulin- und Leptinsignale über Neuronen des *Nucleus paraventricularis* ebenso zur Hemmung der Nahrungsaufnahme.

Die Bindung von Insulin an seinen Rezeptor aktiviert die PI3K über Akt in den Neuronen des *Nucleus arcuatus*. Dies führt zur Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors FOXO1 im Nucleus (siehe 1.1.4). Phosphoryliertes FOXO1 wird aus dem Zellkern ausgeschleust und somit inaktiviert (siehe Abb. 5). Dies führt zu einer gesteigerten Gentranskription von POMC und einer Hemmung der Transkription des AgRP und resultiert in einer verringerten Nahrungsaufnahme. Leptin übermittelt seine intrazelluläre Signalgebung über die lange Form des Leptinrezeptors. Leptin stimuliert so die Tyrosinkinase Januskinase 2 (JAK2), die wiederum den *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) an Tyrosinresten phosphoryliert. Phosphorylierte STAT3-Dimere gelangen in den Nucleus und fördern die Transkription von POMC und hemmen die AgRP-Transkription. Dies führt ebenso zu einer verringerten Nahrungsaufnahme (PLUM et al. 2006). In einigen Zellen, wie auch den neuronalen Zellen, kann Leptin zusätzlich den IRS-PI3K-Signalweg aktivieren (NISWENDER et al. 2003).

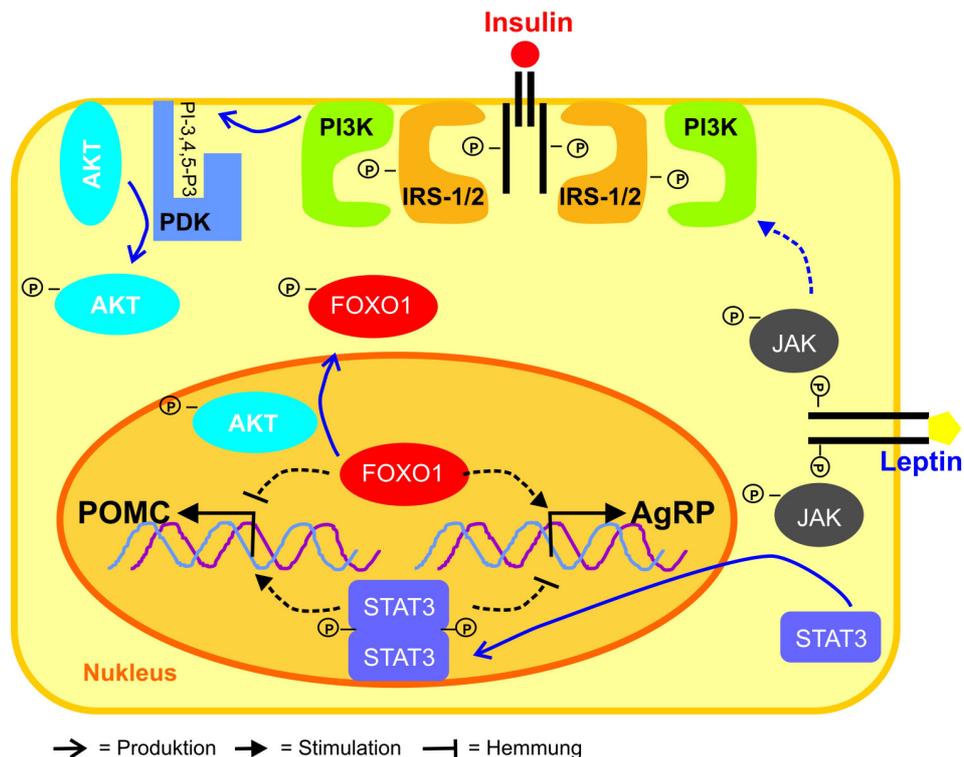


Abbildung 5: POMC- und AgRP-Transkription durch Insulin und Leptin

Insulin und Leptin führen über die Aktivierung des PI3K-Akt-Signalweges zur Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors FOXO1. Phosphoryliertes FOXO1 wird aus dem Nucleus ausgeschleust und somit inaktiviert. Foxo1 hemmt die POMC-Transkription und steigert die AgRP-Transkription. Durch die Akt-abhängige Phosphorylierung von FOXO1 stimulieren Insulin und Leptin die POMC-Transkription und hemmen die AgRP-Transkription. Die Bindung von Leptin an seinen Rezeptor aktiviert den JAK-STAT3-Signalweg. Phosphorylierte STAT3-Dimere gelangen in den Nucleus und stimulieren die POMC-Transkription und hemmen die AgRP-Transkription.

1.3 Die Insulinresistenz – Entzündungsprozesse bei Adipositas

Insulinresistenz beschreibt einen Zustand des Körpers, in dem die insulinabhängige Glucoseverwertung der Zielgewebe, wie Leber, Fett- und Muskelgewebe deutlich herabgesetzt ist. Wenn die erhöhte kompensierende Insulinsekretion des Pankreas nicht mehr ausreicht, um die hepatische Glucoseproduktion zu unterdrücken und die Glucoseaufnahme in Fett und Muskel zu induzieren, entsteht das Krankheitsbild des Diabetes mellitus Typ II. Neben genetischen Determinanten und Ernährungsfaktoren ist Adipositas der bedeutendste Risikofaktor zur Ausbildung einer Insulinresistenz. Die Ausbildung einer Insulinresistenz wird durch eine die Adipositas häufig begleitende unterschwellige Entzündung begünstigt. Von den Entzündungszellen freigesetzte Zytokine tragen zur Ausprägung der Insulinresistenz bei (WELLEN & HOTAMISLIGIL 2005; ZEYDA & STULNIG 2009).

Durch die Zunahme der Fettgewebssmasse kommt es zur Überproduktion von Zytokinen und Chemokinen, die für die adipositasinduzierte Entzündung verantwortlich sind (siehe Abb. 6). Hierzu gehören TNF α (Tumornekrosefaktor α), Interleukin-6 (IL-6), IL-1 und das Adipokin⁷ Leptin. Die proinflammatorischen Zytokine TNF α und IL-1 aktivieren die JNK und den IKK β (Inhibitor der NF- κ B Kinase)/NF- κ B (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) Weg. Die beiden Serin/Threoninkinasen **JNK** (AGUIRRE et al. 2000) und **IKK β** (GAO et al. 2002) phosphorylieren IRS an Serinresten und blockieren dadurch die aktivierende Tyrosinphosphorylierung durch den Insulinrezeptor. Darüber hinaus kann IKK β den Inhibitor von NF- κ B phosphorylieren und somit den Transkriptionsfaktor NF- κ B aktivieren, der wiederum die Expression von Zytokinen wie TNF α und IL-6 stimuliert (SHOELSON et al. 2003). Das Zytokin IL-1 kann auch über die Aktivierung der Serin/Threoninkinasen **ERK1/2** zur gestörten Insulinsignalgebung beitragen (JAGER et al. 2007). Auch die Serin/Threoninkinase **mTOR**, die während der adipositasinduzierten Insulinresistenz verstärkt aktiviert ist (KHAMZINA et al. 2005), kann die Insulinweiterleitung blockieren (siehe 1.1.6). Bei der Aktivierung von mTOR spielt das Adipokin Adiponektin eine Rolle, welches eine insulinsensitivierende Wirkung hat (BASTARD et al. 2006). Adipositas geht mit verringerten Adiponektinspiegeln einher (HU et al. 1996). Die durch Adiponektin aktivierte AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) stimuliert die Aktivität des *tuberous sclerosis complex 1/2* (TSC1/2) (YAMAUCHI et al. 2003), welcher den mTOR-Signalweg negativ regulieren kann (HARRINGTON et al. 2004). Demzufolge resultiert die verringerte Adiponektinfreisetzung bei Adipositas in einer gesteigerten mTOR-Aktivierung. Da TNF α und IL-6 die Adiponektinfreisetzung in Adipozyten hemmen (BRUUN et al. 2003), tragen die beiden Zytokine neben der Aktivierung von Serin/Threoninkinasen über einen weiteren Mechanismus zur Insulinresistenz bei.

Neben der Serin/Threoninkaskade tragen weitere Mechanismen im Fettgewebe zur entzündungsinduzierten Insulinresistenz bei. IL-6 wie auch das Adipokin Leptin können **SOCS**-Proteine (*suppressor of cytokine signaling*) induzieren (SENN et al. 2003). Zum einen können SOCS-Proteine direkt an phosphorylierte Tyrosinreste des Insulinrezeptors binden und somit mit den IRS um die Bindung konkurrieren, ohne jedoch die Autophosphorylierung des Rezeptors zu verhindern (UEKI et al. 2004). Zum anderen verstärken SOCS-Proteine durch die Bindung an IRS die Ubiquitylierung und proteasomale Degradation des IRS (RUI et al. 2002). Hierbei binden SOCS-Proteine mit ihrem

⁷ Adipokine, wie zum Beispiel Leptin (ZHANG et al. 1994) und Adiponektin (MAEDA et al. 1996), werden ausschließlich in Adipozyten gebildet. Die hier genannten Zytokine werden dagegen auch in anderen Geweben gebildet.

Elonginbindemotiv in der sogenannten SOCS-Box an den E3 Ubiquitinligasekomplex, wodurch die IRS abgebaut werden (KAMURA et al. 1998). SOCS-Proteine können jedoch nicht nur im Fettgewebe, sondern auch in neuronalen Zellen eine Insulinresistenz auslösen (MORI et al. 2004).

Durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (**ROS**) spielt zellulärer Stress ebenfalls eine Rolle bei der Initiation und Regulation von Entzündung und gestörter Insulinsignalgebung. ROS wie auch mitochondrialer Stress haben das Potential, die JNK und IKK β zu aktivieren. Entzündungen selbst, wie auch die gesteigerte Freisetzung von freien Fettsäuren bei Adipositas führen zur Bildung von ROS (EVANS et al. 2003; HOTAMISLIGIL 2006).

Insulinrezeptoren sind nicht nur in den peripheren Geweben, sondern auch im ZNS exprimiert (HAVRANKOVA et al. 1978). Insulin gelangt über die Blut-Hirn-Schranke mittels eines aktiven rezeptorvermittelten Transportsystems ins Gehirn (SCHWARTZ et al. 1991), kann wohl aber auch zu einem kleinen Teil im Gehirn selbst produziert werden (PARK et al. 2001). Adipöse weisen geringere Insulinkonzentrationen im Gehirn als Normalgewichtige auf (KERN et al. 2006). Hierbei kommt es durch die erhöhten Plasma-insulinpiegel, die auf eine periphere Insulinresistenz zurückzuführen sind, zu einem gestörten Insulintransport über die Blut-Hirn-Schranke (KAIYALA et al. 2000). Neben der verringerten Effizienz des Insulintransportes über die Blut-Hirn-Schranke ist aber auch eine reduzierte Insulinsensitivität der Gehirnregionen, die in den Mechanismus der Energiehomöostase involviert sind (siehe 1.2), zu beobachten (HALLSCHMID et al. 2008). Auf molekularer Ebene scheint ein Defekt im IRS-PI3K-Signalweg eine Ursache für diese lokale Insulinresistenz zu sein (HALLSCHMID & SCHULTES 2009; SCHWARTZ & PORTE 2005). Es wurde zudem aber auch eine Verringerung der Insulinrezeptoren beobachtet (OBICI et al. 2002). Adipositas und Diabetes mellitus Typ II stehen in engem Zusammenhang mit der zentralen Insulinresistenz (CARDOSO et al. 2009). Wie auch im peripheren Gewebe, werden als Folge einer Überernährung im Hypothalamus inflammatorische Signalwege aktiviert (ZHANG et al. 2008). Auch hier wird die Ausbildung der Insulinresistenz mit proinflammatorischen Zytokinen in Verbindung gebracht (POSEY et al. 2009).

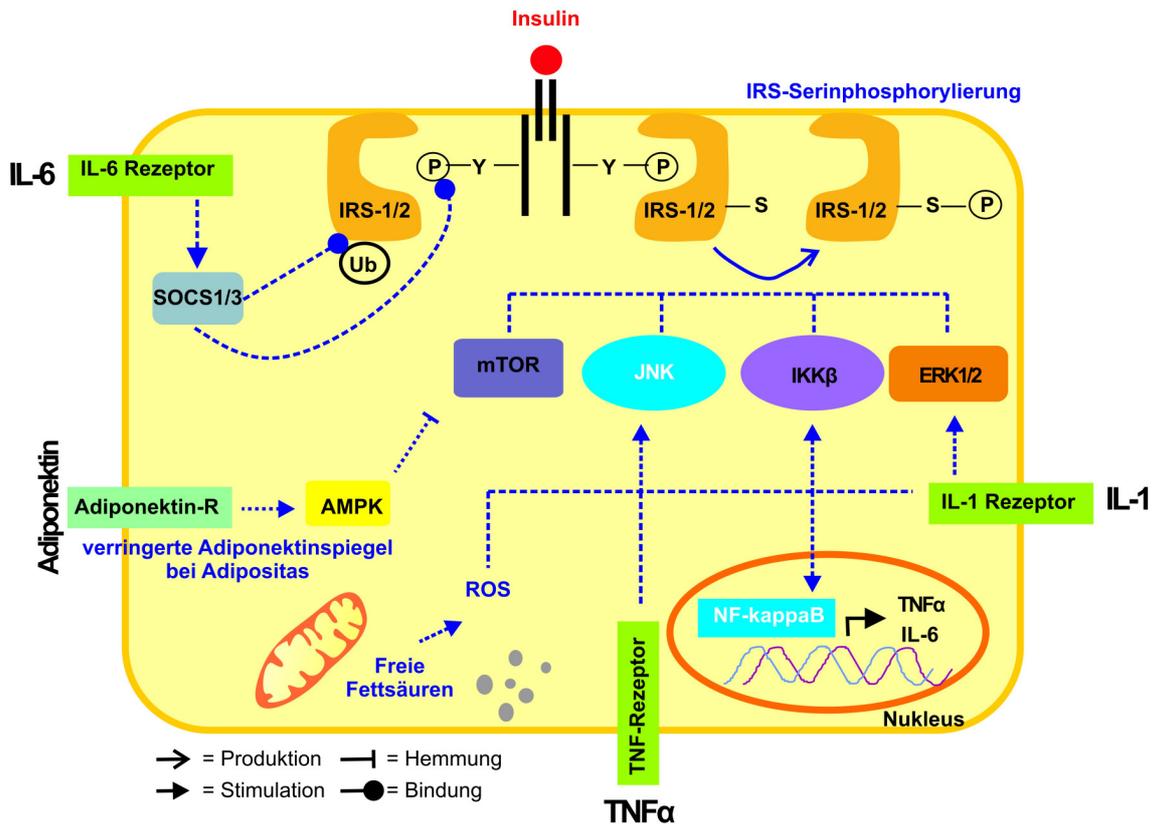


Abbildung 6: Mediatoren und Signalwege die zur Insulinresistenz führen

Inflammatorische Signalwege tragen zur Ausbildung einer Insulinresistenz bei. Die proinflammatorischen Zytokine TNF α und IL-1 aktivieren die JNK und den IKK β /NF- κ B Weg, welche die beiden intrazellulären Hauptregulatoren der Insulinresistenz darstellen. Die beiden Serin/Threoninkinasen JNK und IKK β können IRS an kritischen Serinresten phosphorylieren und somit das Insulinsignal blockieren. IL-1 kann auch über die ERK1/2-vermittelte Serinphosphorylierung des IRS zur gestörten Insulinsignalgebung beitragen. Die verringerten Adiponektinspiegel bei Adipositas führen zu einer gesteigerten mTOR-Aktivierung, die wiederum das Insulinsignal blockieren kann. IL-6 ist ein weiteres Zytokin involviert in die Ausbildung der Insulinresistenz. Es kann SOCS-Proteine induzieren und dadurch die Ubiquitynylierung und den proteasomalen Abbau der IRS verstärken. SOCS-Proteine können aber auch direkt an phosphorylierte Tyrosinreste des Insulinrezeptors binden und so die Weiterleitung des Signals blockieren. Durch mitochondrialen Stress oder freie Fettsäuren induzierte ROS können ebenfalls an der entzündungsassoziierten Insulinresistenz beteiligt sein. IKK β aktiviert den Transkriptionsfaktor NF- κ B, der wiederum die Expression von TNF α und IL-6 stimuliert.

1.4 Prostaglandin E₂

Prostanoide sind hormonähnliche Substanzen, die an Entzündungsreaktionen im menschlichen Körper beteiligt sind. Zu ihnen zählen Prostaglandinen, Prostacycline und Thromboxane. Sie werden als Reaktion auf verschiedene Stimuli, wie zum Beispiel proinflammatorische Zytokine, in praktisch allen Geweben freigesetzt. Unter den Prostanoiden ist Prostaglandin E₂ (PGE₂) das am häufigsten synthetisierte Prostaglandin (NARUMIYA et al. 1999). PGE₂ kann die Blut-Hirn-Schranke passieren (EGUCHI et al. 1988), wird aber auch zentral synthetisiert (CAO et al. 1996). Es entsteht aus der durch die Phospholipase-A2 aus der Plasmamembran freigesetzten Arachidonsäure durch Cyclooxygenase(COX)-Enzyme (FUNK 2001). Im initialen Schritt der COX-Reaktion katalysieren

COX-Enzyme die Bildung des instabilen Zwischenproduktes Prostaglandin G_2 . Anschließend wird Prostaglandin G_2 durch die Peroxydaseaktivität der COX-Enzyme zu Prostaglandin H_2 reduziert (SMITH et al. 2000). Prostaglandin H_2 ist die Vorstufe für verschiedene strukturell verwandte Prostaglandine, die durch spezifische Prostaglandinsynthasen gebildet werden. PGE_2 wird durch die PGE-Synthase gebildet (CHA et al. 2006). Bei der Cyclooxygenase wird zwischen der konstitutiven COX-1, die in allen Geweben exprimiert ist, und der durch Entzündung induzierbaren COX-2 unterschieden (SMITH et al. 1996).

PGE_2 übt seine Wirkungen über vier spezifische heptahelikale Transmembranrezeptoren (EP1-R, EP2-R, EP3-R, EP4-R) aus, die an heterotrimere G-Proteine gekoppelt sind. Für den EP3-R existieren in der Maus im C-terminalen Bereich drei Spleißvarianten: EP3 α , EP3 β , EP3 γ , wobei EP3 α sensitiv für die Desensibilisierung ist (COLEMAN et al. 1994; IRIE et al. 1993). Die verschiedenen PGE_2 -Rezeptoren weisen nur eine geringe Ähnlichkeit auf (SUGIMOTO & NARUMIYA 2007). Von den vier PGE_2 -Rezeptoren sind der EP3- und der EP4-R im ganzen Körper am weitesten verbreitet. Die Expression des EP1-R ist auf einige Organe beschränkt, wie zum Beispiel Lunge und Niere. Der EP2-R wird insgesamt am wenigsten exprimiert. Im Hypothalamus sind alle vier Rezeptoren exprimiert, jedoch ist der EP3-R im Gehirn am weitesten verbreitet (NARUMIYA et al. 1999, SUGIMOTO et al. 1994).

Die Aktivierung des **EP1-R** führt zu einer Erhöhung der freien intrazellulären Calciumkonzentration. Diese PGE_2 -abhängige Regulation der Ca^{2+} -Kanäle wird über ein bisher nicht identifiziertes G-Protein reguliert. Als G_q -gekoppelter Rezeptor führt der EP1-R aber auch zur Aktivierung der Phospholipase C (PLC) und dadurch zur Bildung der *second messenger* Inositoltriphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG). IP_3 führt zum Ausstrom von Ca^{2+} aus dem Endoplasmatischen Retikulum ins Cytosol, DAG aktiviert die PKC. Die PKC selbst kann nun als Serin/Threoninkinase IRS serinphosphorylieren und dadurch die Signalweiterleitung unterbrechen (DE FEA & ROTH 1997). Über den G_q -gekoppelten EP1-R kann aber auch ERK1/2 über die PKC Ras/Raf-abhängig aktiviert werden (SCHÖNWASSER et al. 1998). Neben der PKC-vermittelten Aktivierung kann ERK1/2 auch noch über den Mechanismus der *Epidermal Growth Factor-Receptor* (EGFR)-Transaktivierung phosphoryliert werden. PGE_2 kann über alle G-Proteine den EGFR transaktivieren (BUCHANAN et al. 2003; PAI et al. 2002). Hierbei kommt es durch die $\beta\gamma$ -Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine zur intrazellulären Aktivierung der Src-Kinase, die wiederum den EGFR tyrosinphosphorylieren und somit aktivieren kann. Dies führt zu einer gesteigerten ERK1/2-Phosphorylierung (DENT et al. 1999).

EP2-R und **EP4-R** sind beide an ein G_s -Protein gekoppelt. PGE_2 stimuliert über diese beiden Rezeptoren die Adenylatzyklase und erhöht somit die intrazelluläre cAMP-Konzen-

tration (NEUSCHÄFER-RUBE et al. 1997; SCHWANER et al. 1995). Dies hat eine gesteigerte Aktivität der PKA zur Folge. Da es sich bei beiden Rezeptoren um eine G_s -gekoppelte Signalweiterleitung handelt, wurden die Rezeptoren zunächst nicht unterschieden, obwohl sie nur eine Homologie von 30 % und funktionelle Unterschiede in der Signalgebung aufweisen (REGAN et al. 1994). So ist der EP2-R viel stärker an die Signalgebung über cAMP gekoppelt als der EP4-R, bei dem die maximale cAMP-Bildung nur 20-50% der cAMP-Bildung des EP2-R beträgt (FUJINO et al. 2002/2005). Dies hängt damit zusammen, dass der EP4-R desensibilisiert wird und somit nicht so effektiv an das G_s -Protein koppeln kann wie der EP2-R (DESAI & ASHBY 2001). Der EP4-R, nicht jedoch der EP2-R, kann darüber hinaus cAMP/PKA-unabhängig die PI3K (FUJINO & REGAN 2006) und ERK1/2 aktivieren (DESAI & ASHBY 2001). Diese PKA-unabhängige EP4-R-vermittelte Signalübertragung ist G_i -gekoppelt (FUJINO & REGAN 2006).

Der **EP3-R** ist G_i -Protein gekoppelt und hemmt die intrazelluläre cAMP-Bildung durch die Reduktion der Adenylatzyklaseaktivität (NEUSCHÄFER-RUBE et al. 1997). Über die β -Isoform des Rezeptors ist die PGE_2 -Signalgebung auch an ein G_q -Protein gekoppelt, wodurch die PLC aktiviert wird (AN et al. 1994), was wiederum zur Aktivierung von ERK1/2 führt. Vor allem die Aktivierung von ERK1/2, die der Insulin- und der PGE_2 -Signalgebung gemein ist, zeigt, dass eine Wechselwirkung der beiden Signalwege möglich ist.

In der Leber limitiert PGE_2 die Akutphaseantwort, da es die IL6-abhängige Induktion positiver Akutphaseproteine hemmt (FENNEKOHL et al. 2000). Darüber hinaus beeinflusst PGE_2 in Hepatozyten den Kohlenhydratmetabolismus, indem es die Aktivität und Expression von glucogenen Schlüsselenzymen kontrolliert und sowohl glykogenolytisch als auch antiglykogenolytisch wirkt (PÜSCHEL et al. 1993). PGE_2 spielt aber auch eine Rolle im ZNS, dort ist es verantwortlich für Fieber (DERIJK & BERKENBOSCH 1991; OSBORN et al. 2008). PGE_2 scheint auch bei der Kontrolle des Körpergewichtes eine bedeutende Rolle zu spielen: es hemmt die Lipolyse und die Sekretion von Leptin im Fettgewebe (FAIN et al. 2000). Adipöse weisen erhöhte PGE_2 -Spiegel im Fettgewebe auf (FAIN et al. 2002). EP3-*knockout*-Mäuse weisen ein gesteigertes Fressverhalten auf, welches in einem adipösen Phänotyp mit erhöhten Leptin- und Insulinspiegeln resultiert (SANCHEZ-ALAVEZ et al. 2006).

1.5 Endocannabinoide

Endocannabinoide sind endogene Lipidmediatoren, die mit der psychoaktiven Komponente Tetrahydrocannabinol (THC)⁸ strukturell verwandt sind und die an Endocannabinoidrezeptoren binden. N-Arachidonylethanolamin bzw. Anandamid (DEVANE et al. 1992) und 2-Arachidonylglycerol bzw. 2-AG (MECHOULAM et al. 1995) wurden neben wenigen weiteren möglichen Liganden als Endocannabinoide identifiziert (MATIAS et al. 2008). Im Gegensatz zu klassischen Neurotransmittern werden Endocannabinoide nicht gespeichert, sondern als Antwort auf zellulären Stress, der mit einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration einhergeht, produziert. Phospholipide der Plasmamembran sind die Vorstufen der Endocannabinoide. Endocannabinoide entstehen nach Spaltung der Phosphodiesterbindung durch eine bisher unbekannte Ca^{2+} -abhängige Phospholipase. Durch intrazelluläre Enzyme werden sie schnell wieder abgebaut. Das Endocannabinoidsystem besteht aus den [Endo]Cannabinoidrezeptoren, den Endocannabinoiden selbst und einer Reihe von endocannabinoidsynthetisierenden und -abbauenden Enzymen (COTA et al. 2003a, ENGELI 2008; PIOMELLI 2003).

Endocannabinoide wirken auf der Ebene des ZNS, dort führen sie zu einer gesteigerten Nahrungsaufnahme (COTA et al. 2003a). Der Hypothalamus erhält Hunger- und Sättigungssignale aus der Peripherie und interagiert dadurch mit dem Endocannabinoidsystem (ENGELI 2008). So reduziert zum Beispiel das Sättigungssignal Leptin die Endocannabinoidspiegel im Gehirn und der Peripherie und trägt dadurch zur verringerten Nahrungsaufnahme bei (DI MARZO et al. 2001). Endocannabinoide weisen neben ihrer Bedeutung in der zentralen Kontrolle der Nahrungsaufnahme auch periphere metabolische Effekte auf. Sie stimulieren die Adipogenese sowie die Lipogenese in Adipozyten und reduzieren die Expression des antiinflammatorischen Adipokins Adiponektin. Im Muskel werden erhöhte Endocannabinoidspiegel mit einer verringerten Insulinsensitivität und einer herabgesetzten Glucosetoleranz assoziiert (COTA 2007). In der Leber induzieren Endocannabinoide die *de novo* Fettsäuresynthese über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors *steroid regulatory element-binding protein* (SREBP)-1c, der die Expression der Fettsäuresynthase kontrolliert (NOGUEIRAS et al. 2008).

Die beiden heptahelikalen transmembranen Endocannabinoidrezeptoren CB1-R und CB2-R gehören zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren, sie sind G_i -gekoppelt (FELDER et al. 1995). Die Aktivierung beider Rezeptoren führt demnach zu einer ver-

⁸ THC wurde 1964 von GAONI & MECHOULAM aus der Hanfpflanze Cannabis isoliert. Cannabis ist der Oberbegriff für Haschisch und Marijuana.

ringerten cAMP-Synthese. Durch die Kopplung an ein G_0 -Protein können Endocannabinoide die Aktivität verschiedener Ionenkanäle modulieren (DEADWYLER et al. 1995). Der **CB2-R** ist überwiegend auf peripheren Zellen des Immunsystems lokalisiert (HOWLETT et al. 2002). Der **CB1-R** dagegen ist vor allem im Gehirn exprimiert (HERKENHAM et al. 1990), geringere Expressionsspiegel sind aber auch im peripheren Gewebe zu finden (GALIÈGUE et al. 1995). In Neuronen ist der CB1-R auf Axonen und Nervenendigungen lokalisiert. Die präsynaptische Expression des CB1-R ermöglicht die sogenannte „retrograde Signalgebung“ – hierbei kommt es durch die postsynaptische transmitterstimulierte Freisetzung von Endocannabinoiden zur nachfolgenden Hemmung der Transmitterfreisetzung durch präsynaptische CB1-R (CHRISTIE & VAUGHAN 2001). Serotonin, Noradrenalin, Glutamat und GABA (γ -Aminobuttersäure) gehören zu der Gruppe von Neurotransmittern, die durch präsynaptische CB1-R Stimulation verringert werden (COTA et al. 2003a). CB1-R-abhängig kann ERK1/2 aktiviert werden (BOUABOULA et al. 1995; GALVE-ROPERH et al. 2002). Somit ist auch hier eine Wechselwirkung der Insulin- und Endocannabinoidsignalübertragung möglich.

1.6 Ziel der Arbeit

In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass PGE_2 , das im Zuge der die Adipositas begleitende lokale oder systemische Entzündungsreaktion gebildet wird, über eine EP3-R-vermittelte ERK1/2-Aktivierung die Insulinsignalweiterleitung in Hepatozyten negativ moduliert (HENKEL et al. 2009). Die Ausstattung von Hepatozyten mit den unterschiedlichen EP-Rezeptoren variiert aber stark zwischen den unterschiedlichen Spezies und ist zudem offensichtlich vom Funktionszustand abhängig (FENNEKOHL et al. 1999). Daher war es das erste Ziel dieser Arbeit, den Einfluss von PGE_2 über seine vier Rezeptorsubtypen auf den Insulinsignalweg zu untersuchen. Hierzu wurden stabil transfizierte Zelllinien generiert und charakterisiert, die jeweils nur einen der vier EP-Rezeptorsubtypen exprimierten.

Eine gesteigerte PGE_2 -Bildung im Rahmen der Adipositas ist nicht auf die peripheren Gewebe beschränkt. Im Hypothalamus werden bei Adipositas erhöhte Konzentrationen von Markern der inflammatorischen Signalgebung nachgewiesen (POSEY et al. 2009), die letztendlich zur gesteigerten PGE_2 -Bildung führen können. Daher war es ein weiteres Ziel der Arbeit, das EP-Rezeptorprofil von primären hypothalamischen Neuronen und Modellzelllinien zu charakterisieren und zu prüfen, ob PGE_2 in hypothalamischen Neuronen die Insulinrezeptorsignalkette in ähnlicher Weise unterbricht wie in Hepatozyten. Schließlich sollte geprüft werden, ob Endocannabinoide, die ebenfalls bei Adipositas im Hypothalamus erhöht sind (ENGELI et al. 2005), über ihre mit den EP-Rezeptoren ver-

wandten Rezeptoren die Insulinsignalweiterleitung in ähnlicher Weise beeinflussen können wie PGE_2 .

2 MATERIAL

2.1 Tiere und Tierhaltung

Es wurden weibliche Wistar-Unilever-Ratten aus der Zucht der Firma Charles River (Sulzfeld) verwendet. Die Tiere wurden in einem 12-stündigen Hell/Dunkel-Rhythmus (7-19 Uhr Hellphase) bei einer Raumtemperatur von 19-23°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 % gehalten. Sie wurden mit der Rattenhaltungsdiät 1326 (altromin, Gesellschaft für Tierernährung, Lage) unter freiem Nahrungs- und Wasserzugang ernährt.

2.2 Biochemikalien

Acrylamid (Rotiphorese® Gel 30)	Roth	Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Biomol	Hamburg
Ampicillin	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Arachidonyl 2'-chloroethylamid (ACEA)	Alexis Biochemicals	Lörrach
BES (PUFFERAN® ≥99 %)	Roth	Karlsruhe
Bisindolylmaleimid X Hydrochlorid (BIM)	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Borsäure (kristallin)	Merck	Darmstadt
Bovines Serumalbumin (BSA)	Roth	Karlsruhe
Bromphenolblau (Natriumsalz)	Roth	Karlsruhe
Calciumchlorid-2-hydrat	Merck	Darmstadt
Casyton	innovatis AG	Reutlingen
D(+)-Glucose Monohydrat	Roth	Karlsruhe
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth	Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
dNTP-Set	MBI Fermentas GmbH	St. Leon-Rot
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Ethylenglycoltetraacetat (EGTA)	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom AG	Berlin
G418-BC (Geneticindisulfat)	Biochrom AG	Berlin
Gelatine	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Glycerol	Roth	Karlsruhe
β-Glycerolphosphat	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Glycin	Roth	Karlsruhe
Hefe-Extrakt	GIBCO	Eggenstein

Hydroxyethylpiperazinyethansulfonat (HEPES)	Roth	Karlsruhe
Hexanukleotid Random-Primer-Mix	Roth	Karlsruhe
Hydrocortison 21-Hemisuccinat Natriumsalz	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
25-Hydroxycholesterol	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Isobutylmethylxanthin (IBMX)	Calbiochem - Novabiochem	Bad Soden
Insulin	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Isopropanol (2-Propanol)	Roth	Karlsruhe
Kälberserum	PAA	Cölbe
Ketamin	Albrecht	Aulendorf
LB-Agar (Lennox)	Roth	Karlsruhe
Leptin	Biomol	Hamburg
Leupeptin	Biomol	Hamburg
L-Glutamin	Roth	Karlsruhe
L-Glutamin (L-Acetyl-L-alanyl-L-glutamin)	Biochrom AG	Berlin
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Roth	Karlsruhe
Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix	MBI Fermentas GmbH	St. Leon-Rot
β-Mercaptoethanol	Roth	Karlsruhe
Methanol	Roth	Karlsruhe
Natriumacetat	Roth	Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth	Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth	Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Roth	Karlsruhe
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Natriumpyrophosphat	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Natriumtetraborat-Decahydrat	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
n-Butanol (1-Butanol)	Roth	Karlsruhe
Oligo(dT) ₁₂₋₁₈	MBI Fermentas GmbH	St. Leon-Rot
PBS (Dulbecco's PBS (1x) ohne Calcium und Magnesium)	PAA	Cölbe
Pefablock	Biomol	Hamburg
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG	Berlin
PD98,059 (2'-Amino-3'-Methoxy-Flavon)	Alexis Biochemicals	Lörrach

Poly-L-Lysin-Hydrobromid (PLL)	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Ponceau S	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Prostaglandin E ₂ (PGE ₂)	Axxora	Lörrach
[³ H] Prostaglandin E ₂ (PGE ₂)	GE Healthcare	München
Random Hexamer Primer	MBI Fermentas GmbH	St. Leon-Rot
Retinsäure (all- <i>trans</i> Retinsäure)	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Rotiszint® 22 (Scintillationsflüssigkeit)	Roth	Karlsruhe
Rompun (2% (v/v))	Bayer	Leverkusen
Salzsäure (37 % (v/v))	Roth	Karlsruhe
Serva Blue G (Nr.35050)	Serva Electrophoresis GmbH	Heidelberg
Tetracyclin	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth	Karlsruhe
Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan (Tris)	Roth	Karlsruhe
Triton® X-100	Serva Electrophoresis GmbH	Heidelberg
Trypanblau	Serva Feinbiochemicals	Heidelberg
Trypsininhibitor	Biomol	Hamburg
Trypton aus Casein	Roth	Karlsruhe
Tween® 20	Roth	Karlsruhe
U0126 (1,4-Diamino-2,3-Dicyano-1,4-bis[2-Aminophenylthio]butadien)	Alexis Biochemicals	Lörrach

2.3 Verbrauchsmaterialien

Agarose ‚Molecular Biology Grade‘	Eurogentec	Köln
GF 52 Filter	Schleicher & Schüll	Dassel
Roti®-PVDF(Polyvenylidendifluorid)-Membran	Roth	Karlsruhe
Scintillationsgefäß	Roth	Karlsruhe
Zell- und Gewebekulturschalen 10 mm	Greiner bio-one	Frickenhausen
Zell- und Gewebekulturschalen 35 mm	Greiner bio-one	Frickenhausen
Zellkultur-Mikrotiterplatten (96 well)	Greiner bio-one	Frickenhausen

2.4 Geräte

CEQ™ 2000XL DNA Analysis System	Beckman Counter	München
ChemiDoc™-System	Bio-Rad	München
Elektrophorese-System Mini-Protean II	Bio-Rad	München
Flachbett-Elektrophoresekammer	Biometra	Göttingen
Hettich-Zentrifuge Rotina 35	Hettich	Tuttlingen
Scintillationszähler LS6000LL	Beckmann	München
SIGMA Zentrifuge 3K30	SIGMA	Osterode
SORVALL® RC 5B PLUS-Zentrifuge	Thermo Electron Corporation	Langenselbold
C1000™ Thermal Cycler mit dem CFX96™ Real-Time System	Bio-Rad	München
Thermocycler T300	Biometra	Göttingen
Tischzentrifuge Biofuge Pico	Heraeus	Osterode
Tischzentrifuge Biofuge Primo	Heraeus	Osterode
Transblot SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad	München
Vakuumzentrifuge Speed Vac PD 111V mit Drehschieber-Vakuumpumpe Typ RD4	Thermo Savant	Holbrook, NY, USA
und Kühlfalle Unicryo MC3I	Rudolph Brand	Wertheim
Wasseraufbereitungssystem HP6 UV/UF	Uniequip	Martinsried
	TAK	Niederelbert

2.5 Zellkultur-Medien und Zusätze

MEM Pulvermedium mit Earle's Salzen mit nicht essentiellen Aminosäuren, mit L-Glutamin, ohne NaHCO ₃	Katalog-Nr. # T437-50	Biochrom AG	Berlin
DMEM Pulvermedium (5mM Glucose) mit Na-Pyruvat, mit L-Glutamin, ohne NaHCO ₃	Katalog-Nr. # T041-10	Biochrom AG	Berlin
DMEM Pulvermedium (25mM Glucose) ohne Na-Pyruvat, mit L-Glutamin, ohne NaHCO ₃	Katalog-Nr. # T043-50	Biochrom AG	Berlin
DMEM / Ham's Nutrient Mixture F12	Katalog-Nr. # D8437	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
N-2 Supplement	Katalog-Nr. #17502-048	Invitrogen	Karlsruhe

L-Glutamin-Konzentration in den verschiedenen Medien

	MEM mit Earle's Salzen	DMEM (5 mM Gluc)	DMEM (25 mM Gluc)	DMEM / Ham's F-12
L-Glutamin	2 mM	4 mM	4 mM	2,5 mM

NaHCO₃-Konzentration in den verschiedenen Medien

	MEM mit Earle's Salzen	DMEM (5 mM Gluc)	DMEM (25 mM Gluc)	DMEM / Ham's F-12
NaHCO ₃	-	-	-	1,2 g/l
Zusatz	2,2 g/l	3,7 g/l	3,7 g/l	-
Endkonzentration	2,2 g/l (26 mM)	3,7 g/l (44 mM)	3,7 g/l (44 mM)	1,2 g/l (14 mM)

Zusammensetzung N-2 Supplement (BOTTENSTEIN & SATO 1979)

Putrescin	10 mM	bindet an die regulierende Einheit des NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptors und verstärkt so den Ionenfluss
Humanes Transferrin	1 µg/ml (1 mM)	hat einen stimulatorischen Einfluss auf das Zellwachstum durch seine Eigenschaft, Eisen zu binden
Selen	3 µM	Bestandteil der Glutathionperoxidase, schützt so vor Peroxiden
Insulin	5 µg/ml (86 µM)	stimuliert das Zellwachstum
Progesteron	2 µM	wachstumsstimulierende Effekte

2.6 Käufliche Reinigungs- und Nachweissysteme

ECL Advance™ Western Blotting Detection Kit	GE Healthcare	München
Eurx Gene MATRIX Universal RNA Purification Kit, Version 2.0	Roboklon	Berlin
GFX Micro Plasmid Prep-Kit	GE Healthcare	München
innuPREP RNA Mini Kit	Analytik Jena	Jena
JETSTAR 2.0 Plasmid Maxiprep-Kit	GENOMED GmbH	Löhne
SuperSignal® West Pico Chemilumineszenzsubstrat	Pierce	Rockford, Illinois, USA
SV Total RNA Isolation System	Promega	Madison, USA

2.7 Molekulare Längenstandards

2.7.1 Protein-Längenstandards

Protein Molecular Weight Marker	MBI Fermentas GmbH	St. Leon-Rot
Page Ruler™ Prestained Protein Ladder	MBI Fermentas GmbH	St. Leon-Rot

Die Protein-Längenstandards wurden bei -20 °C gelagert.

2.7.2 DNA-Längenstandards

MassRuler™ DNA Ladder, Mix	MBI Fermentas GmbH	St. Leon-Rot
----------------------------	--------------------	--------------

Die Lösung wurde bei -20 °C gelagert.

2.8 Enzyme

BIOTAQ Red™ DNA-Polymerase	1 U/μl	BIOLINE	Luckenwalde
DNase I		Promega	Madison, USA
RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase	200 U/μl	MBI Fermentas GmbH	St. Leon-Rot
RevertAid™ M-MuLV Reverse Transkriptase	200 U/μl	MBI Fermentas GmbH	St. Leon-Rot

2.9 pcDNA3 Vektor

Der **pcDNA3 Vektor** der Firma Invitrogen (Karlsruhe) wurde für die Klonierung der EP-Rezeptorplasmide verwendet.

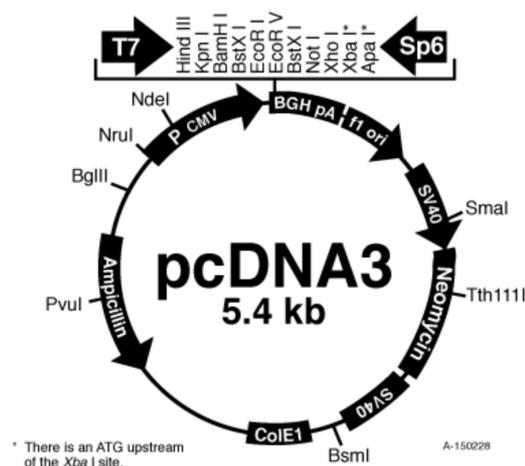


Abbildung 7: Restriktionskarte des pcDNA3 Vektors

2.10 Oligonukleotide

Die „sense“- und „antisense“-Oligonukleotide (Primer) wurden von der Firma MWG-Bio-
tech AG (Ebersberg) bezogen.

Die Oligonukleotid-Sequenzen wurden auf Basis folgender Sequenzen erstellt:

Tabelle 1: Primertabelle

Gene	Spezies	Acc. Nummer	Primersequenz (in 5' → 3' Richtung)	Produktlänge	Annealingtemperatur
AgRP	Ratte	XM_001075738	fwd TCACGTGTGGGCCCTTTATTAGAC rev GTATTGAAGAAGCGGCAGTAGCAC	423 bp	59°C
AgRP	Maus	NM_007427	fwd GCACTGCCTCCCACTG rev AACCGTCCCATCCTTTATTCTC	412 bp	59°C
β-Aktin	Ratte Maus	NM_031144/ NM_007393	fwd CCCTAAGGCCAACCGTAAAAGATG rev AGGTCCCGGCCAGCCAGGTCCAG	222 bp	55°C
CB1-R	Mensch	BC100968	fwd ATACCACCTTCCGCACCATCACCAC rev GCTGGGGTTCCAGGACCATGAAACAC	314 bp	55°C
CB1-R	Ratte Maus	NM_012784/ NM_007726	fwd CTGTTTCTGATCCTGGTGGT rev TTGTGCAGGCAGTCTGAGTC	269 bp	55°C
Insulinrezeptor	Mensch	A18657	fwd CAACGACCCCAATCACAGAACCA rev CGCCGGCCGAATCCTCATACTC	422 bp	60°C
Insulinrezeptor	Ratte	NM_017071	fwd ATCGGGCCCCTCATCTTCGTCTT rev CAGGTCCCAGGTGCACAACTTCTT	606 bp	58°C
Insulinrezeptor	Maus	NM_010568	fwd CCCAGGCCATCCGAAAGCG rev GCCCGCTCCAGGGCAAAAT	468 bp	58°C
EP1-R	Mensch	NM_000955	fwd TCGCTTCGGCTCCACCTTCTTTG rev CGTTGGGCCTCTGGTTGTGCTTAG	424 bp	57°C
EP1-R	Ratte Maus	NM_013100/ NM_013641	fwd CCACCTTCCTGTTGTTCTGTC rev ATCATCGGGACCTGCG	539 bp	55°C
EP2-R	Mensch	NM_000956	fwd CGAGACGCGACAGTGGCTTCC rev CGAGACGCGCGCTGGTAGA	409 bp	57°C
EP2-R	Ratte Maus	NM_031088/ NM_008964	fwd CGCGGTACCTATTTGCTT rev CGTACTCCCGTAGTTGAGC	215 bp	55°C
EP3-R	Mensch	NM_198712	fwd CGGGGCTACGGAGGGGATGC rev ATGGCGCTGGCGATGAACAACGAG	440 bp	57°C
EP3-R	Ratte Maus	NM_012704/ NM_011196	fwd GTCTTTCCTGCTGTGCATTG rev GTCTTCATGTGGCTGGCATA	255 bp	55°C
EP4-R	Mensch	NM_000958	fwd TCGCGCAAGGAGCAGAAGGAGACG rev GGACGGTGGCAGAATGAGGAAGG	469 bp	57°C
EP4-R	Ratte Maus	NM_032076/ NM_008965	fwd CCATCGCCACATACATGAAG rev ATGTAAGAGAAGGCGCGTA	334 bp	55°C
Fettsäure-synthase	Ratte Maus	NM_017332/ NM_007988	fwd GGCCTGGACTCGCTCATGGG rev TGGCCTGCAGCTGGGAGCA	512 bp	60°C
GAPDH	Mensch Ratte Maus	NM_002046/ AB017801/ NM_008084	fwd TGATGACATCAAGAAGGTGG rev TTACTCCTTGGAGGCCATGT	244 bp	55°C
Leptinrezeptor	Mensch	HSU43168	fwd TCGGAGTGAGCAAGATAGAAA rev TGGGCTGAACTGACATTAGAGGT	422 bp	52°C
Leptinrezeptor	Ratte	NM_012596	fwd CCACCAGACCTCGAGGAAGTTTA rev GCAGGCTGGCCGATTTTGATT	603 bp	55°C
POMC	Ratte	NM_139326	fwd TCGGCCCCAGAAACAGC rev GGGGGCCTTGAGTGAGA	481 bp	59°C
POMC	Maus	NM_008895	fwd GGCGCCGGTGAAGGTGTA rev GAGCCGACTGTGAAATCTGAAAG	408 bp	58°C
TrkB	Mensch	AF400441	fwd TCTGCCAGCCACTCCATCACATC rev TCGCCCTCCACGCAGACG	404 bp	58°C
TrkB	Ratte	NM_012731	fwd GACTGGCACTGGCAGCTCGG rev TGCAGGTTCCGAGAGGGGT	590 bp	58°C
RPL19	Mensch	NM_000981	fwd AGGCTTCAGAAGAGGCTCGC rev CCATGAGAATCCGCTTGTTT	406 bp	55°C

3 METHODEN

3.1 Kultivierung permanenter Zelllinien

3.1.1 HepG2-Zellen

HepG2-Zellen sind menschliche Hepatomzellen (KNOWLES et al. 1980). In der Literatur sind HepG2-Zellen beschrieben, die PGE₂-Rezeptoren exprimieren (BREINIG et al. 2008). Der in dieser Arbeit verwendete Zellklon exprimiert aber keinen der bekannten EP-Rezeptoren funktionell. Er konnte daher mit dem humanen EP1-, Ratten-EP3 β - und dem Maus-EP4-Rezeptor stabil transfiziert werden, um Zelllinien zu generieren, die jeweils nur einen der vier Rezeptoren exprimierten.

3.1.1.1 Puffer und Lösungen

Die Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht anders aufgeführt, durch einen 0,2 μ m-Filter sterilfiltriert und in autoklavierten Glasflaschen bei 4 °C aufbewahrt. H₂O bezeichnet immer autoklaviertes Reinstwasser.

MEM-Medium

Pulvermedium MEM (T437)		9,78 g
NaHCO ₃		2,2 g
H ₂ O		ad 1000 ml

Der pH-Wert des Mediums wurde auf pH 7,4 eingestellt.

Penicillin/Streptomycin

Die Lösung lag als fertiges Gemisch von 10000 U Penicillin und 10000 μ g/ml Streptomycin vor und wurde in 10 ml-Aliquots bei -20 °C aufbewahrt. Den Zellkulturmedien wurden immer 1 % dieses Gemisches, also 100 U Penicillin und 100 μ g/ml Streptomycin, zugesetzt.

HepG2-Kulturmedium I

FCS	10 %	10 ml
Penicillin/Streptomycin	1 %	1 ml
MEM-Medium		ad 100 ml

HepG2-Kulturmedium II

FCS	0,5 %	500 μ l
Penicillin/Streptomycin	1 %	1 ml
MEM-Medium		ad 100 ml

10 x PBS-Stammlösung

NaCl	1370 mM	80,06 g
KCl	27 mM	2,015 g
KH ₂ PO ₄	15 mM	2,041 g
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	80 mM	14,239 g
H ₂ O		ad 1000 ml

Der pH-Wert der Lösung wurde auf pH 7,3 eingestellt. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur gelagert.

1 x PBS-Lösung

10 x PBS-Stammlösung	1 x	100 ml
H ₂ O		ad 1000 ml

Die Lösung wurde bei Raumtemperatur gelagert.

10 x Trypsinlösung

Trypsin	0,5 % (w/v)	500 mg
EDTA	5,4 mM	158 mg
NaCl	145 mM	850 mg
1 x PBS		ad 100 ml

EDTA wurde in der Lösung bei pH 8,0 gelöst, anschließend wurde der pH-Wert der Lösung auf pH 7,4 eingestellt. Die Lösung wurde durch einen 0,2 µm-Filter sterilfiltriert und in 50 ml Aliquots bei -20 °C gelagert.

1 x Trypsinlösung

10 x Trypsin	1 x	100 ml
1 x PBS		ad 1000 ml

PLL-Stammlösung (100 x)

PLL	10 mg/ml	100 mg
1 x PBS		ad 10ml

PLL-Lösung in PBS

PLL	0,1 mg/ml	1 ml	100 x-Stammlsg.
1 x PBS		ad 100 ml	

3.1.1.2 Zellkultivierung

Alle Zellen wurden, wenn nicht anders aufgeführt, in 75 cm² Zellkulturflaschen im jeweiligen Kulturmedium I bei 37°C und 5 % CO₂-Begasung im Brutschrank kultiviert. Bevor die Zellen eine vollständige Konfluenz erreicht hatten, wurden sie passagiert. Zum Passagieren und zur Aussaat der Zellen wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellkulturflaschen mit je 10 ml 1 x PBS gewaschen, um trypsinhemmende Serumreste zu entfernen. Um die Zellen vom Flaschenboden zu lösen, wurden je 2 ml 1 x Trypsin zugefügt und die Zellkulturflaschen für 3 min bei 37°C und 5 % CO₂-Begasung im Brutschrank inkubiert. Durch leichtes Klopfen wurden die Zellen anschließend vom Boden abgelöst. Die HepG2-Zellen wurden noch zwei weitere Male für jeweils 3 min mit Trypsin im Brutschrank inkubiert. Hierfür wurde kein frisches Trypsin zugegeben. Anschließend konnten die Zellen durch leichtes Klopfen vollständig vom Boden abgelöst werden. Nach der Trypsinierung wurde die Zellsuspension mit 8 ml Kulturmedium I versetzt und 5 min bei 110 x g zentrifugiert (Hettich-Zentrifuge). Das Pellet wurde in Kulturmedium I resuspendiert. Zum Passagieren der Zellen wurden die Zellen einer Zellkulturflasche auf zwei Flaschen aufgeteilt (d.h. 1:2 verdünnt).

Vor der Aussaat der Zellen wurden 35 mm Zellkulturschalen mit PLL-Lösung in PBS beschichtet und für 30 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Lösung abgesaugt und die Zellkulturschalen einmal mit 1 x PBS gewaschen. Zur Aussaat der Zellen wurde die Zellzahl der Zellsuspension bestimmt. Hierfür wurde nach Trypsinierung und Zentrifugation das Pellet ebenfalls in Kulturmedium I resuspendiert. Anschließend wurden 20 µl der Zellsuspension in ein Röhrchen mit 10 ml Casytonpuffer gegeben und mit Hilfe eines Zählgerätes die Zellzahl der Zellsuspension bestimmt. Die Zellsuspension wurde daraufhin in dem Maße mit Kulturmedium I verdünnt, dass die HepG2-Zellen mit einer Zellzahl von 3×10^5 Zellen in 1,5 ml Kulturmedium I pro 35 mm Zellkulturschale ausplattiert werden konnten. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die HepG2-Zellen mit dem EP1-Rezeptor stabil transfiziert (siehe 3.2).

3.1.2 Fh-hTert-Zellen

Fh-hTert-Zellen sind humane fötale Hepatozyten, die durch Reaktivierung der Telomeraseaktivität der katalytischen Untereinheit TERT (*telomerase reverse transcriptase*) immortalisiert wurden (WEGE et al. 2003). Die Zellen wurden von Dr. med. Henning Wege vom Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf zur Verfügung gestellt.

3.1.2.1 Puffer und Lösungen

DMEM-Medium Niedrig-Glucose (5 mM)

Pulvermedium DMEM (T041)	10,15 g
NaHCO ₃	3,7 g
H ₂ O	ad 1000 ml

Der pH-Wert des Mediums wurde auf pH 7,4 eingestellt.

Insulinstammlösung (100 µM)

Insulin	100 µM	29 mg	
BSA	0,1 % (w/v)	50,0 mg	
0,9 % (w/v) NaCl-Lösung		ad 50 ml	0,5 M-Stammlsg.

Insulin wurde bei pH 3,0 in 20 ml 0,9 % (w/v) NaCl-Lösung gelöst, der pH-Wert auf pH 7,4 eingestellt und anschließend BSA zugegeben. Beim Auffüllen der Lösung auf 50 ml wurde der pH-Wert kontrolliert. Die Lösung wurde in Aliquots bei -20 °C gelagert.

Hydrocortison-Stammlösung (10 mM)

Hydrocortison 21-Hemisuccinat Natriumsalz	96,6 mg	
0,9 % (w/v) NaCl-Lösung	ad 20 ml	0,5 M-Stammlsg.

Fh-hTert-Kulturmedium I

FCS hitzeinaktiviert	10 %	10 ml	
Insulin	870 nM	870 µl	100 µM-Stammlsg.
Hydrocortison	5 µM	50 µl	10 mM-Stammlsg.
Penicillin/Streptomycin	1 %	1 ml	
DMEM-Medium (5 mM Glucose)		ad 100 ml	

Fh-hTert-Kulturmedium II

FCS hitzeinaktiviert	0,5 %	500 µl	
Hydrocortison	5 µM	50 µl	10 mM-Stammlsg.
Penicillin/Streptomycin	1 %	1 ml	
DMEM-Medium (5 mM Glucose)		ad 100 ml	

3.1.2.2 Zellkultivierung

Die Zellkulturschalen wurden unbeschichtet verwendet, da PLL toxisch auf diese Zellen wirkt. Zur Trypsinierung wurden die Zellen für 3 min mit 2 ml Trypsin pro Zellkulturflasche im Brutschrank inkubiert. Zum Passagieren der Zellen wurden die Zellen einer Zellkultur-

flasche auf zwei Flaschen aufgeteilt (d.h. 1:2 verdünnt). Fh-hTert-Zellen wurden mit einer Zellzahl von 2×10^5 Zellen in 1,5 ml Fh-hTert-Kulturmedium I pro 35 mm Zellkulturschale ausplattiert.

3.1.3 SH-SY5Y-Zellen

SH-SY5Y ist eine Subzelllinie der Neuroblastomzelllinie SK-N-SH, die 1970 aus der Knochenmarkbiopsie eines vierjährigen Mädchens mit metastasierendem Neuroblastom isoliert wurde (BIEDLER et al. 1973 und 1978). Die Zellen wurden der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Hans Rommelspacher von der Charité in Berlin zur Verfügung gestellt. Die ursprüngliche Zelllinie SK-N-SH umfasst zwei morphologisch und biochemisch unterschiedliche Phänotypen. Es wird zwischen dem neuronalen (N-Typ) und dem substrat-adhären oder Schwann-Zell-ähnlichem (S-Typ) Typ unterschieden (ROSS et al. 1983). SH-SY5Y als neuroblastischer Subklon, weist nur einen geringen Anteil an S-Typ Zellen auf, die Gliazellen repräsentieren. Durch die Behandlung der Kulturen mit Retinsäure (10 μ M) differenzieren N-Typ Zellen zu einem neuronalen Phänotyp aus – es kommt zur Ausbildung von Neuriten (PAHLMAN et al. 1984). Zellen des S-Typs unterliegen hierbei keinen morphologischen Veränderungen.

3.1.3.1 Puffer und Lösungen

Retinsäure-Stammlösung

Retinsäure wurde in einer Konzentration von 50 mM in 100 % (v/v) DMSO gelöst und in Aliquots lichtgeschützt bei -20 °C gelagert.

SH-SY5Y-Kulturmedium I

FCS	10 %	10 ml
Penicillin/Streptomycin	1 %	1 ml
MEM-Medium		ad 100 ml

SH-SY5Y-Kulturmedium II

FCS	10 %	10 ml	
Penicillin/Streptomycin	1 %	1 ml	
Retinsäure	10 μ M	20 μ l	50 mM-Stammlsg.
MEM-Medium		ad 100 ml	

SH-SY5Y-Kulturmedium III

FCS	0,5 %	500 μ l
Penicillin/Streptomycin	1 %	1 ml
MEM-Medium		ad 100 ml

3.1.3.2 Zellkultivierung

Die Zellkulturschalen wurden wie unter 3.1.1.2 beschrieben mit PLL beschichtet und für die Aussaat vorbereitet. Zur Trypsinierung wurden die Zellen für 3 min mit 2 ml Trypsin pro Zellkulturflasche im Brutschrank inkubiert. Zum Passagieren der Zellen wurden die Zellen einer Zellkulturflasche auf zwei Flaschen aufgeteilt (d.h. 1:2 verdünnt). Die Zellen wurden mit einer Zellzahl von 7×10^5 Zellen in 1,5 ml SH-SY5Y-Kulturmedium I pro 35 mm Zellkulturschale ausplattiert. Die SH-SY5Y-Zellen wurden außerdem mit dem EP3 β -R stabil transfiziert (siehe 3.2).

3.1.3.3 Ausdifferenzierung mit Retinsäure

Zum Ausbilden von neuroneneigenen Eigenschaften (wie z.B. Neuriten) mussten SH-SY5Y-Zellen mit Retinsäure ausdifferenziert werden. Die Retinsäure wurde jedoch erst nach dem Ausplattieren zugegeben. Im Folgenden werden die undifferenzierten, nicht mit Retinsäure behandelten Zellen *SH* genannt und die mit Retinsäure ausdifferenzierten Zellen mit *D2* (2 Tage mit Retinsäure ausdifferenziert), *D5* (5 Tage mit Retinsäure ausdifferenziert) bis *D15* bezeichnet.

3.1.4 N-41-Zellen

N-41-Zellen sind immortalisierte hypothalamische Neuronen der Maus. Die primären Kulturen wurden durch einen retroviralen Transfer mit SV40 T-Ag immortalisiert und käuflich bei CELLutions Biosystems erworben (BELSHAM et al. 2004).

3.1.4.1 Puffer und Lösungen

DMEM-Medium Hoch-Glucose (25 mM)

Pulvermedium DMEM (T043)		13,5 g
NaHCO ₃		3,7 g
H ₂ O		ad 1000 ml

Der pH-Wert des Mediums wurde auf pH 7,4 eingestellt.

N-41-Kulturmedium Hoch-Glucose I

FCS	10 %	10 ml
Penicillin/Streptomycin	1 %	1 ml
DMEM-Medium (25 mM)		ad 100 ml

N-41-Kulturmedium Hoch-Glucose II

FCS	0,5 %	500 μ l
Penicillin/Streptomycin	1 %	1 ml
DMEM-Medium (25 mM)		ad 100 ml

N-41-Kulturmedium Niedrig-Glucose I

FCS	10 %	10 ml
Penicillin/Streptomycin	1 %	1 ml
DMEM-Medium (5 mM)		ad 100 ml

N-41-Kulturmedium Niedrig-Glucose II

FCS	0,5 %	500 µl
Penicillin/Streptomycin	1 %	1 ml
DMEM-Medium (5 mM)		ad 100 ml

3.1.4.2 Zellkultivierung

Für die Zellkulturversuche zur Genexpression (siehe 3.4.2) wurde DMEM-Medium Hoch-Glucose verwendet (BELSHAM et al. 2004). Für die Zellkulturversuche zum immunologischen Nachweis der Phosphorylierungen von Akt und ERK1/2 (siehe 3.4.2) wurde dagegen DMEM-Medium Niedrig-Glucose verwendet, da dieses Medium für den immunologischen Nachweis der Akt- und ERK1/2-Phosphorylierung besser geeignet ist (persönliche Kommunikation BELSHAM). Zur Trypsinierung wurden die Zellen für 3 min mit 2 ml Trypsin pro Zellkulturflasche im Brutschrank inkubiert. Zum Passagieren der Zellen wurden die Zellen einer Zellkulturflasche auf drei Flaschen aufgeteilt (d.h. 1:3 verdünnt). Die Zellkulturschalen wurden wie unter 3.1.1.2 beschrieben mit PLL beschichtet. Sie wurden mit einer Zellzahl von 2×10^5 Zellen in 1,5 ml N-41-Kulturmedium I pro 35 mm Zellkulturschale ausplattiert.

3.2 Stabile Transfektion der Zelllinien mit einer modifizierten Calcium-Phosphat-Methode**3.2.1 Prinzip**

Die verwendete Calcium-Phosphat-Präzipitationsmethode zur stabilen Transfektion stellt eine Modifikation des Protokolls von GRAHAM et al. (1973) dar. Die DNA wurde hierbei in Form von feinkörnigen Calcium-Phosphat-Präzipitaten, die durch Mischen einer DNA/Calciumchlorid-Lösung mit einer phosphathaltigen Lösung entstanden, auf die Zellen aufgebracht und von diesen durch Endocytose aufgenommen. Folgende stabil transfizierte Zellen lagen in der Abteilung bereits vor: HepG2-EP3 β und HepG2-EP4. Die HepG2-Zellen wurden mit dieser Methode mit dem EP1-Rezeptor⁹ und die SH-SY5Y-Zellen mit dem EP3 β -Rezeptor stabil transfiziert.

⁹ Die stabil transfizierte Zelllinie HepG2-EP1, die für die vorliegende Arbeit verwendet wurde, wurde von Dr. Andrea Pathe-Neuschäfer-Rube aus der Arbeitsgruppe etabliert.

3.2.2 Puffer und Lösungen

Die Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht anders aufgeführt, durch einen 0,2 µm-Filter sterilfiltriert und bei 4 °C aufbewahrt.

Calciumchlorid-Stammlösung

CaCl ₂	2 M	29,4 g
H ₂ O		ad 100 ml

Die 10 ml-Aliquots wurden bei -20 °C gelagert.

25-Hydroxycholesterol-Stammlösung (1000 x)

25-Hydroxycholesterol	0,25 % (w/v)	25 mg
Ethanol		ad 10 ml

Die 10 ml-Aliquots wurden bei -20 °C gelagert.

2 x BBS-Puffer

BES	50 mM	1,07 g	
NaCl	280 mM	1,64 g	
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	1,5 mM	1 ml	150 M Stammlsg.
H ₂ O		ad 100 ml	

Der pH-Wert der Lösung wurde auf pH 6,96 eingestellt und die Lösung aliquotiert (10 ml).

MBS-Medium (Medium mit Bovine Serum)

Kälberserum	5 %	5 ml	
25-Hydroxycholesterol	1x	100 µl	1000 x Stammlsg.
entsprechendes Medium		ad 100 ml	

G418 (100 mg/ml)

G418	100 mg / ml	2,5 g
1 x PBS		25 ml

Die Lösung wurde in 15 ml-Aliquots bei -20 °C gelagert.

Selektionsmedium

G418	0,5 mg/ml	500 µl	200 x Stammlsg.
entsprechendes Kulturmedium		ad 100 ml	

3.2.3 Stabile Transfektion der Zelllinien

Die Zellen wurden wie unter 3.1 beschrieben für 24 h kultiviert. Für die Transfektion wurden sie mit einer Zellzahl von 1 - 1,5 x 10⁶ Zellen in 10 ml Kulturmedium I pro 10 cm

Zellkulturschale ausplattiert. Der Transfektionsansatz wurde in Polystyrolröhrchen angesetzt und durch leichtes Schwenken gemischt. Ein Ansatz bestand aus 10-15 µg Plasmid-DNA ad 1 ml H₂O, 50 µl 2 M CaCl₂-Lösung und 500 µl 2 x BBS-Puffer pro 10 cm Zellkulturschale. Nach einer 20-minütigen Inkubation des Gemisches bei Raumtemperatur hatten sich DNA-Calcium-Phosphat-Präzipitate gebildet, was durch eine leichte Trübung der Lösung sichtbar war. Anschließend wurden jeweils 1 ml des Transfektionsansatzes auf 10 ml MBS-Medium getropft und durch leichtes Schwenken gemischt. Das im MBS-Medium enthaltene 25-Hydroxycholesterol diente hierbei zur Verbesserung der Transfektionseffizienz. Die nachfolgende Inkubation erfolgte für 3 h im Brutschrank bei 37°C unter 3 % CO₂. Nach 3 h wurde das MBS-Medium entfernt und die transfizierten Zellen mit 10 ml Selektionsmedium im Brutschrank bei 37°C unter 5 % CO₂ inkubiert.

3.2.4 Selektion mit G418

Die Selektion der positiven Klone beruht auf dem im Selektionsmedium enthaltenen Antibiotikum G418. Bei G418 handelt es sich um ein, dem Gentamycin verwandtem 2'-Desoxystreptamin-Antibiotikum. Es kann durch Aminoglykosid-3'-Phosphotransferase-Aktivitäten, welche von den Kanamycin- und Neomycinresistenzgenen kodiert werden, inaktiviert werden. Das Neomycinresistenzgen war in den verwendeten Plasmiden lokalisiert und sollte bei einer stabilen Expression in den transfizierten Zellen für eine Resistenz gegenüber G418 sorgen. Mikroskopisch sichtbare Zellhaufen (Klone) von mehr als 15 Zellen wurden mit einem Stift auf der Schalenunterseite markiert, die Zellen mit einer Pipette aspiriert und in die Vertiefung einer 24-Well Platte mit 1 ml Selektionsmedium überführt. Der Zelltransfer wurde danach mikroskopisch überprüft. Die Klone wurden weiter kultiviert und mittels qPCR auf die Expression der transfizierten EP-Rezeptoren getestet. Abschließend wurde die Effizienz der stabilen Transfektion mit Hilfe des PGE₂-Bindungsassays geprüft (siehe 3.10). Nach erfolgreicher stabiler Transfektion wurden die Zellen weiter mit ihrem entsprechenden Kulturmedium in Gegenwart von G418 kultiviert. Ab dem Zeitpunkt an dem die Zellen für den Zellversuch ausplattiert wurden, wurden die Zellen ohne G418-Zusatz kultiviert.

3.3 Isolierung und Kultivierung von primären hypothalamischen Neuronen der Ratte

Für die Präparation embryonaler hypothalamischer Kulturen wurden trächtige Ratten am 17. Tag der Gestation (E17; der Tag der Paarung wird als „Tag 0“ gezählt) verwendet.

3.3.1 Puffer und Lösungen

Für die Isolierung und Präparation von hypothalamischen Neuronen wurde ausschließlich steriles, käuflich erworbenes 1 x PBS verwendet.

Gelatine (2,5 %)

Gelatine	2,5 %	2,5 g
H ₂ O		ad 100 ml

Die Gelatine wurde bei 37°C im Wasserbad gelöst, danach autoklaviert und bei 4°C gelagert. Vor Gebrauch wurde die Lösung bei 37°C im Wasserbad verflüssigt.

Boratpuffer

Natriumtetraborat- Decahydrat	0,15 M	57 g
H ₂ O		ad 1000 ml

Der pH-Wert der Lösung wurde auf pH 8,4 eingestellt und der Puffer anschließend autoklaviert.

PLL-Lösung in Boratpuffer

PLL	10 µg/ml	100 µl
Borat-Puffer		ad 100 ml

Die Lösung wurde autoklaviert und bei 4°C gelagert.

Glucose (30 %)

Glucose		30 g	50 x-Stammlsg.
H ₂ O		ad 100 ml	

Neuronenlösung

FCS	10 %	1 ml	
Glucose	0,6 %	2 ml	50 x-Stammlsg.
Penicillin/Streptomycin	1 %	1 ml	
PBS		ad 100 ml	

Die Lösung wurde frisch angesetzt.

Neuronen-Kulturmedium I

N-2 Supplement	1 %	1 ml	100 x-Stammlsg.
Penicillin/Streptomycin	1 %	1 ml	
DMEM/F-12 Medium		ad 100 ml	

Neuronen-Kulturmedium II

Penicillin/Streptomycin	1 %	1 ml
DMEM/F-12 Medium		ad 100 ml

Trypanblaulösung

Trypanblau	0,4 %	1 mg
1 x PBS		ad 250 ml

Der pH-Wert der Lösung wurde auf pH 7,3 eingestellt und die Lösung bei Raumtemperatur gelagert.

3.3.2 Isolierung des embryonalen Hypothalamus der Ratte

Trächtige Ratten wurden mit einer Ketamin-Xylazin-Lösung anästhesiert: 100 mg/kg Körpergewicht Ketamin zur Betäubung und 10 mg/kg Körpergewicht Rompun zur Muskelrelaxation. Embryonen wurden durch eine Schnittentbindung zügig entnommen und sofort in kaltes steriles PBS mit 10 % FCS, 0,6 % Glucose und 1 % Penicillin/Streptomycin (Neuronenlösung) gelegt und dekapitiert (LOUDES et al. 1999).

3.3.3 Präparation der hypothalamischen Kulturen

Die Präparation wurde mit Hilfe eines Mikroskops unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Nach der Dekapitation wurde der weiche Schädel geöffnet und dieser sowie die Meningen von der Gehirnoberfläche entfernt. Das Gehirn wurde umgedreht, so dass Kleinhirn und Medulla abgetrennt werden konnten. Die Hypothalami wurden isoliert und in der Neuronenlösung aufbewahrt. Die Neuronenlösung wurde abgesaugt und die Hypothalami 2 x mit sterilem PBS gewaschen. Anschließend wurden sie mit 1 x Trypsinlösung (0,75 ml/Hypothalamus) bei 37°C für 10 min im Wasserbad inkubiert. Danach wurde zweimal mit Neuronenlösung gewaschen und das Gewebe mechanisch mit einer Pasteurpipette dissoziiert. Die Zellsuspension wurde für 10 min bei 500 x g zentrifugiert und das Pellet in serumfreiem Medium (Neuronen-Kulturmedium I) resuspendiert.

3.3.4 Mikroskopische Zellzählung

Zur Auszählung der primären Neuronen wurden 96 µl Trypanblau (zur Vitalfärbung von Zellen) in eine Vertiefung einer Mikrotiterplatte pipettiert und mit 4 µl der Neuronensuspension gemischt (Verdünnung 1:25). Die Suspension wurde in eine mit einem Deckglas verschlossene NEUBAUER-Kammer (0,0025 mm²/Kästchen bei einer Tiefe von 0,1 mm) gefüllt und unter dem Mikroskop bei einer 10-fachen Vergrößerung ausgezählt.

3.3.5 Beschichtung der Zellkulturschalen

Um das Anheften der Zellen zu erleichtern, wurden die Zellkulturschalen vorbehandelt und zuerst mit 1 ml einer 2,5 %igen Gelatinelösung für 30 min beschichtet. Danach erfolgte eine Behandlung mit 1 ml einer PLL-Boratlösung für 90 min. Abschließend wurden die Zellkulturschalen für 20 min mit sterilem PBS plus 10 % FCS beschichtet.

3.3.6 Kultivierung von primären Neuronen der Ratte

Die Neuronen wurden mit einer Zellzahl von 7×10^5 Zellen in 1,5 ml Neuronen-Medium I pro 35 mm beschichteter Zellkulturschale ausplattiert. Die Neuronen wurden für vier Tage kultiviert.

3.4 Zellkulturversuche

Die Kultivierung und das Ausplattieren der Zellen wurde wie unter 3.1 und 3.3 beschrieben durchgeführt. Nach 24 h wurde das alte Medium abgesaugt und alle Platten einmal mit ihrem entsprechenden auf 37°C temperiertem Medium ohne Zusätze gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1,5 ml ihres spezifischen Kulturmediums II für weitere 16 h kultiviert. Vor den nachfolgenden Behandlungsschritten fand ein Mediumwechsel statt. Es wurde in allen Fällen 10 µl einer entsprechenden Vorverdünnung des Stimulus zu 1 ml Medium gegeben. Zum Abstoppen der Reaktionen aller Zellkulturversuche wurden die Zellkulturschalen zweimal mit 1 ml 1 x PBS gewaschen und in flüssigen Stickstoff überführt. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung bei -70°C.

3.4.1 Puffer und Lösungen

Prostaglandin E₂-Stammlösung

PGE₂ wurde in einer Konzentration von 10 mM in 70 % (v/v) Ethanol gelöst und in Aliquots bei -20°C gelagert. Vor der Verwendung wurde das Ethanol abgedampft und die Substanz mit einer Konzentration von 1 mM in Medium gelöst.

Insulinstammlösung (10 µM)

Insulin	10 µM	2,9 mg	
BSA	0,1 % (w/v)	50,0 mg	
0,9 % (w/v) NaCl-Lösung		ad 50 ml	0,5 M Stammlsg.

Die Insulinstammlösung wurde wie unter 3.1.2.1 beschrieben hergestellt. Für die Zellkulturversuche mit einer Insulinkonzentration von 10 nM wurde die Substanz mit einer Konzentration von 1 µM in Medium gelöst. Für die Zellversuche mit höheren bzw. niedrigeren Insulinkonzentrationen (Dosiswirkungskurve der insulinabhängigen Akt-Phosphorylierung) wurde die Substanz entsprechend anders in Medium vorverdünnt.

ACEA-Stammlösung

ACEA lag gekauft in Methylacetat gelöst vor. Vor der Verwendung wurde das Methylacetat unter einem Stickstoffstrom auf Eis abgedampft. Anschließend wurde ACEA in einer Konzentration von 55 mM in 100 % Ethanol gelöst und in Aliquots bei -20°C

gelagert. Vor der Verwendung wurde die Substanz auf eine Konzentration von 1 mM mit Medium verdünnt. Die Ethanolkonzentration im Stimulationsmedium betrug 0,18 Promille.

PD98059-Stammlösung

PD98059 wurde in einer Konzentration von 100 mM in 100 % DMSO gelöst und in Aliquots bei -20°C gelagert. Vor der Verwendung wurde die Substanz auf eine Konzentration von 5 mM mit Medium verdünnt.

U0126-Stammlösung

U0126 wurde in einer Konzentration von 25 mM in 100 % DMSO gelöst und in Aliquots bei -20°C gelagert. Vor der Verwendung wurde die Substanz auf eine Konzentration von 5 mM mit Medium verdünnt.

BIM-Stammlösung

BIM wurde in einer Konzentration von 15 mM in 100 % DMSO gelöst und in Aliquots bei -20°C gelagert. Vor der Verwendung wurde die Substanz auf eine Konzentration von 15 µM mit Medium verdünnt.

3.4.2 Behandlungsschemata

Dosiswirkungskurve der insulinabhängigen Akt-Phosphorylierung

Die Wechselwirkung zwischen Insulin und PGE₂ bzw. ACEA sollte bei einer Insulinkonzentration untersucht werden, bei der die insulinabhängige Akt-Phosphorylierung gerade maximal war. Für die neuronalen Zellen war diese Konzentration nicht bekannt. Daher wurden die SH-SY5Y-, die N-41-Zellen und die primären Neuronen wie unter 3.4 beschrieben behandelt und mit Insulin für 15 min im jeweiligen Medium mit 0,01 nM bis 100 nM Insulin inkubiert.

Kinetik der insulinabhängigen Akt-Phosphorylierung

Zur Ermittlung einer geeigneten Inkubationszeit wurde bei den SH-SY5Y-, N-41- Zellen und den primären Neuronen die Kinetik der insulinabhängigen Akt-Phosphorylierung untersucht. Die Zellen wurden für 0, 5, 10 und 15 min mit 10 nM Insulin inkubiert. Zur Überprüfung, ob Insulinzielgene in den Zellen reguliert werden, wurden die N-41-Zellen und die primären Neuronen für einen Zeitraum von 1 h bis 8 h mit 10 nM Insulin inkubiert.

Testversuch mit PGE₂ / ACEA

Zur Ermittlung der akuten PGE₂- und ACEA-Wirkung auf die neuronalen Zellen wurde im Vorfeld ein Testversuch mit PGE₂ bzw. ACEA durchgeführt. Die Zellen wurden wie unter 3.4 beschrieben behandelt und für 15 min mit PGE₂ (10 µM) bzw. ACEA (10 µM) und zum

Vergleich mit Insulin (10 nM) inkubiert. In parallelen Ansätzen wurde immer die jeweilige Lösungsmittelkontrolle mitgeführt.

Vorbehandlung mit PGE₂ / ACEA

Die Zellen wurden wie unter 3.4 beschrieben behandelt, mit 10 µM PGE₂ oder 10 µM ACEA für 330 min vorbehandelt und danach ohne vorherigen Mediumwechsel mit einer Insulinkonzentration von 10 nM für 15 min stimuliert (siehe Abb. 8).

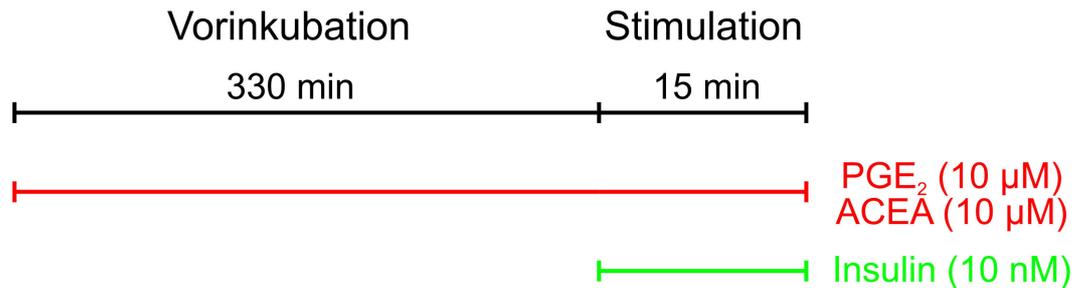


Abbildung 8: Behandlungsschemata für die Vorinkubation mit PGE₂ und ACEA

Vorbehandlung mit Inhibitoren

HepG2-Zellen und Fh-hTert-Zellen wurden wie unter 3.4 beschrieben behandelt, zusätzlich mit verschiedenen Inhibitoren (150 nM BIM, 50 µM PD98059, 50 µM U0126) vorbehandelt und gleichzeitig mit PGE₂ für 330 min vorinkubiert (siehe Abb. 9). Anschließend wurden sie für 15 min mit 10 nM Insulin stimuliert. Parallel wurden auch Zellen zur Kontrolle ohne Inhibitoren mit DMSO-Zusatz (in der Konzentration der geringsten Inhibitorverdünnung) behandelt.

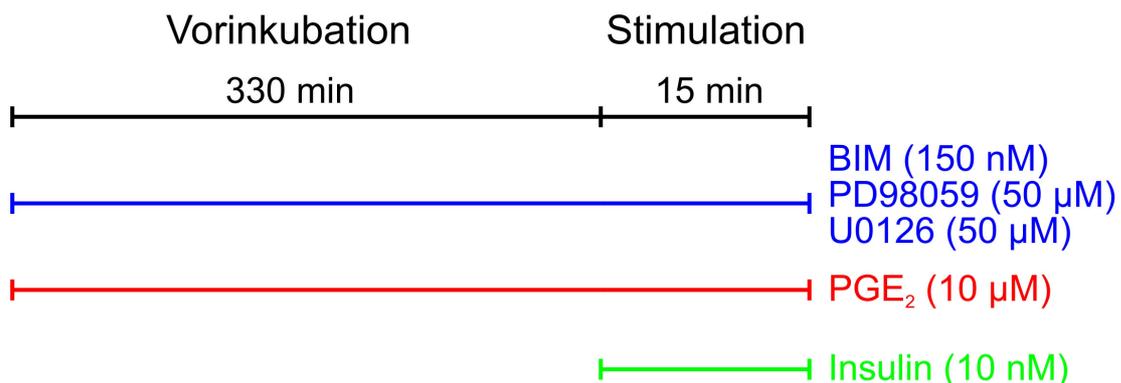


Abbildung 9: Behandlungsschemata für die Behandlung mit Inhibitoren

3.5 Isolierung von Gesamt-RNA

3.5.1 Puffer und Lösungen

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte mit drei verschiedenen käuflich erworbenen Kits (siehe 2.6). Die in den Kits enthaltenen Puffer und Lösungen wurden wie vom Hersteller beschrieben, wenn nötig mit β -Mercaptoethanol oder Ethanol (95 % (v/v)) versetzt und bei der angegebenen Temperatur gelagert.

DEPC-H₂O

DEPC	0,1 % (v/v)	1 ml/l
------	-------------	--------

Reinstwasser wurde mit 0,1 % (v/v) DEPC versetzt und für 12-14 h bei 37°C inkubiert, um RNasen vollständig zu inaktivieren. Das verbliebene DEPC wurde durch Autoklavieren zersetzt. Alle Puffer und Lösungen für die RNA-Isolierung wurden mit DEPC-H₂O angesetzt, um den Abbau von RNA durch exogene RNasen zu verhindern.

3.5.2 Isolierung von Gesamt-RNA mit Hilfe käuflicher Nachweis- und Reinigungssysteme

Die Zellen wurden wie unter 3.4.2 beschrieben behandelt und bei 4°C lysiert. Jeweils drei Zellkulturschalen, die dem gleichen Behandlungsschemata unterlagen, wurden dazu mit dem jeweiligen RNA-Lysepuffer versetzt und die Zellen abgeschabt. Die weitere Vorgehensweise erfolgte anhand des Protokolls des jeweiligen Herstellers. Bei den RNA-Kits von Analytik Jena und Roboklon erfolgte die Trennung der DNA von der RNA durch Bindung der DNA an die erste Säule. Die RNA wurde auf der zweiten Säule festgehalten und konnte von dort eluiert werden. Die Isolierung der RNA mit Hilfe dieser beiden Nachweis- und Reinigungssysteme enthielt keinen DNase-Verdau. Für die Isolierung der RNA mit Hilfe des Isolierungssystems von Promega wurde nur eine Säule verwendet, auf welcher die RNA zurückgehalten wurde. Ein DNase-Inkubationsgemisch verhinderte hierbei die Kontamination mit genomischer DNA.

Nach der Isolierung der Gesamt-RNA wurde diese photometrisch quantifiziert. Ein Aliquot der RNA wurde hierfür 1:100 mit DEPC-H₂O verdünnt. Die RNA-Konzentration und die Reinheit der Präparation wurden durch die Absorption der jeweiligen verdünnten RNA-Lösung bei 260 nm und 280 nm ermittelt. Die Konzentrationsbestimmung beruht auf dem Absorptionsmaximum der aromatischen Purin- und Pyrimidinringe der Nukleinsäurebasen bei 260 nm. Proteine zeigen aufgrund ihrer aromatischen Aminosäurereste ein Absorptionsmaximum bei 280 nm. Der Wert des Quotienten aus der Absorption bei 260 nm und 280 nm sollte bei einer kontaminationsfreien RNA-Lösung zwischen 1,7 und 2,0 liegen. Es

wurde nur RNA verwendet, deren Quotient 260 nm/280 nm > 1,7 und < 2,0 war. Die RNA-Konzentration wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{RNA-Konzentration [ng/}\mu\text{l]} = \Delta E \text{ 260 nm} \times \text{Verdünnung} \times 40 \text{ ng/}\mu\text{l}.$$

Die RNA wurde bei -70 °C gelagert.

3.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

3.6.1 Puffer und Lösungen

Oligo (dT)₁₈ von Fermentas

500 ng/μl

Random Hexamer Primer von Fermentas oder Hexanukleotid Random-Primer-Mix v. Roth

200 ng/μl

5 x Reaktionspuffer für M-MUL V RT und (H Minus) M-MUL V RT

Tris/HCl 250 mM

KCl 250 mM

MgCl₂ 20 mM

DTT 50 mM

Die Lösung hatte einen pH-Wert von pH 8,3 und war den beiden RevertAid™ M-MuLV Reversen Transkriptasen beigefügt.

Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs) (10 mM; 2 mM)

dATP, dCTP, dGTP und dTTP standen in einer Konzentration von 100 mM zur Verfügung.

RevertAid™ M-MUL V Reverse Transkriptase

200 U/μl

Die Lösung war im ‚RevertAid™ First Strand cDNA Synthese Kit‘ enthalten.

RevertAid™ (H Minus) M-MUL V Reverse Transkriptase

200 U/μl

Die Lösung war im ‚RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthese Kit‘ enthalten.

Diese Transkriptase ist eine gentechnisch modifizierte M-MUL V Reverse Transkriptase, der die RNase H-Aktivität fehlt. Das Entfernen der RNase H-Aktivität erhöht die Effizienz der reversen Transkription.

10 x Puffer Polymerase

(NH₄)₂SO₄ 160 mM

Tris/HCl 670 mM

Tween-20 0,1 %

Der Puffer hatte einen pH-Wert von pH 8,3 und war der BIOTAQ Red™ DNA Polymerase beigelegt.

Magnesiumchlorid-Lösung (50 mM)

Die Lösung war in einer Konzentration von 50 mM der BIOTAQ Red™ DNA Polymerase beigelegt.

Maxima™ SYBR®Green qPCR Master Mix (2 x)

enthält: Maxima™ Hot Start *Taq* DNA Polymerase, Maxima™ SYBR Green qPCR Buffer, SYBR®Green I, dUTP, dNTPs von Fermentas.

100 x Fluorescein

Fluorescein wurde in einer Konzentration von 1 µM in H₂O gelöst.

3.6.2 Reverse Transkription

Für die reverse Transkription wurde die RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase (bei sehr wenig RNA) und die RevertAid™ M-MuLV Reverse Transkriptase verwendet. In beiden Fällen handelt es sich um eine retrovirale Polymerase aus *E. coli*, die in Gegenwart eines DNA-Oligonucleotids (Oligo(dT)₁₂₋₁₈) als Startermolekül (Primer) und einzelsträngiger RNA als Matrize, DNA synthetisiert. Für die cDNA-Synthese wurden zwischen 1 µg und 3 µg RNA eingesetzt, die mit DEPC-H₂O auf ein Gesamtvolumen von 11 µl aufgefüllt wurden. Zu dieser RNA-Lösung wurden 2 µl eines Gemisches, das aus je 1 µl Oligo(dT) und 1 µl Random Hexamer Primern bestand, gegeben. Das Gemisch wurde für 5 min bei 70 °C zur Denaturierung von Sekundärstrukturen innerhalb der RNA inkubiert und danach in Eiswasser für 5 min schockgekühlt, um die Wiederausbildung von Sekundärstrukturen zu verhindern. In der Zwischenzeit wurde eine Lösung aus 5 x RT-Puffer, dNTPs und reverser Transkriptase hergestellt:

5 x RT-Puffer	4 µl
dNTPs (10 mM)	2 µl
Reverse Transkriptase	1 µl (200 U)

Je 7 µl dieses Gemisches wurden den Ansätzen zugesetzt. Die weiteren Schritte erfolgten nun im Thermocycler: 10 min bei 25 °C, 90 min bei 42 °C und 10 min bei 70 °C. Während dieser Inkubation erfolgte die reverse Transkription, wobei Oligo (dT) oder Random Hexamer Primer als Startermolekül fungierten. Das Erhitzen der Ansätze auf 70 °C als letzten Schritt des Programms diente der Beendigung der Reaktion durch Denaturierung des Enzyms. Die erhaltene cDNA wurde bei -20 °C aufbewahrt.

3.6.3 Allgemeines Protokoll für die PCR

Die PCR bezeichnet eine Technik, bei der von bestimmten DNA-Abschnitten mit Hilfe der DNA-Polymerase eine Vielzahl von Kopien angefertigt wird. Pro Zyklus wird die Kopienzahl des DNA-Abschnitts verdoppelt (ERLICH et al. 1991). Die Schritte 2-4 (Tabelle 2) wurden für 33-50 Zyklen wiederholt.

Tabelle 2: Allgemeines Protokoll für die PCR

1. Initiale Denaturierung	3 min	95 °C
2. Denaturierung	1 min	95 °C
3. Anlagerung / <i>Annealing</i>	1 min	primerspezifisch
4. Verlängerung / <i>Extension</i>	produktspezifisch 1 min / kb	72 °C
5. Finale Verlängerung	10 min	72 °C

3.6.4 Semiquantitative RT-PCR

Die semiquantitative RT-PCR wurde für die vorliegende Arbeit für die Charakterisierung der neuronalen Zellen bezüglich des CB1-R, des Insulinrezeptors, des Leptinrezeptors und der Tyrosinkinase B (TrkB) verwendet. Hierfür wurde die BIOTAQ Red™ DNA-Polymerase verwendet. Es handelt sich um ein thermostabiles Enzym, das aus *Thermus aquaticus* aufgereinigt wurde. In der PCR für den Insulinrezeptor in SH-SY5Y-Zellen wurde cDNA aus U-937-Zellen eingesetzt, um zu prüfen, ob die PCR für den Insulinrezeptor erfolgreich war. Die ribosomale RNA (RPL19) und die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH, Enzym der Glykolyse) wurden in den PCR's für den Leptinrezeptor, den CB1-R sowie die TrkB eingesetzt, um zu prüfen, ob die cDNA-Synthese erfolgreich war. Bei RPL19 und GAPDH handelt es sich um unregulierte Gene, die in den unterschiedlich behandelten Zellen in etwa in gleicher Menge vorkommen. Sie dienen daher als Bezugspunkt, um die unterschiedliche Effizienz der RNA-Reinigung und cDNA-Synthese korrigieren zu können. Die Primer und die Annealingtemperaturen sind in Tabelle 1 aufgeführt. Ein PCR-Ansatz wurde wie folgt angesetzt (Tabelle 3):

Tabelle 3: PCR-Mix für eine Probe (semiquantitative RT-PCR)

	Konzentration	Menge	Stammlösung
10 x PCR-Reaktionspuffer	1 x	2,5 µl	10 x
dNTPs	0,2 mM	2,5 µl	2 mM
MgCl ₂	1,5 mM	0,75 µl	50 mM
cDNA		2 µl	
sense-Oligonukleotid	0,3 µM	0,75 µl	10 µM
antisense-Oligonukleotid	0,3 µM	0,75 µl	10 µM
BIOTAQ Red™ DNA-Polymerase	0,4 U	0,4 µl	1 U/µl
H ₂ O		ad 25 µl	

Die PCR erfolgte im Thermocycler für 35 Zyklen unter den in Tabelle 7 aufgeführten Bedingungen. Der DNA-Syntheseschritt des letzten Zyklus wurde wie in der Tabelle aufgeführt, auf 10 min verlängert, um die Synthese unvollständig replizierter DNA-Stränge abzuschließen. Für die PCR wurden 2 µl der unverdünnten cDNA-Stammlösungen als Matrize eingesetzt. Die PCR-Proben wurden im Thermocycler T300 (Biometra) amplifiziert, anschließend in einem Agarosegel aufgetrennt und die Ergebnisse analysiert (siehe 3.7.2).

3.6.5 Quantitative *Real-Time*-PCR (qPCR)

Die quantitative *Real-Time*-PCR (qPCR) erlaubt die Quantifizierung der amplifizierten DNA. Hierbei stehen zwei generelle Quantifizierungsstrategien zur Verfügung: die absolute und die relative Quantifizierung (PFAFFL 2004). Bei der relativen Quantifizierung wird die Genexpression eines Zielgens auf ein weiteres nicht reguliertes Referenzgen bezogen. Die qPCR ermöglicht eine genaue Eingrenzung der exponentiellen Phase. In dieser Phase besteht ein direkter proportionaler Zusammenhang zwischen der Ausgangsmenge der Zielsequenz und der amplifizierten Produktmenge. Die cDNA wurde mit H₂O 1:5 verdünnt und der PCR-Mix wie folgt angesetzt (Tabelle 4):

Tabelle 4: PCR-Mix für eine Probe (qPCR) im C1000™ Thermal Cycler

	Konzentration	Menge	Stammlösung
Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix	1 x	5 µl	2 x
Fluoreszein	1 x	0,1 µl	100 x
cDNA-Verdünnung		4,4 µl	
sense-Oligonukleotid	0,25 µM	0,25 µl	10 µM
antisense-Oligonukleotid	0,25 µM	0,25 µl	10 µM
H ₂ O		ad 10 µl	

Der Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (2 x) enthielt die Maxima™ Hot Start Taq DNA Polymerase, die bei Raumtemperatur inaktiv ist. Darüber hinaus waren dNTPs und SYBR Green I im Mix enthalten. Bei SYBR Green handelt es sich um einen interkalierenden Farbstoff, der nach Einlagerung zwischen die Basen der doppelsträngigen DNA fluoresziert. Die neu synthetisierte, doppelsträngige DNA wurde somit selektiv anhand der Stärke des Fluoreszenzsignals erfasst und konnte als Maß für die RNA-Menge quantifiziert werden. Das Fluoreszein diente der Normalisierung der Werte, da die Fluoreszenz des Fluoreszeins unabhängig vom DNA-Gehalt und in allen Proben identisch ist. Die Ergebnisse wurden in Ct-Werten (Schwellenwertzyklus) angegeben. Dieser Ct-Wert beschreibt den Zyklus, bei dem die Fluoreszenz erstmalig ein festgelegtes Fluoreszenzniveau übersteigt, dort beginnt die exponentielle Phase. Anhand der Ct-Werte kann eine quantitative Aussage über die Ausgangsmenge der Zielsequenz bezüglich des zu untersuchenden Gens getroffen werden. Im Falle einer 100 %-igen Effizienz der PCR verdoppelt sich mit jedem Zyklus die DNA-Produktmenge und analog dazu das Fluoreszenzsignal. Zur Normalisierung der Werte wurden die Referenzgene GAPDH und Aktin (als Strukturprotein Bestandteil der Zytoskeletts) verwendet. Bei beiden handelt es sich um unregulierte Gene (siehe 3.6.4).

In den N-41-Zellen und den primären Neuronen sollte mit Hilfe der qPCR überprüft werden, ob in diesen Zellen folgende Insulinzielgene positiv oder negativ reguliert sind: Fettsäuresynthase, Proopiomelanocortin (POMC), *Agouti-related* Protein (AgRP). Als Referenzgene dienten Aktin und GAPDH. Die cDNA-Stammlösungen wurden 1:5 oder 1:10 mit H₂O verdünnt eingesetzt. Die Primer und Annealingtemperaturen sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Die Berechnung der n-fachen Induktion des untersuchten Gens X in der Probe bezogen auf die Kontrollprobe K erfolgte mit der $\Delta\Delta$ Ct-Methode:

$$\frac{2^{(\text{Ct X (K)} - \text{Ct X (Probe)})}}{2^{(\text{Ct Referenzgen (K)} - \text{Ct Referenzgen (Probe)})}}$$

Die absolute Quantifizierung wird anhand einer gegebenen Kalibrierungsgeraden durchgeführt, die auf einer Verdünnungsreihe von Plasmiden basiert. In allen verwendeten Zelllinien sowie den primären Neuronen wurden auf diese Weise die EP-Rezeptoren quantifiziert. Als Standards für die Kalibrierungsgerade dienten in der Arbeitsgruppe vorliegende EP-R-Plasmide. Anhand der DNA-Konzentration der Plasmide sowie ihrer Größe konnte die Kopienzahl/ μ l berechnet werden. Als Standards für die EP-R wurden jeweils 10^1 - 10^6 Kopien eingesetzt. Für das Referenzgen GAPDH wurden 10^4 - 10^8

Kopien eingesetzt. Die cDNA-Stammlösungen wurden mit H₂O 1:5 verdünnt. Die Primer und die Annealingtemperaturen sind in Tabelle 1 aufgeführt. Mit Hilfe der aus den Standards erstellten Kalibrierungsgerade konnte die Kopienzahl der EP-Rezeptoren sowie des Referenzgens ermittelt werden. Zur Normalisierung der Werte wurde der Quotient aus dem jeweiligen EP-Rezeptor und dem Referenzgen gebildet: Kopienzahl EP-Rezeptor / Kopienzahl Referenzgen.

3.7 Agarosegelelektrophorese

3.7.1 Puffer und Lösungen

10 x TAE-Puffer

Tris	0,5 M	16,56 g
Natriumacetat	0,2 M	16,4 g
EDTA	0,02 M	7,44 g
H ₂ O		ad 1000 ml

Der pH-Wert der Lösung wurde mit Essigsäure auf pH 8,0 eingestellt. Die Lösung wurde autoklaviert und bei 4°C gelagert.

1x TAE-Puffer

TAE-Puffer (10 x)	1 x	100 ml
H ₂ O		ad 1000 ml

Ethidiumbromidlösung

Ethidiumbromid	10 mg/ml	100 mg
TAE-Puffer (1 x)		10 ml

Die Lösung wurde bei 4°C gelagert. Für das Ethidiumbromidfärbebad wurden 300 ml 1 x TAE-Puffer mit 75 µl dieser Lösung versetzt.

3.7.2 Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Das Agarosegel stellt ein komplexes Netzwerk an polymeren Molekülen dar, das die Diffusion der DNA-Moleküle herabsetzt. DNA-Moleküle sind negativ geladen und wandern in einem elektrischen Feld durch das Gel. Dabei bestimmt die Größe der DNA-Moleküle ihre Wanderungsgeschwindigkeit; sie ist umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer relativen Molekülmasse. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurde die Gelelektrophorese mit Standard-DNA-Fragmenten bekannter Größe durchgeführt. Die Agarosekonzentration des Gels richtete sich nach der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente und betrug 1 % oder 2 % (w/v) Agarose. Die eingewogene Agarose (1,6 g bzw. 3,2 g) wurde in 160 ml 1 x TAE-Puffer in einem Mikrowellengerät aufgekocht und

entgast. Die Lösung wurde auf ca. 60 °C abgekühlt und in eine Flachbettkammer mit zwei senkrecht eingesteckten Kämmen gegossen. Nach Erstarren des Gels wurden die Kämmen entfernt. Das Gel wurde in eine Laufkammer gelegt und diese so weit mit Laufpuffer (1 x TAE-Puffer) gefüllt, dass das Gel mit einer Pufferschicht bedeckt war. Die Geltaschen wurden nun mit 10-20 µl PCR-Ansatz beladen; zur Bestimmung der Fragmentlänge wurde eine Geltasche mit dem Längenstandard ‚Massruler™ DNA-Ladder‘ beladen. Die Auftrennung der DNA erfolgt bei 80 V für 1,5-2 h, bis der Farbstoff des Standards die anodische Gelkante erreicht hatte. Anschließend wurde das Gel aus der Kammer genommen und für 20-30 min in ein Ethidiumbromidbad gelegt. Ethidiumbromid ist eine aromatische Verbindung, die mit den Basen der DNA interkaliert und durch UV-Licht zu orangener Fluoreszenz angeregt wird. So konnten die DNA-Fragmente mit Hilfe des ‚GelDoc™‘-Systems der Firma BioRad sichtbar gemacht und dokumentiert werden. Neben der Abschätzung der Fragmentgröße konnte der DNA-Längenstandard ‚MassRuler™‘ auch zur semiquantitativen Bestimmung der DNA-Menge in den Proben genutzt werden. Bei einer Auftragsmenge von 10 µl DNA-Längenstandard entsprachen die einzelnen Banden des MassRuler™ einer Konzentration von 8 bis 100 ng DNA.

3.8 Herstellung der EP-Rezeptorplasmide

Für die absolute Quantifizierung der PGE₂-Rezeptoren (siehe 3.6.5) wurden EP-Rezeptorplasmide verwendet, die von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe hergestellt wurden und für die vorliegende Arbeit zur Verfügung standen. Für die stabile Transfektion der SY-SY5Y-Zellen mit dem EP3β-Rezeptor und der HepG2-Zellen mit dem EP1-Rezeptor (siehe 3.2) wurden ebenfalls diese Plasmide verwendet.

3.8.1 Die Transformation kompetenter *E.coli* XL-1 (blue)-Zellen durch Elektroporation

3.8.1.1 Puffer und Lösungen

SOB-Medium

Trypton	20 % (w/v)	20 g
Hefe-Extrakt	0,5 % (w/v)	5 g
NaCl	10 mM	600 mg
KCl	2,7 mM	200 mg
H ₂ O		ad 1000 ml

Die Lösung wurde auf pH 7,0 eingestellt, autoklaviert und bei 4 °C gelagert.

Mg²⁺-Stammlösung (2 M)

MgCl ₂	1 M	20,33 g	
MgSO ₄	1 M	12,4 g	
H ₂ O			ad 100 ml

SOC-Medium (1 ml)

SOB-Medium		980 µl	
Glucose	20 mM	10 µl	2 M Stlsg.
Mg ²⁺	20 mM	10 µl	2 M Stlsg.

Die Lösung wurde unmittelbar vor Gebrauch angesetzt und auf 37 °C erwärmt.

Elektroporationslösung

Glycerol	10 % (v/v)	100 ml
H ₂ O		ad 1000 ml

LB-(Tetra)-Agarplatten

LB-Agar	3,2 % (w/v)	32 g
Tetracyclin	0,5 % (w/v)	5 g
H ₂ O		ad 1000 ml

Die Lösung wurde autoklaviert, auf 46 °C abgekühlt, mit Tetracyclin versetzt und 20 mL pro Petrischale ausplattiert. Die Platten wurden bei 4 °C gelagert.

LB-(Tetra)-Medium

Hefe-Extrakt	0,5 % (w/v)	5 g
Tetracyclin	0,5 % (w/v)	5 g
Trypton	1 % (w/v)	10 g
NaCl	1 % (w/v)	10 g
H ₂ O		ad 1000 ml

Das Medium wurde autoklaviert und bei 4 °C gelagert.

LB-Medium

Hefe-Extrakt	0,5 % (w/v)	5 g
Trypton	1 % (w/v)	10 g
NaCl	1 % (w/v)	10 g
H ₂ O		ad 1000 ml

Der pH-Wert der Lösung wurde auf pH 7,3 eingestellt und die Lösung unmittelbar nach dem Ansetzen autoklaviert.

Ampicillin-Stammlösung

Ampicillin	5 mg/ ml	250 mg
H ₂ O		ad 50 ml

Die Lösung wurde durch einen 0,4 µm-Filter sterilfiltriert und in Aliquots bei -20°C gelagert.

LB-(Amp)-Medium

LB-Medium		5 ml	
Ampicillin	50 µg/ ml	50 µl	5 mg/ ml Stlsg.

LB-(Amp)-Platten

LB-Agar	3,2 % (w/v)	32 g	
Ampicillin	50 µg/ ml	10 ml	5 mg/ ml Stlsg.
H ₂ O		ad 1000 ml	

Die Lösung wurde autoklaviert, auf 46°C abgekühlt, mit Ampicillin versetzt und 20 ml pro Petrischale ausplattiert. Die Platten wurden bei 4°C gelagert.

3.8.1.2 Die Herstellung kompetenter *E.coli* XL-1 (blue)-Zellen für die Elektroporation

Die Herstellung kompetenter *E. coli* XL-1 (blue) Zellen und die Elektroporation erfolgte nach DOWER *et al.* (1988). 5 µl einer Glycerinkultur von *E. coli* XL-1 Zellen wurden auf LB-(Tetra)-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde eine Kolonie in 5 ml LB-(Tetra)-Medium überführt und wiederum über Nacht im Thermoschüttler bei 37°C inkubiert. Diese 5 ml Bakteriensuspension wurde dann in 250 ml LB-(Tetra)-Medium überführt und bei 37°C inkubiert, bis die Bakteriensuspension eine optische Dichte von 0,5-1,0 (mittlere logarithmische Wachstumsphase) erreicht hatte. Die Bakterien wurden im Eisbad abgekühlt und 15 min bei 4000 rpm (Hettich Universal 16-Zentrifuge mit Rotor 1617; 25 x g, 4 °C) sedimentiert. Danach wurden die Bakterien mit vorgekühlter Elektroporationslösung einmal mit dem Ausgangsvolumen der ursprünglichen Bakteriensuspension, einmal mit 1/2 Volumen und einmal mit 1/20 Volumen Elektroporationslösung gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurden die Bakterien bei 4 °C 15 min bei 4000 rpm (25 x g, 4 °C) zentrifugiert. Am Ende der Waschschrift wurde das Sediment in 1/500 Volumen der ursprünglichen Zellsuspension mit Elektroporationslösung resuspendiert (Zellzahl ca. 10¹⁰/ mL). Es wurden je 50 µL der Zellsuspensionen in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

3.8.1.3 Die Transformation kompetenter *E.coli* XL-1 (blue)-Zellen durch Elektroporation

Zur Transformation von Plasmiden in *E. coli* XL-1 (blue) Zellen wurden 50 µl elektrokompetenter Zellen während des Auftauens mit 1 µl Ligationsansatz gemischt. Die Zellen wurden in die zuvor gekühlten Transformationsküvetten mit einem Elektrodenabstand von 2 mm pipettiert und mit einem Puls von 2500 V, einem Widerstand von 200 Ohm und einer Kapazität von 25 µF elektroporiert. Um das Absterben der Zellen zu minimieren, wurde sofort nach dem Puls 950 µl auf 37°C erwärmtes SOC-Medium zu den Zellen gegeben und die Suspension 60 min bei 37°C im Thermoschüttler inkubiert. Anschließend wurden 100 µl der Bakteriensuspension auf eine LB-(Amp)-Platte ausgestrichen und 24 h bei 37°C inkubiert. Da der pGL3basic Vektor ein Resistenzgen für Ampicillin enthielt, konnten nur transformierte Bakterienklone auf der LB-(Amp)-Platte wachsen. Einige dieser Kolonien wurden mit Hilfe einer Pipette ‚gepickt‘, in 5 ml LB-(Amp)-Medium überführt und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde dann isoliert, gereinigt und sequenziert.

3.8.2 Analyse rekombinanter Bakterienkolonien durch Plasmidpräparation im Mini-Maßstab

Die Plasmidpräparation wurde mit dem GFX *Micro* Plasmid Prep-Kit der Firma GE Healthcare nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde dabei durch Affinitätschromatografie über eine Glasfaser-Matrix isoliert und gereinigt.

3.8.2.1 Puffer und Lösungen

Die Puffer waren im verwendeten Kit enthalten. Sie wurden bei Raumtemperatur gelagert.

Resuspendierungspuffer (Lösung 1)

Tris-HCl (pH 7,5)	100 mM
EDTA	10 mM
RNase I	400 µg/ ml

Lysispuffer (Lösung 2)

NaOH	1 M
SDS	5,3 % (w/v)

Der Puffer wurde als 5,3-fach konzentrierte Lösung geliefert und wurde mit destilliertem H₂O verdünnt.

Neutralisationspuffer (Lösung 3)

Der Puffer enthielt Acetat und Guanidinhydrochlorid ohne nähere Konzentrationsangaben des Herstellers.

Waschpuffer (Lösung 4)

Der Puffer enthielt Ethanol, NaCl, EDTA und Tris-HCl ohne nähere Konzentrationsangaben des Herstellers.

3.8.2.2 Die Reinigung von Plasmid-DNA durch Affinitätschromatografie im Mini-Maßstab

Es wurden 2 x 1,5 ml der Übernachtskultur in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß bei 13.000 rpm (Biofuge pico, 16.060 x g) sedimentiert, der Überstand verworfen und das Sediment in 300 µl Lösung 1 resuspendiert. Zum Lysieren der Zellen wurden 300 µl Lösung 2 dazugegeben und die Lösung durch Invertieren gemischt, dann zur Neutralisation 600 µl Lösung 2 addiert und das 1,5 ml-Reaktionsgefäß weiter invertiert, bis sich eine homogene Phase gebildet hatte. Die Suspension wurde 5 min zentrifugiert und der Überstand auf eine Mini-Säule mit Glasfaser-Matrix, die im Kit enthalten war, gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 1 min wurde 30 s zentrifugiert, die Säule mit 400 µl Lösung 4 gewaschen und erneut 1 min zentrifugiert. Die Mini-Säule wurde dann in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, mit 100 µl Reinst-H₂O für 1 min inkubiert und 1 min zentrifugiert. Die DNA befand sich somit im Überstand.

Die Plasmid-DNA wurde zum Nachweis der erfolgreichen Klonierung mit entsprechenden Restriktionsenzymen gespalten und durch Auftragen auf ein Agarosegel analysiert. Plasmide, die nach der Spaltung auf dem Agarosegel DNA-Fragmente der richtigen Größe lieferten, wurden anschließend für die Subklonierung in den pcDNA3-Vektor verwendet (siehe Tabelle 5). Diese Plasmid-DNA's wurden letztendlich im Maxi-Maßstab isoliert.

3.8.3 Isolierung der Plasmid-DNA im Maxi-Maßstab

Die Präparation wurde mit dem ‚JETSTAR 2.0 Plasmid Maxiprep‘-Kit der Firma GENOMED GmbH nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Es handelte sich dabei ebenfalls um eine Affinitätschromatografie.

3.8.3.1 Puffer und Lösungen

Alle verwendeten Lösungen waren im Kit enthalten und wurden, wenn nicht anders erwähnt, bei Raumtemperatur gelagert.

Resuspendierungspuffer (Lösung 1)

Tris	50 mM
EDTA	10 mM
RNase	100 µg/ml

Der Puffer hatte einen pH-Wert von pH 8,0 und wurde bei 4 °C gelagert.

Lysispuffer (Lösung 2)

NaOH	200 mM
SDS	1 % (w/v)

Neutralisationspuffer (Lösung 3)

Kaliumacetat	3,1 M
--------------	-------

Der Puffer hatte einen pH-Wert von pH 5,5.

Waschpuffer (Lösung 4)

NaCl	800 mM
Natriumacetat	100 mM

Der Puffer hatte einen pH-Wert von pH 5,0.

Elutionspuffer (Lösung 5)

NaCl	1250 mM
Tris	100 mM

Der Puffer hatte einen pH-Wert von pH 8,5.

Äquilibrierungsspuffer (Lösung 6)

NaCl	600 mM
Natriumacetat	100 mM
TritonX-100	0,15 %

Der Puffer hatte einen pH-Wert von pH 5,0.

3.8.3.2 Isolierung der Plasmid-DNA durch Ionenaustauschchromatografie im Maxi-Maßstab

Es wurden 150 ml LB-(Amp)-Medium mit 2 ml der entsprechenden transformierten *E. coli* XL-1-Bakterienkultur angeimpft und bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde 15 min bei 6000 rpm (SORVALL-Zentrifuge, Rotor SORVALL SLA-1500; 3685 x g, 4°C) sedimentiert. Das Pellet wurde in 10 ml Lösung 1, die 0,1 mg/ml RNase enthielt, resuspendiert und nach Zugabe von 10 ml Lösung 2 für 5 min bei Raumtemperatur lysiert. Zur Neutralisierung des Lysats wurden 10 ml Lösung 3 zugegeben, die Suspension durch Invertieren des Reaktionsgefäßes gemischt und bei 15.000 rpm (SORVALL-Zentrifuge, Rotor SORVALL SS-34; 20.584 x g) für 10 min bei 20°C zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine Ionenaustauschchromatographie-Säule gegeben, die zuvor mit 30 ml Lösung 6 äquilibriert worden war. Nachdem der Überstand die Säule passiert hatte, wurde diese mit 60 ml Lösung 4 gewaschen und anschließend die Plasmid-DNA mit 15 ml Lösung 5 aus der Säule eluiert. Die Plasmid-DNA-haltige Lösung wurde mit 10,5 ml

Isopropanol versetzt und die so präzipitierte Plasmid-DNA 60 min bei 15.000 rpm (SORVALL-Zentrifuge, Rotor SORVALL SS-34; 20.584 x g, 4 °C) sedimentiert. Das Pellet wurde dann zweimal mit 750 µl 70% (v/v) Ethanol (-20 °C) resuspendiert und in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach dem Zentrifugieren für 15 min bei 15.000 rpm (SIGMA 3K30 Zentrifuge, Rotor SIGMA 1215/4-H; 20.627 x g, 4 °C) wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und die Plasmid-DNA etwa 15 min bei Raumtemperatur getrocknet. Sie wurde anschließend in 400 µl Reinst-H₂O resuspendiert und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur photometrischen Bestimmung der Plasmid-DNA-Konzentration wurden 10 µl der DNA-Lösung in 500 µl H₂O verdünnt und die optische Dichte (OD) bei 260 nm und 280 nm gemessen. Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{DNA-Konzentration} = \Delta E_{260 \text{ nm}} \times \text{Verdünnung} \times 50 \mu\text{g/ml.}$$

Die Reinheit wurde durch Quotientenbildung der OD 260 nm zur OD 280 nm errechnet. Eine ausreichende Reinheit wurde durch einen Quotienten OD 260 nm / OD 280 nm > 1,8 definiert.

3.8.3.3 Die EP-Rezeptorplasmide

Mit dieser Methode wurden folgende EP-Rezeptorplasmide hergestellt und aufgereinigt (Tabelle 5).

Tabelle 5: EP-Rezeptorplasmide (pcDNA3)

	<i>Multiple Cloning site des Vektors</i>	Acc. Nummer	Position
EP1-R (human)	XbaI / XbaI	NM000955	122-1327
EP2-R (human)	EcoRI / XbaI	XM-007322	160-1233
EP3-R (human)	EcoRI / XbaI	X83857	53-1518
EP4-R (human)	Hind III / XbaI	L28175	478-1854
EP1-R (Ratte)	XhoI / XbaI	D88752.1	587-2216
EP2-R (Ratte)	EcoRI / XbaI	U48858	2-1174
EP3-R (Ratte)	NotI / XbaI	X80133	106-1191
EP4-R (Maus)	HindIII / XbaI	BC011193	617-2079

3.9 Aufarbeitung der Zellkulturversuche für die Western-Blot-Analyse

3.9.1 Puffer und Lösungen

Lysepuffer für Westernblot

Tris/HCL (pH 7,5)	20 mM	4 ml	1 M Stammlsg
NaCl	150 mM	1,752 g	
EDTA	1 mM	400 µl	0,5 M Stammlsg.
EGTA	1 mM	76 mg	
Triton x-100	1 %(v/v)	2 ml	
Natriumpyrophosphat	2,5 mM	223 mg	
β-Glycerolphosphat	1 mM	43 mg	
NaF	50 mM	420 mg	
H ₂ O		ad 200 ml	

Der pH-Wert der Lösung wurde mit HCl auf pH 7,5 eingestellt und die Lösung bei 4°C gelagert.

Proteaseinhibitoren (1000 x)

Pefablock	200 mM	47,8 mg
Leupeptin	1% (w/v)	10 mg
Trypsininhibitor	1% (w/v)	10 mg

Die Proteaseinhibitoren wurden jeweils in 1 ml H₂O gelöst und getrennt aliquotiert. Sie wurden bei -20°C gelagert.

Natriumorthovanadat (Tyrosinphosphataseinhibitor)

Na ₃ VO ₄	200 mM	36,8 mg
H ₂ O		ad 1 ml

Der pH-Wert der Lösung wurde auf pH 10,0 eingestellt. Zur Aktivierung wurde die Lösung so lange auf Siedetemperatur erhitzt und wieder abgekühlt, bis ihre Farbe von gelblich nach farblos umschlug. Die Lösung wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Vor Gebrauch wurden dem Lysepuffer pro ml frisch zugesetzt:

Pefablock	200 µM	1 µl	200 mM Stammlsg
Leupeptin	10 µg/ml	1 µl	10 mg/ml Stammlsg.
Trypsininhibitor	10 µg/ml	1 µl	10 mg/ml Stammlsg.
Na ₃ VO ₄	1 mM	5 µl	200 mM Stammlsg.

Bradford-Reagenz

Serva Blue (Nr.35050)	0,01 % (w/v)	100 mg
Ethanol (95 %)	4,75 % (v/v)	50 ml
Phosphorsäure (85 %)	8,5 % (v/v)	100 ml
H ₂ O		ad 1000 ml

Die Lösung wurde durch einen Faltenfilter filtriert und bei Raumtemperatur gelagert.

BSA-Standard

BSA	0,1 % (w/v)	10 mg
H ₂ O		ad 10 ml

Die Lösung wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

3.9.2 Herstellung der Zelllysate

Die Zellen wurden wie unter 3.3.2 beschrieben behandelt und bei -70 °C gelagert. Alle Aufarbeitungsschritte erfolgten bei 4 °C. Zunächst wurden zu jeder Zellkulturplatte 100 µl Lysepuffer versetzt mit Natriumorthovanadat und Proteaseinhibitoren gegeben. Anschließend wurden die Zellen abgeschabt und die Lysate in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Zum besseren Zellaufschluss wurde die Zellsuspension für 10 s mit Ultraschall homogenisiert (Ultraschallstab Bandelin UW 2070, Power 55 %, Cycle 5). Dann wurden die Zelllysate für 15 min bei 10.000 x g zentrifugiert (SIGMA 3K30 Zentrifuge, Rotor SIGMA 1215/4-H) und der Überstand in neue 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Diese Zelllysate wurden bei -20 °C gelagert. Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte nach der Methode von BRADFORD (1976).

3.9.3 Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976)

Zur Proteinbestimmung nach BRADFORD wurden die Zelllysate so mit H₂O vorverdünnt, dass die Proteinkonzentrationen innerhalb der Kalibrierungsgerade lagen. Von dieser Vorverdünnung wurden in einer Doppelbestimmung 10 µl in neue 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und mit 90 µl H₂O nochmals 1:10 verdünnt. Zur Erstellung einer Kalibrierungsgeraden wurden aus einer BSA-Stammlösung (1 mg/ml) sechs Verdünnungen in Doppelbestimmung erstellt (Tabelle 5).

Tabelle 5: BSA-Standardreihe

µl BSA (1 mg/ml)	0	1	2	4	6	8	10
µl H ₂ O	100	99	98	96	94	92	90
BSA (µg / µl)	0	0,01	0,02	0,04	0,06	0,08	0,1

20 µl jeder Probe und des zu vergleichenden Standards (BSA-Verdünnungsreihe) wurde in ein Well der 96-Well Platte gegeben. Mit einer Multipipette wurden anschließend 200 µl

BRADFORD-Reagenz in jede Vertiefung hinzugefügt. Je nach Proteingehalt entwickelte sich nach kurzer Zeit eine Blau/Grau-Färbung, die nach 10 min stabil war und bei 578 nm photometrisch quantifiziert werden konnte. Mit Hilfe der aus der BSA-Verdünnungsreihe erstellten Kalibrierungsgerade konnte der Proteingehalt in den Zelllysaten ermittelt werden.

3.10 Immunologischer Nachweis der Phosphorylierung von Akt, ERK1/2, mTOR und IRS durch Western-Blot-Analyse

3.10.1 Puffer und Lösungen

Wenn nicht anders beschrieben, wurden die Lösungen bei Raumtemperatur gelagert.

5 x SDS-Probenpuffer

Tris/HCl (pH 7,5)	400 mM	2,5 ml	1 M Stammlsg.
SDS	10 % (w/v)	50 ml	20 % (w/v) Stammlsg
Glycerol	25 % (w/v)	28,74 ml	87 % (w/v) Stammlsg.
Bromphenolblau	0,0125 % (w/v)	125 mg	
H ₂ O		ad 100 ml	

Probenpuffer

5 x SDS-Probenpuffer	4 x	800µl
β-Mercaptoethanol	20 %	200µl

Die Lösung wurde frisch angesetzt.

Acrylamid-Stammlösung (30 % (w/v))

Die Lösung wurde gebrauchsfertig von der Firma Roth gekauft und bei 4 °C gelagert.

Trenngelpuffer

Tris	1,5 M	18,17 g	
SDS	0,4 % (w/v)	4 ml	10 % Stlammsg.
H ₂ O		ad 100 ml	

Der pH-Wert der Lösung wurde mit HCl auf pH 8,8 eingestellt. Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

Sammelgelpuffer

Tris	0,5 M	50 ml	1 M Stammlsg.
SDS	0,4 % (w/v)	4 ml	10 % Stammlsg.
H ₂ O		ad 100 ml	

Der pH-Wert der Lösung wurde mit HCl auf pH 6,8 eingestellt. Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

APS-Stammlösung (10 % (w/v))

APS	10 % (w/v)	10 g
H ₂ O		ad 100 ml

Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

10 x SDS-Elektrophorese-Laufpuffer

Tris	250 mM	30,3 g	
Glycin	1,91 M	144,1 g	
SDS	1 % (w/v)	100 ml	10 % (w/v) Stammlsg.
H ₂ O		ad 100 ml	

1 x SDS-Elektrophorese-Laufpuffer

10 x SDS-Elektrophorese-Laufpuffer	1 x	100 ml
H ₂ O		ad 1000 ml

10 x TBS-Puffer

Tris	0,20 M	24,2 g
NaCl	1,36 M	80,0 g
H ₂ O		ad 1000 ml

Der pH-Wert der Lösung wurde auf pH 7,6 eingestellt.

Tween-Stammlösung (20 % (v/v))

Tween	20 % (v/v)	20 ml
H ₂ O		ad 100 ml

TBS/Tween-Puffer

10 x TBS-Puffer	1 x	100 ml
Tween	0,1 % (v/v)	5 ml
H ₂ O		ad 1000 ml

Blottransferpuffer A

Tris	300 mM	300 ml	1 M Stammlsg.
SDS	0,1 % (w/v)	10 ml	10 % (w/v) Stammlsg.
Methanol	20 % (v/v)	200 ml	
H ₂ O		ad 1000 ml	

Der pH-Wert der Lösung wurde auf pH 11,5 eingestellt.

Blottransferpuffer B

Tris	25 mM	25 ml	1 M Stammlsg.
SDS	0,1 % (w/v)	10 ml	10 % (w/v) Stammlsg.
Methanol	20 % (v/v)	200 ml	
H ₂ O		ad 1000 ml	

Der pH-Wert der Lösung wurde auf pH 10,5 eingestellt.

Blottransferpuffer C

Tris	25 mM	25 ml	1 M Stammlsg.
SDS	0,1 % (w/v)	10 ml	10 % (w/v) Stammlsg.
Methanol	20 % (v/v)	200 ml	
H ₂ O		ad 1000 ml	

Der pH-Wert der Lösung wurde mit 1 M Borsäure auf pH 9,0 eingestellt.

Ponceau S-Färbelösung

Ponceau S	0,25 %	1,25 g
Essigsäure	15 %	75 ml
Methanol	40 % (v/v)	200 ml
H ₂ O		ad 1000 ml

Die Lösung wurde durch einen Faltenfilter filtriert.

Blockierlösung

Magermilchpulver	5 % (w/v)	5 g
TBS/Tween-Puffer		ad 100 ml

Die Lösung wurde bei 4°C gelagert.

3.10.2 Vorbereitung der Proben für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Der Proteingehalt wurde wie unter 3.8.3 beschrieben ermittelt und alle Proben eines Versuchsansatzes mit Lysepuffer auf einen identischen Proteingehalt in einem Volumen von maximal 45 µl verdünnt. Jeder Probenansatz wurde anschließend mit 1/3 Volumen Probenpuffer versetzt, 5 min auf 95°C erhitzt und bei 13.000 rpm (16.050 x g, 5 min) in der Biofuge pico zentrifugiert. Dann wurden die Proben auf das Polyacrylamidgel aufgetragen.

Damit die Western-Blot-Analyse auswertbare Ergebnisse liefern konnte, wurde bei jedem der vier Antikörper getestet, in welchem Bereich die Signalstärke (Bandenintensität) von der eingesetzten Proteinmenge linear abhängig war. Außerhalb des Bereiches befand

man sich in der Sättigung und konnte Unterschiede in der Signalstärke nicht richtig nachweisen. Die Ergebnisse dieser Vorversuche definierten eine optimale Proteinmenge pro Spur des Polyacrylamidgels je nach Antikörper und Zelltyp, die im linearen Bereich der Konzentrationsreihen lag.

Protein-Längenstandards für SDS-PAGE

Für den immunologischen Nachweis der Phosphorylierungen von Akt (60 kDa) und ERK1/2 (44 und 42 kDa) wurde der Protein-Längenstandard ‚Protein Molecular Weight Marker‘ verwendet. Dieser wurde zusammen mit den Proben 5 min auf 95°C erhitzt und bei 13.000 rpm (16.050 x g, 5 min) in der Biofuge pico zentrifugiert und mit den Proben auf das Polyacrylamidgel aufgetragen. Für den immunologischen Nachweis der Phosphorylierung von mTOR (289 kDa) und IRS (180 kDa) wurde dagegen der Protein-Längenstandard ‚Page Ruler™ Prestained Protein Ladder‘ benutzt. Dieser wurde direkt mit den Proben auf das Polyacrylamidgel aufgetragen.

3.10.3 Vorbereitung der Polyacrylamidgele

Zur analytischen Trennung von Proteinen anhand des Molekulargewichtes wurden diskontinuierliche Polyacrylamidgele nach LAEMMLI (1970) eingesetzt. Die verwendeten Gele hatten eine Stärke von 1 mm und eine Abmessung von 8,5 x 5,5 cm. Sie wurden mit dem Elektrophorese-System Mini Protean II (BioRad) gegossen und betrieben. Die Glasplatten wurden mit Aceton gereinigt und mit Hilfe von zwei Abstandhaltern (*Spacern*) zwischen den Platten zusammengesetzt und abgedichtet. Die Trenngele für Akt und ERK1/2 (10 %) und für mTOR und IRS (6 %) wurden wie folgt gegossen (Tabelle 6):

Tabelle 6: Trenngele für die Western-Blot-Analyse

	10 % (w/v) Polyacrylamid	6 % (w/v) Polyacrylamid
Acrylamid (30 %)	3,00 ml	1,8 ml
H ₂ O	3,75 ml	4,95 ml
Trenngelbuffer	2,25 ml	2,25 ml
TEMED	15 µl	15 µl
APS-Stammlösung (10 % (w/v))	75 µl	75 µl

Die einzelnen Komponenten wurden gemischt und bis zu einer Höhe von 5,5 cm zwischen die Glasplatten gefüllt. Zur Glättung der Oberfläche wurde das Gel anschließend mit n-Butanol überschichtet. Nachdem das Trenngel vollständig polymerisiert war, wurde das n-Butanol entfernt, die Geloberfläche kurz mit Wasser gespült und dann vorsichtig mit einem Filterpapier getrocknet. Anschließend wurde das Sammelgel wie folgt gegossen (Tabelle 7):

Tabelle 7: Sammelgel für die Western-Blot-Analyse

	4,45 % (w/v) Polyacrylamid
Acrylamid (30 %)	0,5 ml
H ₂ O	2,0 ml
Sammelgelpuffer	833 µl
TEMED	5 µl
APS-Stammlösung (10 % (w/v))	25 µl

Die Lösungen wurden gemischt, bis zum oberen Rand zwischen die Glasplatten gefüllt und der Probenkamm luftblasenfrei eingesetzt. Nach ca. 20 min wurde das Gel in die Elektrophoresekammer eingebaut und diese mit 1 x Elektrophorese-Laufpuffer gefüllt. Anschließend konnte der Probenkamm entfernt und gegebenenfalls vorhandene Luftblasen weggespült werden.

3.10.4 Trennung der Proteine durch SDS-PAGE

Die aufbereiteten Proben (maximal 60 µl) wurden in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte mit 15 mA/Gel im Sammelgel bzw. mit 20 mA/Gel im Trenngel. Für den Nachweis der Phosphorylierung von Akt und ERK1/2 wurde sie beendet, wenn die Bromphenolblaubande den unteren Rand des Trenngels erreicht hatte. Für den Nachweis der Phosphorylierung von mTOR und IRS wurde die Elektrophorese ca. 20 min, nachdem die Bromphenolbande aus dem Gel herausgelaufen war, beendet.

3.10.5 Transfer der getrennten Proteine auf PVDF-Membran durch Western-Blot

Nach der Gelelektrophorese wurde das Sammelgel vorsichtig abgetrennt, die linke obere Ecke des Trenngels zur Markierung entfernt und das Gel für 15 min in Blottransferpuffer C äquilibriert. Währenddessen wurden eine PVDF-Membran und vier Gel-Blotting-Papiere auf die entsprechende Größe des Gels (8,5 x 5,5 cm für ein Gel bzw. 8,5 x 11,0 cm für zwei Gele) zugeschnitten und die linke obere Ecke der Membran ebenfalls markiert. Durch kurzes Schwenken der PVDF-Membran in reinem Methanol wurde diese gleichmäßig angefeuchtet. Danach wurde sie mehrmals mit Wasser gespült und anschließend in Blottransferpuffer B für 15 min äquilibriert.

Der Blotaufbau erfolgte auf der Anodenplatte der Blotvorrichtung. Als erstes wurde ein Filterpapier in Blottransferpuffer A angefeuchtet und aufgelegt. Darauf wurde ein zuvor mit Blottransferpuffer B benetztes Filterpapier gelegt. Anschließend wurden auf diese beiden Filter zunächst die PVDF-Membran und dann das Polyacrylamidgel vorsichtig aufgelegt, so dass die beiden markierten Ecken übereinander lagen. Als letztes wurden zwei zuvor

in Blottransferpuffer C angefeuchtete Filter auf das Gel geschichtet. Die einzelnen Schichten wurden möglichst luftblasenfrei aufeinander gelegt. Um eventuell noch vorhandene Luftblasen und überschüssige Flüssigkeit zu entfernen, wurde der gesamte Aufbau mit einem Glasröhrchen, das über das oberste Filterpapier gerollt wurde, vorsichtig komprimiert. Überschüssiger Puffer wurde mit Zellstoff entfernt und die Kathodenplatte vorsichtig aufgelegt. Der Transfer erfolgte bei konstanter Stromstärke von $1,2 \text{ mA/cm}^2$ Gelfläche (= 56 mA/Gel) über einen Zeitraum von 45 min für den Nachweis der Phosphorylierung von Akt und ERK1/2. Für den Nachweis der Phosphorylierung von mTOR und IRS erfolgte der Transfer über einen Zeitraum von 2 h.

3.10.6 Nachweis der geblotteten Proteine durch Ponceau S-Färbung

Nach Ablauf der Transferzeit wurde der Blotaufbau abgebaut und die PVDF-Membran mit Hilfe einer Pinzette entnommen. Durch kurzes Schwenken in einer Schale mit Ponceau S-Färbelösung wurden die Proteinbanden reversibel angefärbt. Nach mehrmaligem Spülen mit Wasser zur Eliminierung der Hintergrundfärbung war es möglich, die Banden des Molekulargewichtsstandards mit Nadelstichen zu markieren. Die Membran wurde anschließend durch Schwenken in TBS/Tween-Puffer vollständig entfärbt.

3.10.7 Immunologischer Nachweis der Proteine in der Western-Blot-Analyse durch eine peroxidasevermittelte Chemilumineszenzreaktion

Zur Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen wurde die Membran für 60 min bei Raumtemperatur in der Blockierlösung schwenkend inkubiert. Danach wurde sie 3 x 10 min mit TBS/Tween-Puffer gewaschen und über Nacht bei 4°C mit dem Erstantikörper inkubiert. Die Verdünnung der Erstantikörper ist unter 2.10 beschrieben.

Am nächsten Tag wurde der Erstantikörper entfernt und die Membran erneut 3 x für je 10 min mit TBS/Tween-Puffer gewaschen. Die Inkubation mit dem peroxidasegekoppelten Zweitantikörper erfolgte für zwei Stunden bei Raumtemperatur in Blockierlösung. Je nach verwendetem Erstantikörper wurde als Zweitantikörper ein Ziege-Anti-Maus-HRP-Konjugat oder ein Ziege-Anti-Kaninchen-HRP-Konjugat verwendet (siehe 2.10). Nach der Inkubation wurde die Membran erneut 3 x 10 min mit TBS/Tween-Puffer gewaschen. Der Nachweis wurde durch eine Chemilumineszenzreaktion mit dem Chemilumineszenzsubstrat (SuperSignal® West Pico Chemilumineszenzsubstrat) nach Anweisung des Herstellers abgeschlossen. Dazu wurden die Lösungen 1 und 2 zu gleichen Teilen zu einem Endvolumen von $1 \text{ ml}/46,75 \text{ cm}^2$ PVDF-Membran gemischt und auf die Membran gegeben. Die Lösung wurde durch langsames Schwenken möglichst gleichmäßig auf der Membran verteilt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurde die Membran in

Frischhaltefolie eingelegt und überschüssiges Chemilumineszenzsubstrat durch vorsichtiges Abrollen mit einem Glasröhrchen entfernt. Die durch Nadelstiche in der Membran markierten Banden des Molekulargewichts-Standards konnten mit einem wasserfesten Stift nachgezogen werden. Die entstehende Chemilumineszenz wurde mit Hilfe des ‚ChemiDocTM‘-System (BioRad) detektiert und die angefärbten Banden mit dem Software-Programm ‚Quantity One‘ der Firma BioRad quantifiziert. Falls keine oder nur sehr schwache Banden zu erkennen waren, wurde das sensitivere Chemilumineszenzsubstrat (ECL Advanced Chemilumineszenzsubstrat) verwendet. Die Membran wurde mit 1 x TBS/ Tween-Puffer gewaschen, mit je 500 µl der Lösung 1 und 2 des Chemilumineszenzsubstrats überschichtet und 5 min inkubiert. Anschließend konnte der Blot mittels ‚ChemiDocTM‘-System erneut ausgewertet werden.

3.10.8 Auswertung der Western-Blot-Analysen

Es wurden alle elektrophoretisch aufgetrennten Zelllysate eines Zellkulturversuchs auf eine Membran geblottet, um sie untereinander vergleichbar zu machen. Die Entwicklung der Blots mit dem Chemilumineszenzsubstrat verlief zwar prinzipiell immer nach dem gleichen Protokoll, jedoch waren die Färbereaktionen bzw. die Schwarzfärbung der detektierten Banden oft unterschiedlich. Um den Vergleich zwischen verschiedenen Experimenten mit dem gleichen Versuchsansatz zu gewährleisten, wurde daher zunächst die auszuwertende Bande durch die Summe aller Bandenintensitäten des jeweiligen Blots dividiert und erst dann der Quotient zwischen phosphoryliertem und nicht-phosphoryliertem Protein gebildet.

3.11 Radioaktive Bestimmung der PGE₂-Bindung

Die PGE₂-Bindung wurde mit radioaktivem PGE₂ in allen Zellen überprüft, die stabil mit einem der vier EP-Rezeptoren transfiziert und in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden. Im Rahmen der Arbeit wurde der PGE₂-Bindungsassay für die SH-SY5Y-EP3β-Zellen und die HepG2-EP1-Zellen¹⁰ durchgeführt.

3.11.1 Prinzip des PGE₂-Bindungs-Assays

Der PGE₂-Bindungsassay basiert auf der Bindung von [³H]-radioaktiv markiertem PGE₂ an die vier PGE₂-Rezeptoren der verschiedenen Zelltypen. Nicht-radioaktiv markiertes PGE₂ wird in einem parallelen Ansatz im Überschuss zugegeben, um die unspezifische Bindung des markierten PGE₂ zu bestimmen. Um die freien und die gebundenen Liganden von-

¹⁰ Der PGE₂-Bindungsassay für die HepG2-EP1-Zellen wurde von Dr. habil. Frank Neuschäfer-Rube aus der Arbeitsgruppe durchgeführt.

einander zu trennen, werden die Zellhomogenate auf einen Glasfilter gepumpt. Das auf dem Filter gebundene [^3H]-PGE₂ wird zur Messung im β -Counter mittels Scintillatorflüssigkeit verwendet.

3.11.2 Puffer und Lösungen

PGE₂-Bindungspuffer

Tris/HCl	10 mM	10 ml	1 M Stammlsg. pH 6,2
EDTA	1 mM	2 ml	0,5 M Stammlsg.
MgCl ₂	10 mM	5 ml	2 M Stammlsg.
H ₂ O		ad 1000 ml	

Der Puffer wurde auf pH 6,2 eingestellt und bei 4 °C gelagert.

Vor Gebrauch wurde dem PGE₂-Bindungspuffer pro ml frisch zugesetzt:

Pefablock	200 μM	1 μl	200 mM Stammlsg
Leupeptin	10 $\mu\text{g/ml}$	1 μl	10 mg/ml Stammlsg.
Trypsininhibitor	10 $\mu\text{g/ml}$	1 μl	10 mg/ml Stammlsg.

[^3H]-PGE₂ (541 nM):

Die Substanz wurde als Lösung in 70 % Ethanol vom Hersteller geliefert und bei 4 °C gelagert.

[^3H]-PGE₂ (20 nM):

Die [^3H]-markierte PGE₂-Stammlösung wurde mit PGE₂-Bindungspuffer auf eine Konzentration von 20 nM verdünnt. Die Lösung wurde frisch angesetzt.

3.11.3 Herstellung der Homogenate

Die entsprechenden Zellen wurden wie unter 3.1 beschrieben kultiviert und einmal mit 1 x PBS gewaschen. Die Zellen wurden bei 4 °C mit 250 μl Bindungspuffer mit Proteaseinhibitoren abgeschabt und die Homogenate in 1,5 ml-Reaktionsgefäße bei 4 °C überführt.

3.11.4 Messung der PGE₂-Bindung

Die Homogenate wurden für die Bindungsreaktion in 3 ml Ria-Röhrchen mit 50 μl der [^3H]-PGE₂ 20 nM-Lösung und zur Bestimmung der unspezifischen Bindung in einem parallelen Ansatz zusätzlich mit einem 1000-fachen Überschuss PGE₂ (10 μM) in einem Endvolumen von 100 μl für 1 h bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Alle Messungen wurden in einer Doppelbestimmung durchgeführt. Um anschließend die gebundenen und die ungebundenen Liganden voneinander zu trennen, wurden die Zellsuspensionen über einen GF 52 Filter vakuumfiltriert. GF 52 Filter wurden in PGE₂-Bindungspuffer eingeweicht. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen simultan durch Vakuumfiltration

über GF 52 Filter und mit einer Absaugvorrichtung vom Inkubationsansatz getrennt und 5 x mit 4 ml eiskaltem Bindungspuffer gewaschen. Die Filter wurden in Scintillationsgefäße überführt, mit 5 ml Scintillationsflüssigkeit versetzt und die [³H]-Aktivität im β -Counter gemessen.

3.12 Statistische Auswertung

Alle Experimente wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Anschließend wurde der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Die Signifikanzniveaus wurden mittels gepaartem, zweiseitigen Students's t-Test ermittelt. Alle Tests wurden mit Hilfe des Programms Excel durchgeführt, wobei das Signifikanzniveau auf $p < 0,05$ festgelegt wurde.

4 ERGEBNISSE

4.1 Quantifizierung der PGE₂-Rezeptoren in primären Hepatozyten der Ratte und Hepatomzelllinien

4.1.1 Quantifizierung der PGE₂-Rezeptoren in primären Hepatozyten

Zum Vergleich der Hepatomzelllinien mit der Situation im natürlichen System, wurde zunächst die Genexpression der vier PGE₂-Rezeptoren (EP1-4) in primären Hepatozyten der Ratte mittels quantitativer *Real-Time*-PCR bestimmt (Abb. 10). Die primären Hepatozyten der Ratte wurden innerhalb der Arbeitsgruppe¹¹ durch nicht-rezirkulierende Perfusion mit Ca²⁺-freiem Medium isoliert, über einen Dichtegradienten gereinigt und für zwei Tage in Medium 199 mit 1 % Penicillin/Streptomycin, 100 nM Dexamethason und 0,5 nM Insulin kultiviert. Für die ersten vier Stunden wurden die Zellen zusätzlich mit 4 % neonatalem Kälberserum kultiviert. Die Genexpression der PGE₂-Rezeptoren wird als Verhältnis aus den Kopien für die PGE₂-Rezeptoren und den Kopien für GAPDH angegeben.

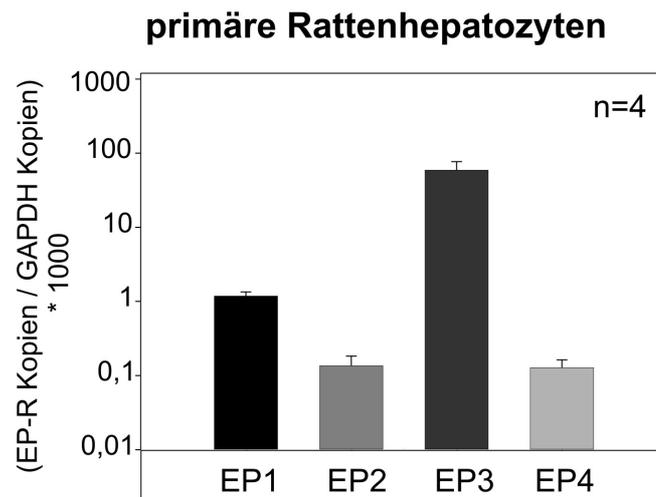


Abbildung 10: Quantifizierung der PGE₂-Rezeptoren in primären Rattenhepatozyten

Primäre Hepatozyten der Ratte wurden durch nicht-rezirkulierende Perfusion mit Ca²⁺-freiem Medium isoliert und für zwei Tage in Medium 199 mit 1 % Penicillin/Streptomycin, 100 nM Dexamethason und 0,5 nM Insulin kultiviert. Für die ersten vier Stunden wurden die Zellen zusätzlich mit 4 % neonatalem Kälberserum kultiviert. Die RNA wurde isoliert (siehe 3.5) und die mRNA-Kopienzahl für die PGE₂-Rezeptoren und GAPDH anhand von Eichgeraden mit entsprechenden Plasmid-DNA's quantifiziert (siehe 3.6.5). Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm SEM von vier unabhängigen Versuchen in Dreifachbestimmung.

¹¹ Die Präparation und die Isolierung der primären Rattenhepatozyten wurden von Manuela Kuna und Janin Henkel aus der Arbeitsgruppe durchgeführt.

Die mRNA für den EP2- und EP4-Rezeptor konnte in den primär kultivierten Hepatozyten der Ratte praktisch nicht nachgewiesen werden, das EP-R/GAPDH-Verhältnis lag bei 0,0001. Das Gen für den EP1-Rezeptor war in den Zellen schwach exprimiert, das EP-R/GAPDH-Verhältnis lag bei 0,001. Die primären Hepatozyten der Ratte exprimierten am stärksten den EP3-Rezeptor. Dieser wird circa 60 mal stärker exprimiert als der EP1-Rezeptor. Der EP3-R war damit in Rattenhepatozyten sehr viel stärker exprimiert als irgendein anderer PGE₂-Rezeptor in primären Zellen oder nicht transfizierten Zelllinien, die innerhalb der Arbeitsgruppe zum Vergleich zur Verfügung standen.

4.1.2 Quantifizierung der PGE₂-Rezeptoren in HepG2-Zellen

HepG2-Zellen sind menschliche Hepatomzellen. Sie wurden in vorangegangenen Arbeiten mit dem EP3 β - und dem EP4-Rezeptor stabil transfiziert (siehe 3.2). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine stabile HepG2-EP1-Rezeptorzelllinie (HepG2-EP1) generiert. Der Erfolg der stabilen Transfektion wurde mit Hilfe des PGE₂-Bindungsassays (Daten nicht gezeigt) und RT-PCR überprüft.

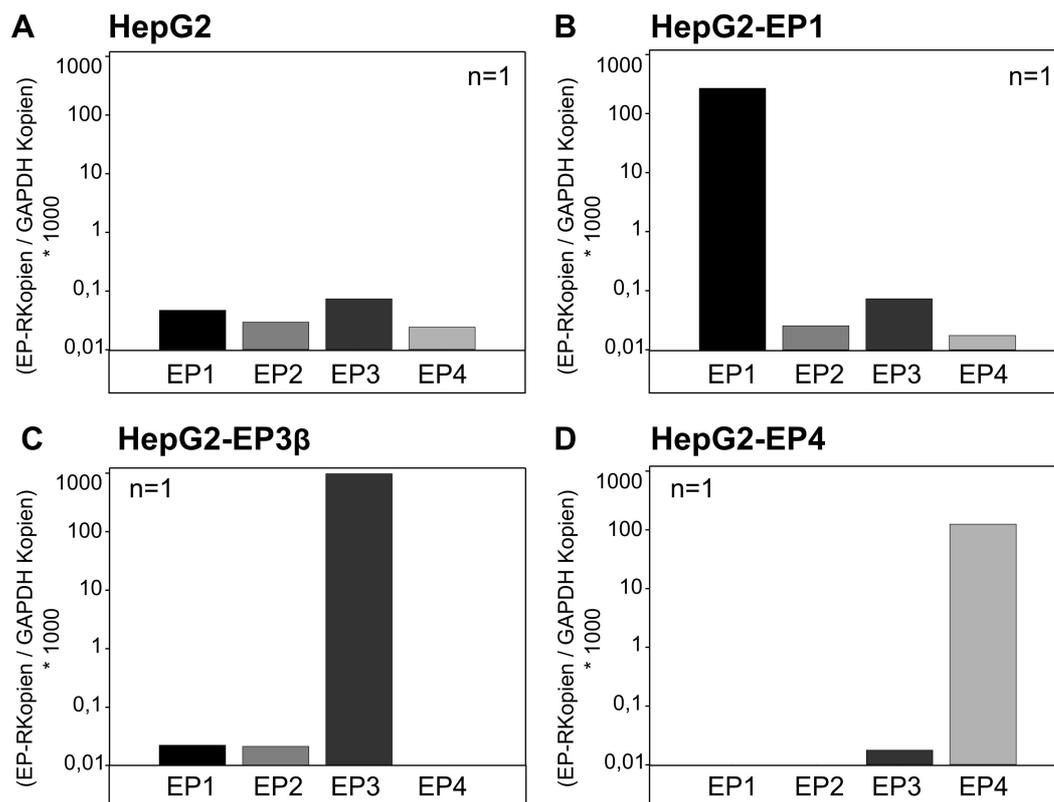


Abbildung 11: Quantifizierung der PGE₂-Rezeptoren in HepG2-Zellen

Die nicht transfizierten HepG2-Zellen (A) und die stabil transfizierten HepG2-Zellen HepG2-EP1 (B), HepG2-EP3 β (C) und HepG2-EP4 (D) wurden wie unter 3.1.1 beschrieben kultiviert. Die RNA wurde isoliert (siehe 3.5) und die mRNA-Kopienzahl für die PGE₂-Rezeptoren und GAPDH anhand von Eichgeraden mit entsprechenden Plasmid-DNA's quantifiziert (siehe 3.6.5). Für (A-C) wurden die humanen Primer für den EP4-R verwendet (siehe Tabelle 1). Da die HepG2-EP4-Zellen (D) mit dem murinen EP4-R stabil transfiziert wurden, wurden hierfür die Ratte/Maus-Primer verwendet. Hierzu wurde jeweils ein Versuch durchgeführt.

In untransfizierten HepG2-Zellen konnte keiner der vier PGE₂-Rezeptoren auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden (Abb. 11). Das EP-R/GAPDH-Verhältnis lag bei allen in einem Bereich unterhalb der technischen Nachweisgrenze. HepG2-EP1-Zellen exprimierten nur den EP1-Rezeptor, HepG2-EP3 β -Zellen nur den EP3 β Rezeptor und HepG2-EP4-Zellen ausschließlich den EP4-Rezeptor.

4.1.3 Quantifizierung der PGE₂-Rezeptoren in Fh-hTert-Zellen

Fh-hTert ist eine humane fötale Hepatozytenzelllinie. Die mRNA für den EP1- und den EP3-Rezeptor konnte in den Fh-hTert Zellen nicht nachgewiesen werden (Abb. 12). Die Fh-hTert-Zellen exprimierten den EP2- und den EP4-Rezeptor.

4.2 Modulation der Insulinsignalkette durch Vorinkubation mit PGE₂ in HepG2-Zellen

4.2.1 Modulation der insulinabhängigen Akt-Phosphorylierung

Die **Akt-Kinase** (PKB) ist ein Enzym der intrazellulären Signalübertragung von Insulin. Ihre Aktivität korreliert mit dem Ausmaß der Phosphorylierung an Ser⁴⁷³. Durch Western-Blot-Analysen mit spezifischen Antikörpern gegen Ser⁴⁷³-phosphorylierte Akt (pAkt) und Gesamt-Akt konnte der Aktivierungsgrad des Enzyms bestimmt werden. Hierbei handelt es sich um Antikörper, die alle Akt-Isoformen erkennen. Für die vollständige Aktivierung der Akt-Kinase (siehe 1.1.4) ist die Phosphorylierung des Threoninrestes in Position 308 und des Serinrestes in Position 473 notwendig (VANHAESEBROECK et al. 2000; SCHEID & WOODGETT 2003). Die Phosphorylierung von Serin⁴⁷³ ist der Threoninphosphorylierung des Enzyms durch PDK1 nachgeschaltet. Für die Zellversuche in HepG2-Zellen wurden diese 330 min \pm PGE₂ und danach zusätzlich für 15 min mit 10 nM Insulin inkubiert.

Die 15-minütige Insulinstimulation steigerte in allen HepG2-Zellen, den nicht transfizierten, sowie den transfizierten, die Phosphorylierung von Akt signifikant (Abb. 13). Die Vorbehandlung der Zellen für 330 min mit PGE₂ allein aktivierte Akt in den HepG2-Zellen um den Faktor 1,5 und in den HepG2-EP1-Zellen um den Faktor 1,7. In den HepG2-EP3 β - und den HepG2-EP4-Zellen steigerte PGE₂ allein unter diesen Bedingungen die Akt-Phosphorylierung nicht. In den HepG2-Zellen, die keinen der PGE₂-Rezeptoren exprimierten, beeinflusste diese Vorinkubation mit PGE₂ die insulinstimulierte Akt-Phosphorylierung nicht. In den HepG2-EP1-, HepG2-EP3 β - und HepG2-EP4-Zellen hemmte die Vorbehandlung der Zellen mit PGE₂ die insulinstimulierte Akt-Phosphorylierung signifikant: bei den HepG2-EP1- und den HepG2-EP3 β -Zellen um den Faktor 3, bei den HepG2-EP4-Zellen dagegen nur um den Faktor 1,4.

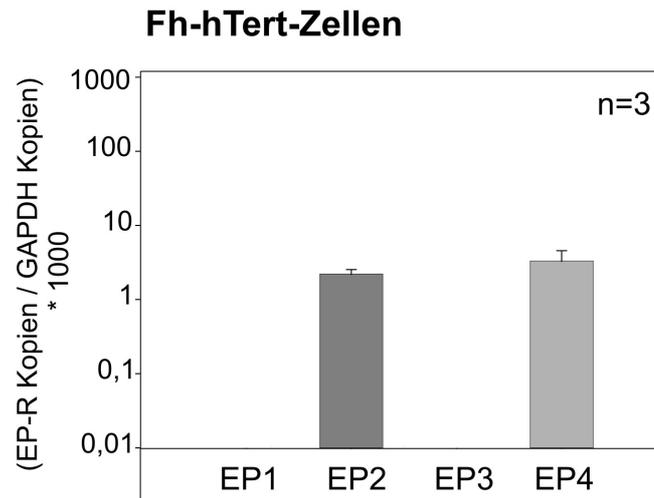


Abbildung 12: Quantifizierung der PGE₂-Rezeptoren in Fh-hTert-Zellen

Fh-hTert-Zellen wurden wie unter 3.1.2 beschrieben kultiviert. Die RNA wurde isoliert (siehe 3.5) und die mRNA-Kopienzahl für die PGE₂-Rezeptoren und GAPDH anhand von Eichgeraden mit entsprechenden Plasmid-DNA's quantifiziert (siehe 3.6.5). Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Versuchen in Dreifachbestimmung.

In drei Versuchen war es möglich, die Aktivierung von Akt in HepG2-, HepG2-EP1- und HepG2-EP3 β -Zellen miteinander zu vergleichen, da die Zelllysate auf das gleiche Gel aufgetragen und auf die gleiche Membran geblottet wurden. Hierbei zeigte sich, dass die insulinstimulierte Akt-Phosphorylierung in den HepG2-EP3 β -Zellen mehr als doppelt so stark war, als in den HepG2- und HepG2-EP1-Zellen. Dieser Unterschied war signifikant (Abb. 14). Allerdings ist zu berücksichtigen, dass in diesen drei Experimenten die insulinabhängige Akt-Phosphorylierung gemessen als pAkt/Akt-Verhältnis in den HepG2-EP1-Zellen deutlich schwächer war als im Durchschnitt der Versuche (Abb. 14 mit n=3 vs. Abb. 13B mit n=11). Das Ausmaß der insulinstimulierten Akt-Phosphorylierung in den HepG2-EP3 β -Zellen stimmte dagegen mit dem Mittelwert aller Versuche überein (Abb. 14 mit n=3 vs. Abb. 13C mit n=11).

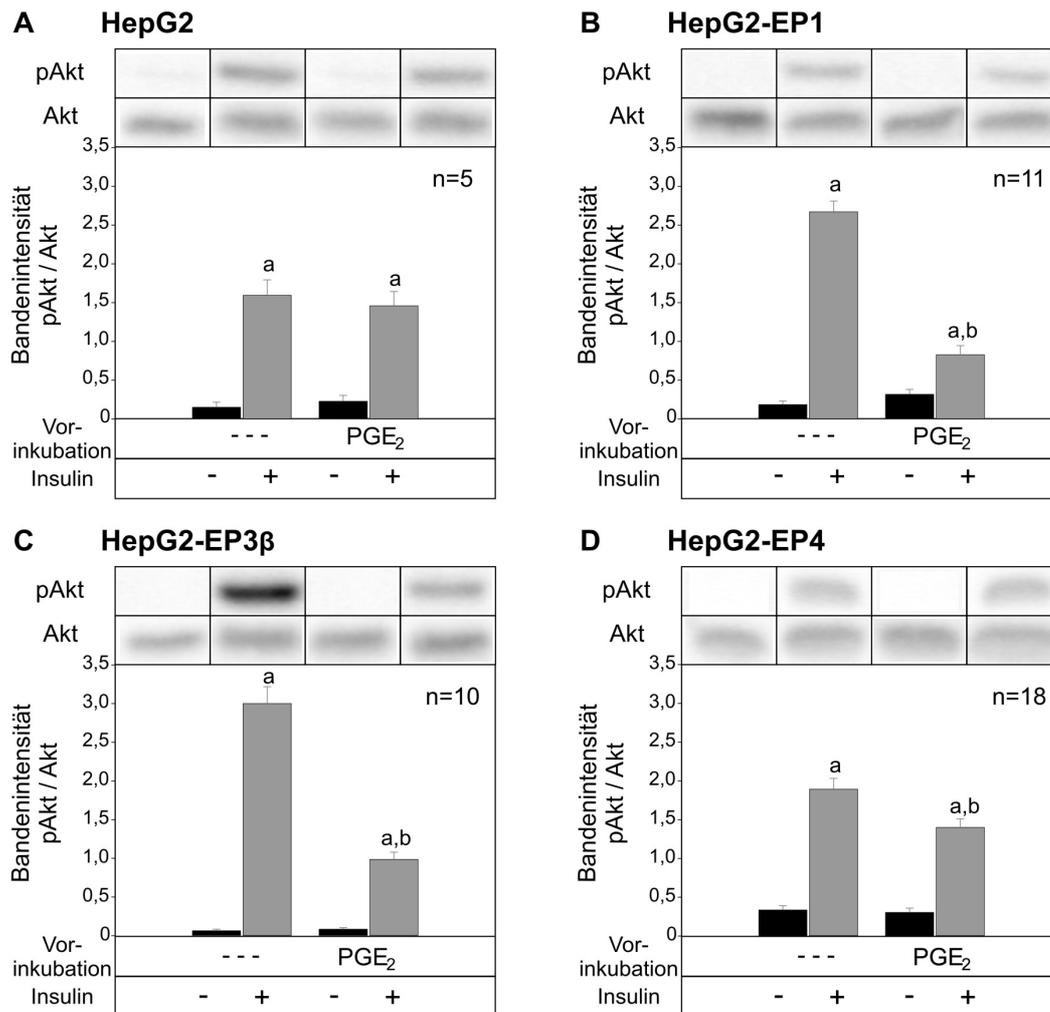


Abbildung 13: Modulation der insulinabhängigen Phosphorylierung von Akt durch Vorinkubation mit PGE₂ in HepG2-Zellen

HepG2- (A), HepG2-EP1- (B), HepG2-EP3β- (C) und HepG2-EP4-Zellen (D) wurden wie unter 3.1.1 beschrieben kultiviert, mit PGE₂ (10 μM) für 330 min behandelt und anschließend mit Insulin (10 nM) für 15 min stimuliert. Die Zellen wurden lysiert (siehe 3.9). Es wurden jeweils 50 μg Protein für die Western-Blot-Analyse eingesetzt (siehe 3.10). Der Erstantikörper war gegen pAkt bzw. Akt gerichtet. Der Zweitantikörper war HRP-konjugiert. Hierzu wurde die in der Abbildung angegebene Anzahl unabhängiger Experimente durchgeführt. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte ± SEM. a: signifikant versus ohne Insulinstimulation; b: signifikant versus ohne PGE₂-Vorinkubation; p < 0,05; Student's t-Test für gepaarte Stichproben. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Western-Blot.

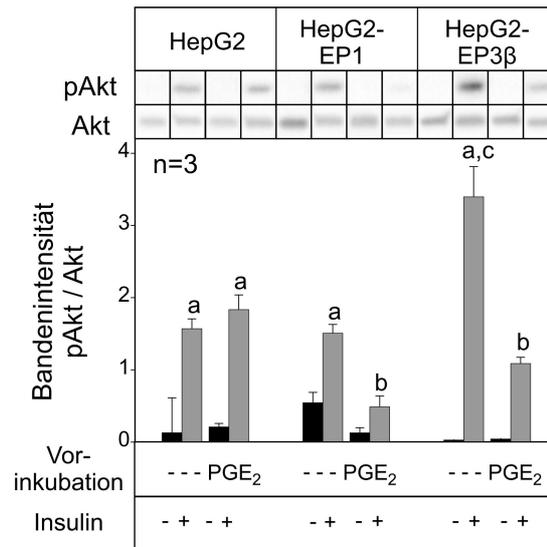


Abbildung 14: Modulation der insulinabhängigen Phosphorylierung von Akt durch Vorinkubation mit PGE₂ in HepG2-Zellen: Vergleich der Zelllinien

HepG2-, HepG2-EP1- und HepG2-EP3β-Zellen wurden wie unter 3.1.1 beschrieben kultiviert, mit PGE₂ (10 μM) für 330 min behandelt und anschließend mit Insulin (10 nM) für 15 min stimuliert. Die Zellen wurden lysiert (siehe 3.9). Es wurde jeweils 50 μg Protein für die Western-Blot-Analyse eingesetzt (siehe 3.10). Der Erstantikörper war gegen pAkt bzw. Akt gerichtet. Der Zweitantikörper war HRP-konjugiert. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte ± SEM aus drei unabhängigen Experimenten. a: signifikant versus ohne Insulinstimulation; b: signifikant versus ohne PGE₂-Vorinkubation; c: signifikant versus HepG2-Zellen; p < 0,05; Student's t-Test für gepaarte Stichproben. Dargestellt ist ein repräsentativer Western-Blot.

4.2.2 Modulation der insulinabhängigen ERK1/2-Phosphorylierung

Die Aktivierung der extrazellulären signalregulierten Kinasen 1 und 2 (**ERK1/2**) konnten wie die der Akt-Kinase durch Western-Blot-Analysen nachgewiesen werden. Dazu wurden spezifische Antikörper gegen Threonin²⁰²- und Tyrosin²⁰⁴-phosphorylierte ERK1 bzw Threonin¹⁸⁵- und Tyrosin¹⁸⁷-phosphorylierte ERK2 (pERK1/2) und Gesamt-ERK1/2 verwendet. Durch die Phosphorylierung dieser beiden Reste in den ERK-Isoformen werden die Enzyme vollständig aktiviert (PEARSON et al. 2001).

Weder Insulin noch PGE₂ steigerte in den nicht transfizierten HepG2-Zellen die ERK1/2-Phosphorylierung signifikant (Ab. 14). In den HepG2-EP1-Zellen steigerte Insulin die ERK1/2-Phosphorylierung nicht, PGE₂ jedoch stimulierte die ERK1/2-Aktivität signifikant um den Faktor 5,5. In diesen Zellen war die ERK1/2-Phosphorylierung nach PGE₂-Stimulation bereits maximal und ließ sich durch Insulin nicht noch weiter steigern. Die 15-minütige Insulinstimulation steigerte die ERK1/2-Phosphorylierung in den HepG2-EP3β-Zellen signifikant, wie auch die alleinige Vorinkubation mit PGE₂. Diese PGE₂-abhängige ERK1/2-Phosphorylierung wurde in den HepG2-EP3β-Zellen durch die anschließende Insulinstimulation noch signifikant um das Dreifache gesteigert. Auch in den HepG2-EP4-Zellen erhöhte die Insulinstimulation die ERK1/2-Phosphorylierung signifikant um das

Doppelte. Die alleinige PGE₂-Vorinkubation aktivierte ERK1/2 in diesen Zellen ebenfalls signifikant, jedoch nur 1,5fach. Wie auch in den HepG2-EP3 β -Zellen war die PGE₂-abhängige Aktivierung von ERK1/2 in den HepG2-EP4-Zellen nach Insulinstimulation maximal.

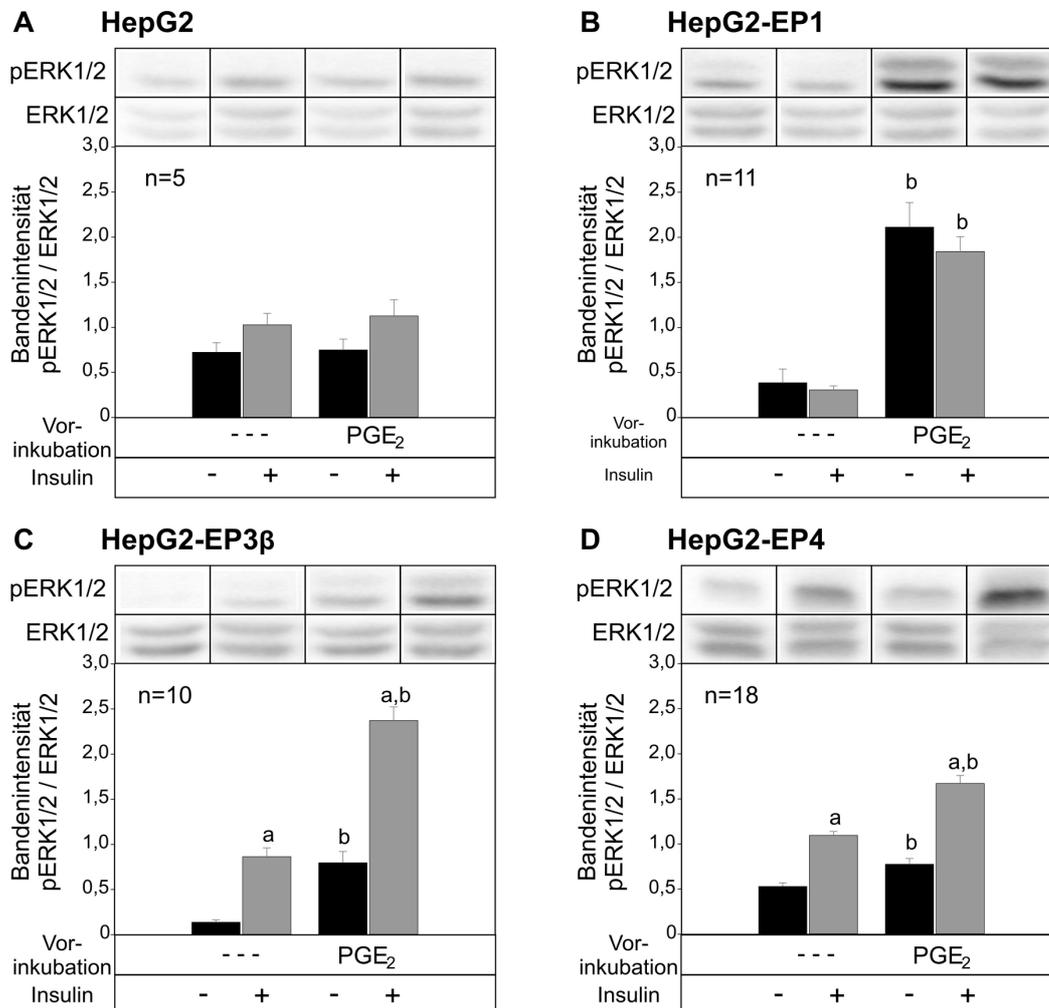


Abbildung 15: Modulation der insulinabhängigen Phosphorylierung von ERK1/2 durch Vorinkubation mit PGE₂ in HepG2-Zellen

HepG2- (A), HepG2-EP1- (B), HepG2-EP3 β - (C) und HepG2-EP4-Zellen (D) wurden wie unter 3.1.1 beschrieben kultiviert, mit PGE₂ (10 μ M) für 330 min vorstimuliert und anschließend mit Insulin (10 nM) für 15 min stimuliert. Die Zellen wurden lysiert (siehe 3.9). Es wurden jeweils 50 μ g Protein für die Western-Blot-Analyse eingesetzt (siehe 3.10). Der Erstantikörper war gegen pERK1/2 bzw. ERK1/2 gerichtet. Der Zweitantikörper war HRP-konjugiert. Hierzu wurde die in der Abbildung angegebene Anzahl unabhängiger Experimente durchgeführt. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm SEM. a: signifikant versus ohne Insulinstimulation; b: signifikant versus ohne PGE₂-Vorinkubation; p < 0,05; Student's t-Test für gepaarte Stichproben. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Western-Blot.

4.2.3 Modulation der insulinabhängigen mTOR-Phosphorylierung

Durch die Western-Blot-Analyse konnte auch die Aktivierung der Serin/Threoninkinase *mammalian Target of Rapamycin* (**mTOR**) nachgewiesen werden. Hierfür wurden spezifische Antikörper gegen Serin²⁴⁴⁸-phosphorylierte mTOR (pmTOR) und Gesamt-mTOR verwendet. Die Kinase mTOR wird durch die Serin²⁴⁴⁸-Phosphorylierung und anschließender Autophosphorylierung an Serin²⁴⁸¹ vollständig aktiviert (NAVÉ et al. 1999; PETERSON et al. 2000).

In den nicht transfizierten HepG2-Zellen steigerte die 15-minütige Insulinstimulation die mTOR-Phosphorylierung stärker als die Vorinkubation mit PGE₂ (Abb. 16). Diese Steigerungen waren jedoch nicht signifikant. In den HepG2-EP1-Zellen war die basale mTOR-Phosphorylierung gegenüber den anderen transfizierten Zelllinien und den untransfizierten Zellen erhöht. Hier steigerten weder Insulin noch PGE₂ die mTOR-Phosphorylierung. Die Vorinkubation mit PGE₂ mit nachfolgender Stimulation mit Insulin steigerte die mTOR-Phosphorylierung in den HepG2-EP1-Zellen, dies jedoch nicht signifikant.

In den HepG2-EP3β-Zellen steigerte Insulin die mTOR-Phosphorylierung signifikant um das Dreifache (Abb. 16). Die PGE₂-Vorinkubation aktivierte mTOR um das Doppelte gegenüber der Kontrolle. Diese Steigerung war signifikant, jedoch geringer als die insulinstimulierte Enzymaktivierung. Die Vorbehandlung der HepG2-EP3β-Zellen mit PGE₂ beeinflusste die insulinstimulierte mTOR-Phosphorylierung nicht. In den HepG2-EP4 Zellen aktivierte Insulin mTOR ebenfalls signifikant. Hier war die insulinstimulierte mTOR-Phosphorylierung doppelt so stark wie in der Kontrolle. Die Vorinkubation mit PGE₂ steigerte die mTOR-Phosphorylierung leicht und hemmte, ebenfalls nur leicht, die insulinstimulierte Phosphorylierung von mTOR, die dadurch nicht mehr signifikant unterschiedlich von der Kontrolle war.

4.2.4 Modulation der insulinabhängigen IRS-Phosphorylierung

Mittels der Western-Blot-Analyse war ebenfalls der Nachweis der Serinphosphorylierung des Insulinrezeptorsubstrates (**IRS**) möglich. Hierfür wurden spezifische Antikörper gegen Ser^{639/639}-phosphoryliertes IRS (pIRS) und Gesamt-IRS verwendet. Die IRS werden durch Tyrosinphosphorylierung des Insulinrezeptors phosphoryliert und somit aktiviert. Serinphosphorylierungen der IRS durch Serinkinasen blockieren die insulininduzierte Signalweiterleitung (siehe 1.1.6/1.3).

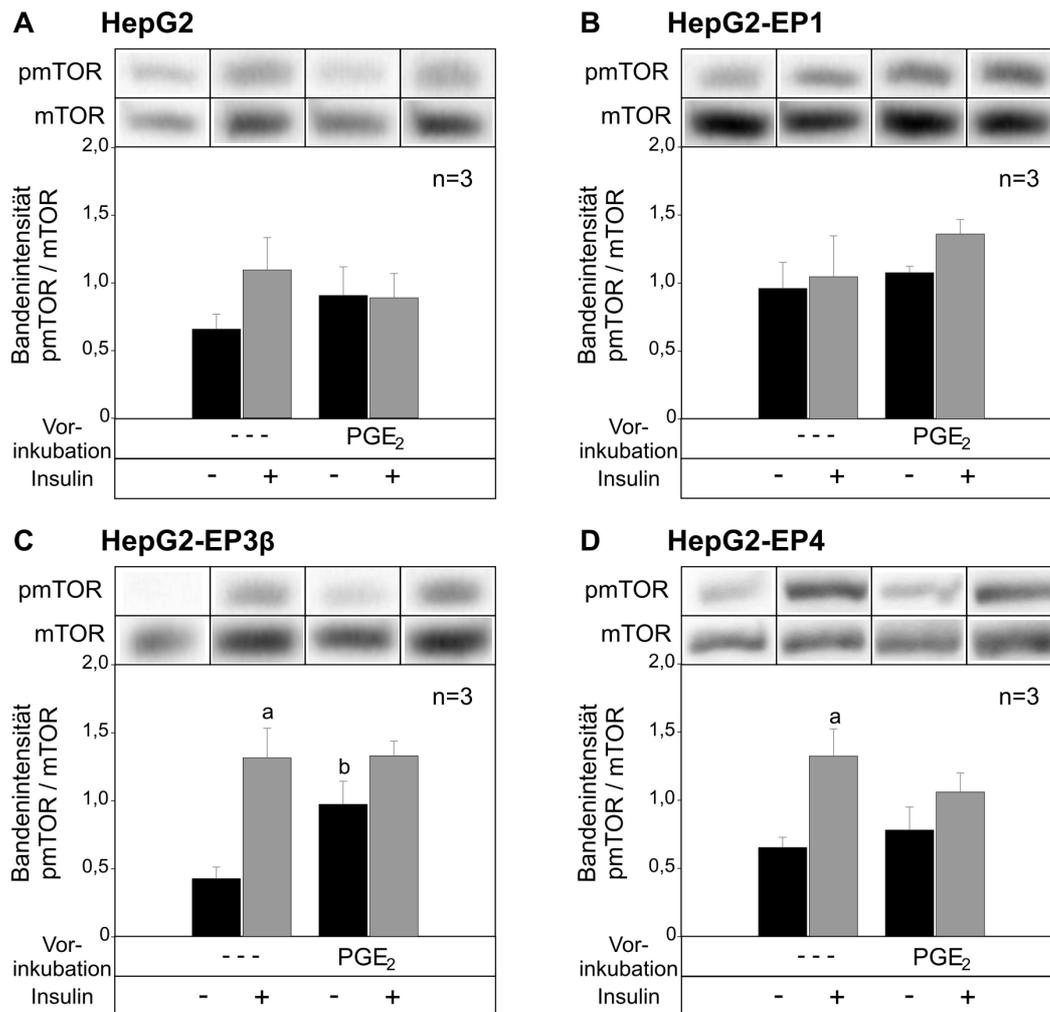


Abbildung 16: Modulation der insulinabhängigen Phosphorylierung von mTOR durch Vorinkubation mit PGE₂ in HepG2-Zellen

HepG2- (A), HepG2-EP1- (B), HepG2-EP3β- (C) und HepG2-EP4-Zellen (D) wurden wie unter 3.1.1 beschrieben kultiviert, mit PGE₂ (10 μM) für 330 min vorstimuliert und anschließend mit Insulin (10 nM) für 15 min stimuliert. Die Zellen wurden lysiert (siehe 3.9). Es wurden 60-80 μg Protein für die Western-Blot-Analyse eingesetzt (siehe 3.10). Der Erstantikörper war gegen pmTOR bzw. mTOR gerichtet. Der Zweitantikörper war HRP-konjugiert. Hierzu wurden jeweils drei unabhängige Experimente durchgeführt. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte ± SEM. a: signifikant versus ohne Insulinstimulation; b: signifikant versus ohne PGE₂-Vorinkubation; p < 0,05; Student's t-Test für gepaarte Stichproben. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Western-Blot.

Die 15-minütige Insulinstimulation steigerte in den nicht transfizierten HepG2-Zellen die IRS- Serinphosphorylierung signifikant (Abb. 17). Die PGE₂-Vorinkubation erhöhte die Serinphosphorylierung des IRS nicht und hatte keinen Einfluss auf die insulinstimulierte IRS-Serinphosphorylierung. In den HepG2-EP1-Zellen steigerte die alleinige Insulinstimulation die Serinphosphorylierung des IRS nicht. Die PGE₂-Vorinkubation dagegen verstärkte die IRS-Serinphosphorylierung signifikant um das Doppelte. Die anschließende Insulinstimulation steigerte die PGE₂-abhängige Serinphosphorylierung des IRS noch. In den HepG2-EP3β-Zellen erhöhten die Insulinstimulation und die PGE₂-Vorinkubation die

Serinphosphorylierung des IRS signifikant (3fach). Die anschließende Insulinstimulation hatte einen signifikanten additiven Effekt auf die PGE₂-abhängige IRS-Serinphosphorylierung (1,5fach). In den HepG2-EP4-Zellen steigerte die Insulinstimulation, wie auch die alleinige PGE₂-Vorinkubation, die Serinphosphorylierung des IRS ebenfalls signifikant. Die PGE₂-Vorinkubation verstärkte die insulinabhängige Serinphosphorylierung des IRS um das 1,5fache. Dieser additive Effekt war signifikant.

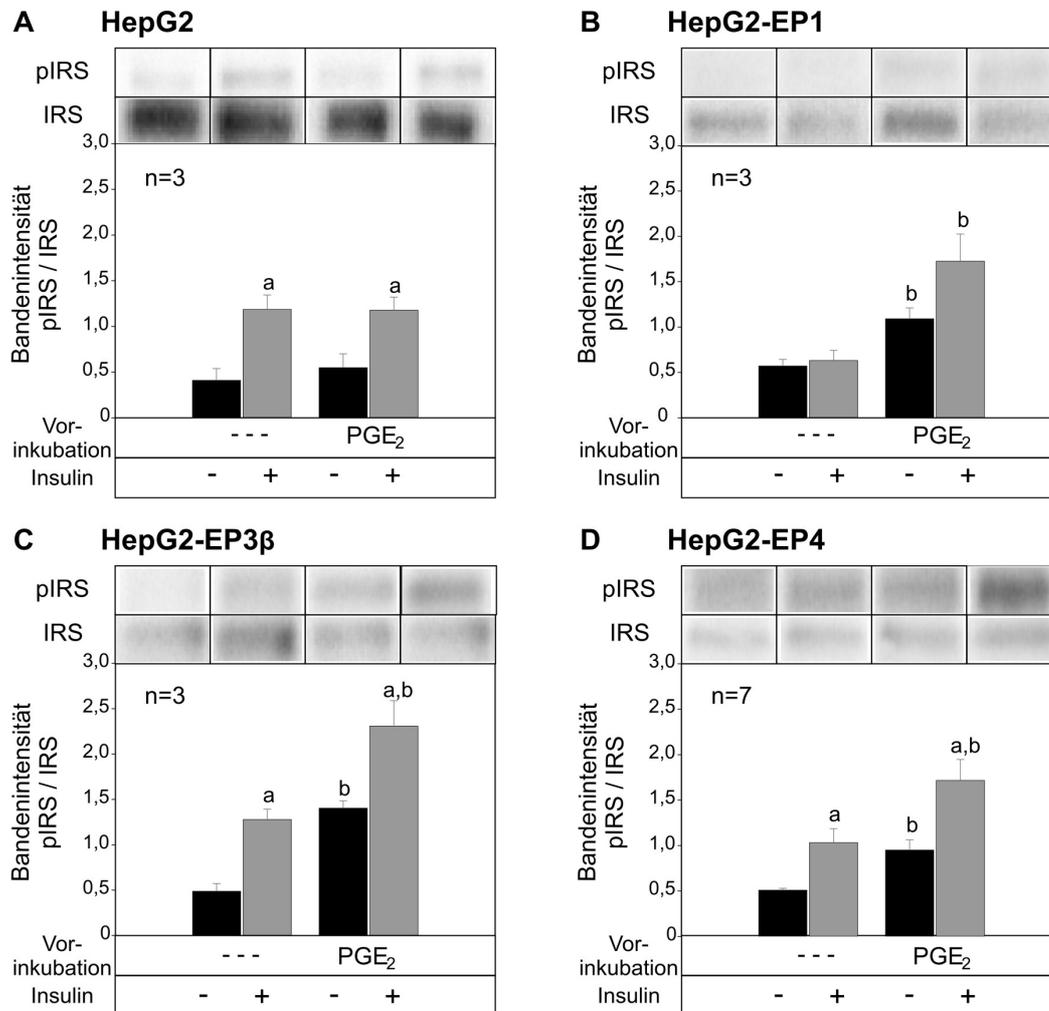


Abbildung 17: Modulation der insulinabhängigen Serinphosphorylierung von IRS durch Vorinkubation mit PGE₂ in HepG2-Zellen

HepG2- (A), HepG2-EP1- (B), HepG2-EP3β- (C) und HepG2-EP4-Zellen (D) wurden wie unter 3.1.1 beschrieben kultiviert, mit PGE₂ (10 μM) für 330 min vorstimuliert und anschließend mit Insulin (10 nM) für 15 min stimuliert. Die Zellen wurden lysiert (siehe 3.9). Es wurden jeweils 60-80 μg Protein für die Western-Blot-Analyse eingesetzt (siehe 3.10). Der Erstantikörper war gegen pIRS bzw. IRS gerichtet. Der Zweitantikörper war HRP-konjugiert. Hierzu wurde die in der Abbildung angegebene Anzahl unabhängiger Experimente durchgeführt. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte ± SEM. a: signifikant versus ohne Insulinstimulation; b: signifikant versus ohne PGE₂-Vorinkubation; p < 0,05; Student's t-Test für gepaarte Stichproben. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Western-Blot.

4.3 Modulation der Signalketten durch die Behandlung mit Inhibitoren in HepG2-Zellen

Zur Identifizierung der Signalwege, die an der PGE₂-abhängigen Modulation der primären Insulinsignalketten in HepG2-Zellen beteiligt sind, wurden die stabil transfizierten HepG2-Zellen HepG2-EP1, HepG2-EP3 β und HepG2-EP4 mit dem PKC-Inhibitor Bisindolylmaleimid X Hydrochlorid (BIM) sowie den MAPK Kinase Kinase/ERK Kinase (MEK)-Inhibitoren PD98059 (2'-Amino-3'-Methoxy-Flavon) und U0126 (1,4-Diamino-2,3-Dicyano-1,4-bis[2-Aminophenylthio]butadien) behandelt. Die untransfizierten HepG2-Zellen wurden nicht mit Inhibitoren behandelt, da die Vorbehandlung mit PGE₂ die Insulinsignalkette in diesen Zellen nicht beeinflusste. MEK1 und MEK2 werden durch Phosphorylierung an zwei Serinresten (Ser²¹⁷ und Ser²²¹) durch Raf-ähnliche Proteine aktiviert. MEK selbst aktiviert ERK1 durch Thr²⁰²- und Tyr²⁰⁴-Phosphorylierung und ERK2 durch Thr¹⁸⁵- und Tyr¹⁸⁷-Phosphorylierung (PEARSON et al. 2001).

PD98059 und U0126 sind zwar beide MEK-Inhibitoren, unterscheiden sich jedoch in ihrer Wirkungsweise. PD98059 bindet an die nicht phosphorylierte und somit inaktive Form von MEK1/2 und hemmt so die Phosphorylierung der den MAP-Kinasen vorgeschalteten Kinasen (DUDLEY et al. 1995). Die bereits phosphorylierte Kinase kann PD98059 jedoch nicht inhibieren (ALESSI et al. 1995). U0126 hemmt dagegen MEK1/2 unabhängig von deren Phosphorylierung und Aktivitätszustand – sowohl die inaktive, als auch die aktive Form. PD98059 hemmt MEK2 etwa zehnmal schwächer als MEK1. U0126 ist ein gegenüber PD98059 weitaus wirksamerer Inhibitor, er besitzt eine mindestens vierzigfach höhere Affinität zu MEK1/2 als PD98059 (FAVATA et al. 1998). Bei beiden Inhibitoren handelt es sich um hoch selektive, nicht-kompetitive Inhibitoren. Darüber hinaus vermag PD98059 die COX-1 und -2 zu hemmen, U0126 dagegen nicht (BÖRSCH-HAUBOLD et al. 1998).

Für die insulinabhängige Akt- und ERK1/2-Phosphorylierung wurde für die transfizierten HepG2-Zellen eine große Anzahl von Versuchen gemacht. Die Versuche mit Inhibitoren, zur Identifizierung der an der PGE₂-abhängigen Modulation beteiligten Signalketten, wurden in einer geringeren Anzahl durchgeführt. Hierbei ergibt sich ein Problem, das wahrscheinlich auf einen technischen Fehler bei der Western-Blot-Analyse zurückzuführen ist. Die PGE₂-vermittelte Hemmung der insulinstimulierten Akt-Phosphorylierung, die bei der großen Anzahl der Versuche in allen transfizierten HepG2-Zellen beobachtet wurde, konnte in den Versuchen mit den Inhibitoren (n=3 bzw. n=5) nicht immer reproduziert werden. Auch die insulinstimulierte Akt-Phosphorylierung selbst war in den Versuchen mit den Inhibitoren zum Teil deutlich schwächer als der Mittelwert aller Versuche.

4.3.1 HepG2-EP1-Zellen

Die insulinstimulierte, die PGE₂-abhängige sowie die Hemmung der insulinstimulierten Akt-Phosphorylierung durch PGE₂ wurde in den HepG2-EP1-Zellen weder durch die Behandlung mit dem Inhibitor BIM noch mit PD98059 beeinflusst (Abb. 18A). Die Vorinkubation mit PGE₂ steigerte in den DMSO-behandelten Kontrollzellen die ERK1/2-Phosphorylierung signifikant (Abb. 18B, Abb. 15B) BIM verringerte die ERK1/2-Phosphorylierung nach Vorinkubation mit PGE₂ signifikant. Die Behandlung der Zellen mit dem Inhibitor PD98059 hemmte die PGE₂-abhängige ERK1/2-Phosphorylierung um den Faktor 11 signifikant gegenüber den DMSO-behandelten Zellen.

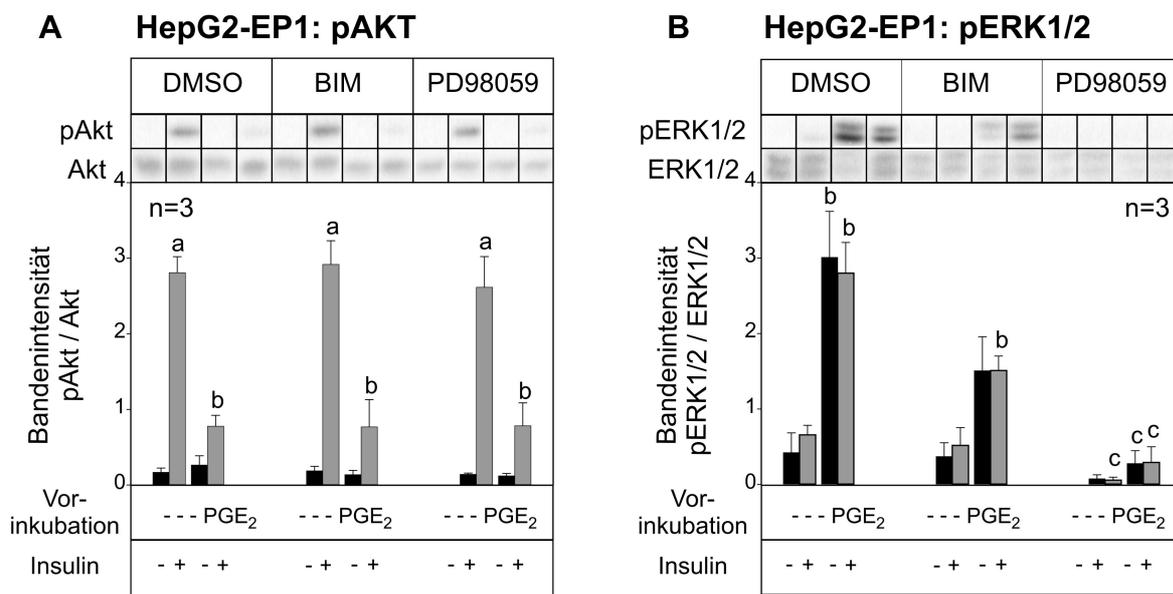


Abbildung 18: Modulation der insulinabhängigen Phosphorylierung von Akt und ERK1/2 in HepG2-EP1-Zellen durch die Behandlung mit BIM und PD98059

HepG2-EP1-Zellen wurden wie unter 3.1.1 beschrieben kultiviert, mit PGE₂ (10 µM) für 330 min vorstimuliert und anschließend mit Insulin (10 nM) für 15 min stimuliert. Gleichzeitig wurden die Zellen mit DMSO als Kontrolle, BIM (150 nM) oder PD98059 (50 µM) inkubiert. Die Zellen wurden lysiert (siehe 3.9) und es wurde jeweils 50 µg Protein für die Western-Blot-Analyse eingesetzt (siehe 3.10). Der Erstantikörper war gegen pAKT bzw. AKT (A), pERK1/2 bzw. ERK1/2 (B) gerichtet. Der Zweitantikörper war HRP-konjugiert. Hierzu wurden jeweils drei unabhängige Experimente durchgeführt. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm SEM. a: signifikant versus ohne Insulinstimulation; b: signifikant versus ohne PGE₂-Vorinkubation; c: signifikant versus jeweiliger Stimulus ohne Inhibitor; p < 0,05; Student's t-Test für gepaarte Stichproben. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Western-Blot.

HepG2-EP1-Zellen wurden darüber hinaus mit dem MEK-Inhibitor U0126 behandelt. Dies steigerte die insulinstimulierte Akt-Phosphorylierung signifikant um das Doppelte (Abb. 20A). Jedoch ist hier zu berücksichtigen, dass die insulinstimulierte Akt-Phosphorylierung in den DMSO-behandelten Kontrollzellen in diesen drei Versuchen schwächer war, als im Mittel aller Versuche (Abb. 13B). U0126 steigerte ebenfalls die insulinstimulierte Akt-Phosphorylierung nach Vorinkubation mit PGE₂ signifikant um den Faktor 3, wobei die PGE₂-Vorbehandlung in U0126-behandelten Zellen die insulinstimulierte Akt-Phosphorylierung immer noch hemmte. Allerdings war diese 2,6fache Hemmung deutlich geringer als in den DMSO-behandelten Zellen (3,5-fach). PGE₂ alleine hatte keinen Effekt auf die Akt-Phosphorylierung in den Kontroll- und den U0126-behandelten Zellen. Die Behandlung der Zellen mit U0126 hob die induzierte ERK1/2-Phosphorylierung unter allen Bedingungen fast vollständig auf (Abb. 19B). Dieser Effekt war wesentlich stärker als die durch PD98059 hervorgerufene Hemmung.

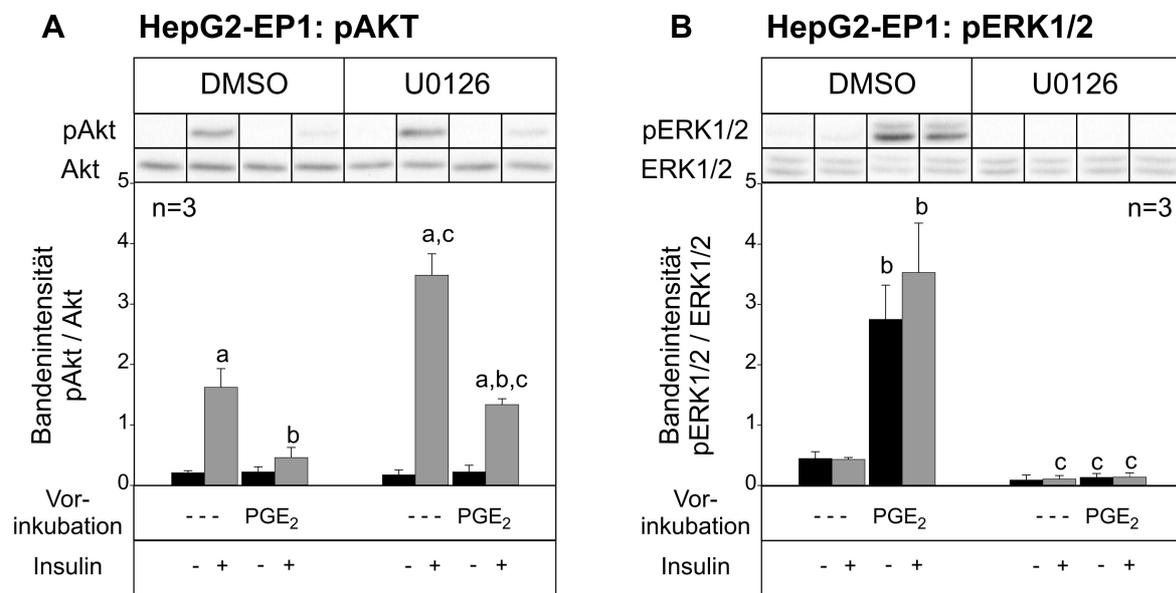


Abbildung 19: Modulation der insulinabhängigen Phosphorylierung von Akt und ERK1/2 durch die Behandlung mit U0126 in HepG2-EP1-Zellen

HepG2-EP1-Zellen wurden wie unter 3.1.1 beschrieben kultiviert, mit PGE₂ (10 µM) für 330 min vorstimuliert und anschließend mit Insulin (10 nM) für 15 min stimuliert. Gleichzeitig wurden die Zellen mit DMSO als Kontrolle und U0126 (50 µM) inkubiert. Die Zellen wurden lysiert (siehe 3.9) und es wurden jeweils 50 µg Protein für die Western-Blot-Analyse eingesetzt (siehe 3.10). Der Erstantikörper war gegen pAKT bzw. AKT (A), pERK1/2 bzw. ERK1/2 (B) gerichtet. Der Zweitantikörper war HRP-konjugiert. Hierzu wurden jeweils drei unabhängige Experimente durchgeführt. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte ± SEM. a: signifikant versus ohne Insulinstimulation; b: signifikant versus ohne PGE₂-Vorinkubation; c: signifikant versus jeweiliger Stimulus ohne Inhibitor; p < 0,05; Student's t-Test für gepaarte Stichproben. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Western-Blot.

4.3.2 HepG2-EP3 β -Zellen

Die Behandlung der HepG2-EP3 β -Zellen mit den Inhibitoren BIM und PD98059 beeinflusste die insulinstimulierte Akt-Phosphorylierung nicht signifikant (Abb. 20A), tendenziell kam es zu einer leichten Steigerung. Wie auch im Mittel aller Versuche steigerte die alleinige PGE₂-Vorinkubation die Akt-Phosphorylierung in diesen drei Versuchen nicht. Die Inhibitoren hatten keinen Effekt auf die PGE₂-abhängige Hemmung der insulinstimulierten Akt-Phosphorylierung. Die Vorinkubation mit PGE₂ allein steigerte die ERK1/2-Phosphorylierung (Abb. 20B, 15C). BIM veränderte in HepG2-EP3 β -Zellen die insulin- und PGE₂-abhängige ERK1/2-Phosphorylierung nicht signifikant. Die Behandlung der Zellen mit PD98059 erniedrigte sowohl die insulinstimulierte als auch die PGE₂-abhängige ERK1/2-Phosphorylierung signifikant.

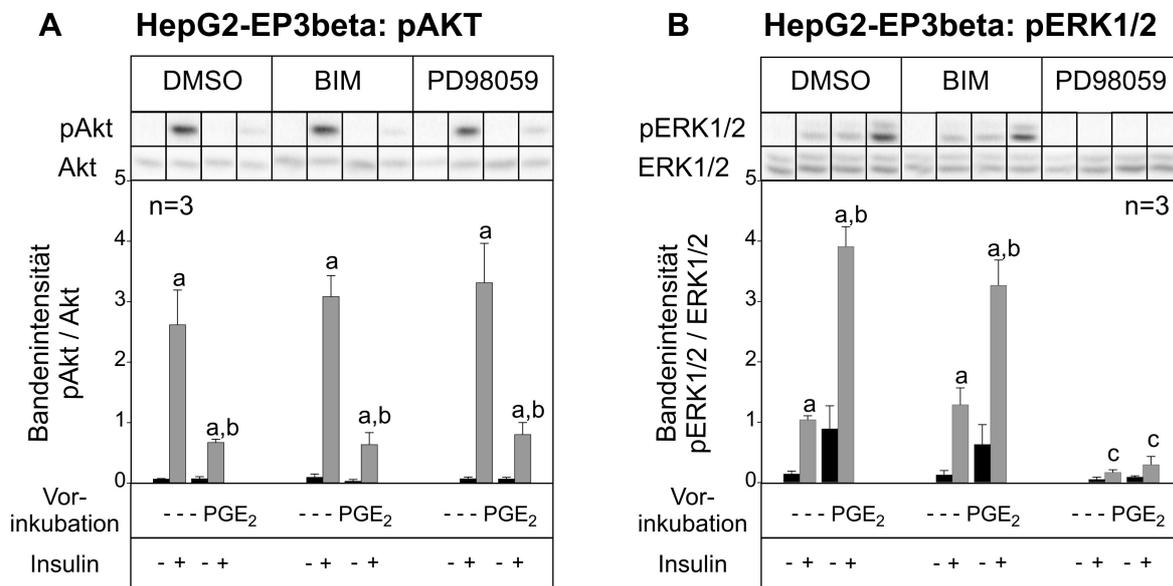


Abbildung 20: Modulation der insulinabhängigen Phosphorylierung von Akt und ERK1/2 in HepG2-EP3 β -Zellen durch die Behandlung mit BIM und PD98059

HepG2-EP3 β -Zellen wurden wie unter 3.1.1 beschrieben kultiviert, mit PGE₂ (10 μ M) für 330 min vorstimuliert und anschließend mit Insulin (10 nM) für 15 min stimuliert. Gleichzeitig wurden die Zellen mit DMSO als Kontrolle, BIM (150 nM) oder PD98059 (50 μ M) inkubiert. Die Zellen wurden lysiert (siehe 3.9) und es wurden jeweils 50 μ g Protein für die Western-Blot-Analyse eingesetzt (siehe 3.10). Der Erstantikörper war gegen pAKT bzw. AKT (A), pERK1/2 bzw. ERK1/2 (B) gerichtet. Der Zweitantikörper war HRP-konjugiert. Hierzu wurden jeweils drei unabhängige Experimente durchgeführt. Die gezeigte Werte sind Mittelwerte \pm SEM. a: signifikant versus ohne Insulinstimulation; b: signifikant versus ohne PGE₂-Vorinkubation; c: signifikant versus jeweiliger Stimulus ohne Inhibitor; p < 0,05; Student's t-Test für gepaarte Stichproben. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Western-Blot.

Auch die HepG2-EP3 β -Zellen wurden mit dem MEK-Inhibitor U0126 behandelt. Die Inkubation der Zellen mit U0126 hob die PGE₂-vermittelte Hemmung der insulin-stimulierten Akt-Phosphorylierung praktisch vollständig auf (Abb. 21A). Wie auch in den HepG2-EP1-Zellen hemmte die Behandlung der Zellen mit U0126 sowohl die basale als auch die induzierte ERK1/2-Phosphorylierung fast komplett (Abb. 21B).

4.3.3 HepG2-EP4-Zellen

Die Betrachtung der Ergebnisse, in denen die Wirkung der Inhibitoren untersucht wurde, ist in den HepG2-EP4-Zellen problematisch (siehe 4.3). Im Gegensatz zur Gesamtzahl aller Versuche (n=18), hemmte die Vorinkubation mit PGE₂ in diesen fünf Versuchen die insulinstimulierte Akt-Phosphorylierung nicht. Daher kann die Aufhebung oder Verstärkung der PGE₂-vermittelten Hemmung der insulinstimulierten Akt-Phosphorylierung nicht eindeutig auf die durch die Inhibitoren beeinflussten Zielstrukturen zurückgeführt werden.

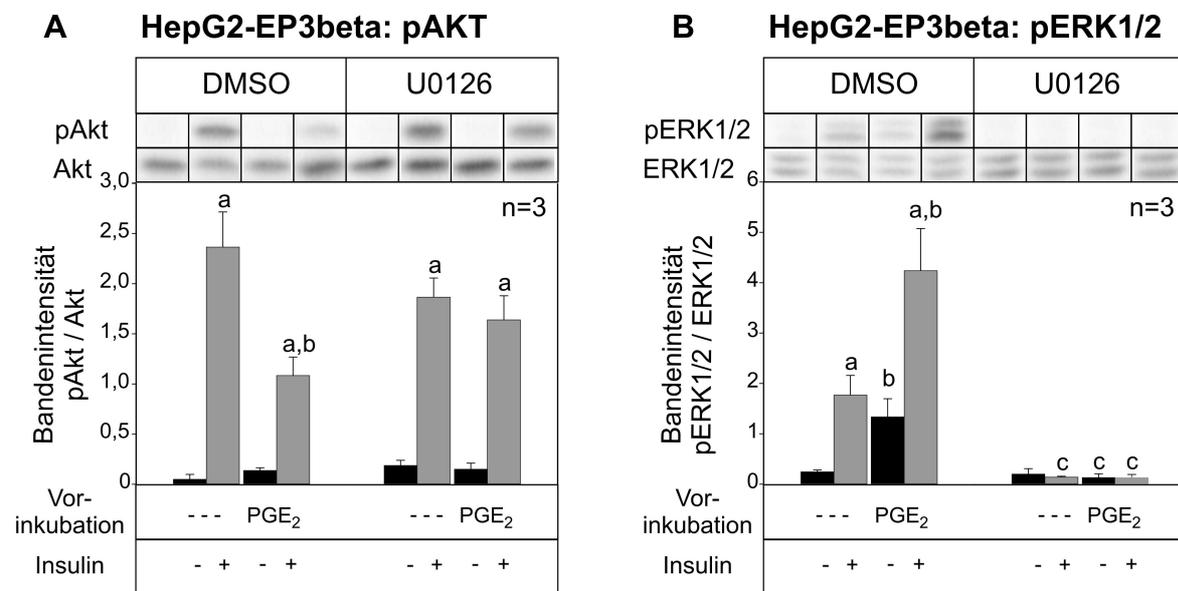


Abbildung 21: Modulation der insulinabhängigen Phosphorylierung von Akt und ERK1/2 durch die Behandlung mit U0126 in HepG2-EP3 β -Zellen

HepG2-EP3 β -Zellen wurden wie unter 3.1.1 beschrieben kultiviert, mit PGE₂ (10 μ M) für 330 min vorstimuliert und anschließend mit Insulin (10 nM) für 15 min stimuliert. Gleichzeitig wurden die Zellen mit DMSO als Kontrolle und U0126 (50 μ M) inkubiert. Die Zellen wurden lysiert (siehe 3.9) und es wurden jeweils 50 μ g Protein für die Western-Blot-Analyse eingesetzt (siehe 3.10). Der Erstantikörper war gegen pAKT bzw. AKT (A), pERK1/2 bzw. ERK1/2 (B) gerichtet. Der Zweitantikörper war HRP-konjugiert. Hierzu wurden jeweils drei unabhängige Experimente durchgeführt. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm SEM. a: signifikant versus ohne Insulinstimulation; b: signifikant versus ohne PGE₂-Vorinkubation; c: signifikant versus jeweiliger Stimulus ohne Inhibitor; p < 0,05; Student's t-Test für gepaarte Stichproben. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Western-Blot.

Die Behandlung der HepG2-EP4-Zellen mit dem Inhibitor BIM steigerte die insulinstimulierte Akt-Phosphorylierung um den Faktor 1,5 (Abb. 22A). Dies war jedoch nicht signifikant. Die Behandlung der Zellen mit dem Inhibitor PD98059 dagegen steigerte die insulinstimulierte Akt-Phosphorylierung signifikant um das Vierfache. Die PGE₂-Vorinkubation hemmte nur in den mit PD98059-behandelten Zellen die insulinstimulierte Akt-Phosphorylierung.

Die signifikante Steigerung der PGE₂-abhängigen ERK1/2-Phosphorylierung der Gesamtzahl aller Versuche (Abb. 15D) konnte nicht in den DMSO-behandelten Zellen, sondern nur in den BIM-behandelten Zellen reproduziert werden (Abb. 22B). Ebenso wie in den anderen HepG2-Zelllinien verringerte die Behandlung der HepG2-EP4-Zellen mit PD98059 sowohl die insulinstimulierte als auch die PGE₂-abhängige ERK1/2-Phosphorylierung signifikant.

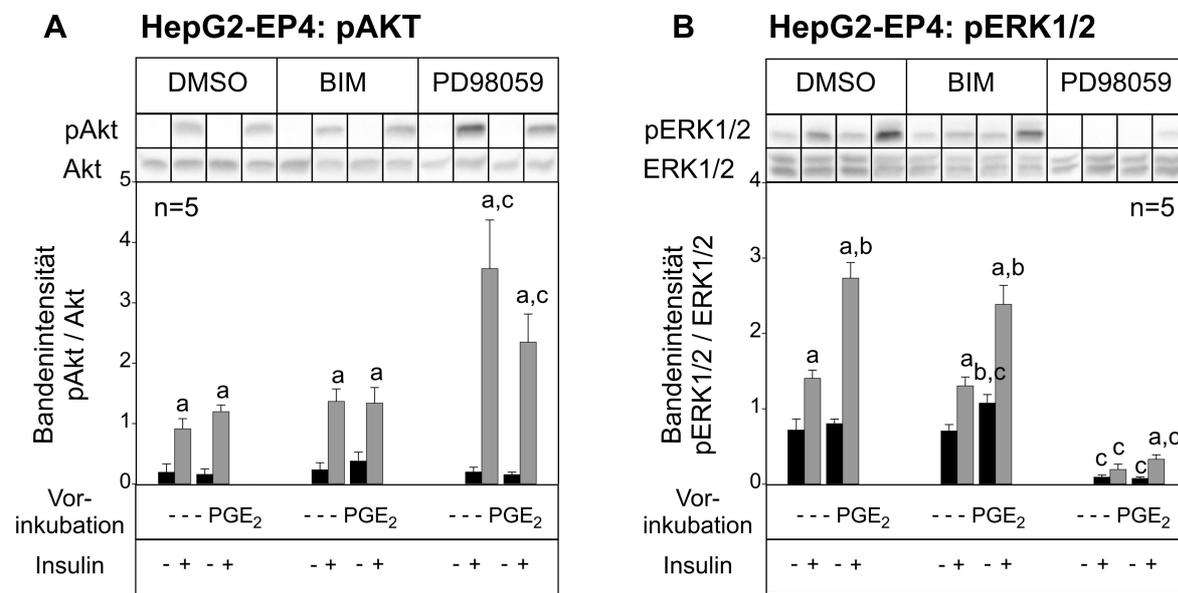


Abbildung 22: Modulation der insulinabhängigen Phosphorylierung von Akt und ERK1/2 in HepG2-EP4-Zellen durch die Behandlung mit BIM und PD98059

HepG2-EP4-Zellen wurden wie unter 3.1.1 beschrieben kultiviert, mit PGE₂ (10 µM) für 330 min vorstimuliert und anschließend mit Insulin (10 nM) für 15 min stimuliert. Gleichzeitig wurden die Zellen mit DMSO als Kontrolle, BIM (150 nM) oder PD98059 (50 µM) inkubiert. Die Zellen wurden lysiert (siehe 3.9) und es wurden jeweils 50 µg Protein für die Western-Blot-Analyse eingesetzt (siehe 3.10). Der Erstantikörper war gegen pAKT bzw. AKT (A), pERK1/2 bzw. ERK1/2 (B) gerichtet. Der Zweitantikörper war HRP-konjugiert. Hierzu wurden jeweils fünf unabhängige Experimente durchgeführt. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm SEM. a: signifikant versus ohne Insulinstimulation; b: signifikant versus ohne PGE₂-Vorinkubation; c: signifikant versus jeweiliger Stimulus ohne Inhibitor; $p < 0,05$; Student's t-Test für gepaarte Stichproben. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Western-Blot.

Die Behandlung der HepG2-EP4-Zellen mit dem Inhibitor U0126 hemmte die insulinstimulierte Phosphorylierung von Akt leicht, jedoch nicht signifikant (Abb. 23A). Die insulinstimulierte Akt-Phosphorylierung nach Vorinkubation mit PGE₂ wurde ebenfalls leicht gehemmt. Die signifikante Hemmung der insulinstimulierten Akt-Phosphorylierung durch PGE₂ der Gesamtheit aller Versuche (Abb. 13D) konnte in diesen drei Versuchen in den DMSO-behandelten Zellen nicht reproduziert werden.

Die Vorinkubation mit PGE₂ steigerte die insulinstimulierte ERK1/2-Phosphorylierung (Abb. 23B). Im Gegensatz zur Gesamtzahl aller Versuche (Abb. 15D) war dies in diesen drei Versuchen jedoch nicht signifikant, es war aber ein Trend zu erkennen ($p < 0,1$). Die Behandlung der Zellen mit dem MEK-Inhibitor U0126 hemmte die ERK1/2-Phosphorylierung in den HepG2-EP4-Zellen unabhängig von der Insulin- bzw. PGE₂-Behandlung fast vollständig und signifikant.

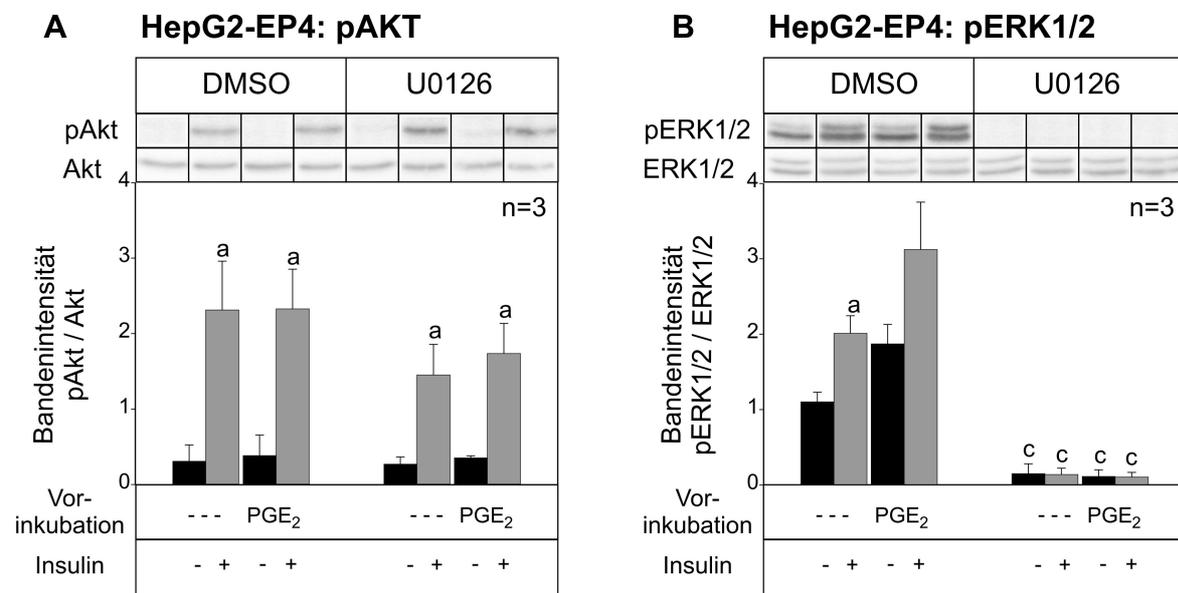


Abbildung 23: Modulation der insulinabhängigen Phosphorylierung von Akt und ERK1/2 durch die Behandlung mit U0126 in HepG2-EP4-Zellen

HepG2-EP4-Zellen wurden wie unter 3.1.1 beschrieben kultiviert, mit PGE₂ (10 µM) für 330 min vorstimuliert und anschließend mit Insulin (10 nM) für 15 min stimuliert. Gleichzeitig wurden die Zellen mit DMSO als Kontrolle und U0126 (50 µM) inkubiert. Die Zellen wurden lysiert (siehe 3.9) und es wurden jeweils 50 µg Protein für die Western-Blot-Analyse eingesetzt (siehe 3.10). Der Erstantikörper war gegen pAKT bzw. AKT (A), pERK1/2 bzw. ERK1/2 (B) gerichtet. Der Zweitantikörper war HRP-konjugiert. Hierzu wurden jeweils drei unabhängige Experimente durchgeführt. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm SEM. a: signifikant versus ohne Insulinstimulation; b: signifikant versus ohne PGE₂-Vorinkubation; c: signifikant versus jeweiliger Stimulus ohne Inhibitor; $p < 0,05$; Student's t-Test für gepaarte Stichproben. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Western-Blot.

4.4 Fh-hTert-Zellen

4.4.1 Modulation der Insulinsignalketten durch die Vorinkubation mit PGE₂

Die 15-minütige Insulinstimulation erhöhte die **Akt**-Phosphorylierung in den Fh-hTert-Zellen signifikant um das 2,5fache (Abb. 24A). Die Vorbehandlung der Zellen mit PGE₂ alleine steigerte die Phosphorylierung von Akt nicht. Jedoch verringerte die PGE₂-Vorinkubation die insulinstimulierte Akt-Phosphorylierung signifikant um die Hälfte.

Insulin steigerte in Fh-hTert-Zellen die **ERK1/2**-Phosphorylierung signifikant um das 1,5fache (Abb. 24B). Im Gegensatz zu allen anderen PGE₂-Rezeptor-exprimierenden hepatischen Zellen, hemmte die Vorbehandlung der Zellen mit PGE₂ die ERK1/2-Phosphorylierung signifikant um den Faktor 1,7. Die anschließende 15-minütige Insulinstimulation hob die PGE₂-abhängige Hemmung der ERK1/2-Phosphorylierung wieder etwas auf. Jedoch war die PGE₂-abhängige Hemmung der insulinstimulierten ERK1/2-Phosphorylierung gegenüber der alleinigen Insulingabe signifikant um die Hälfte verringert.

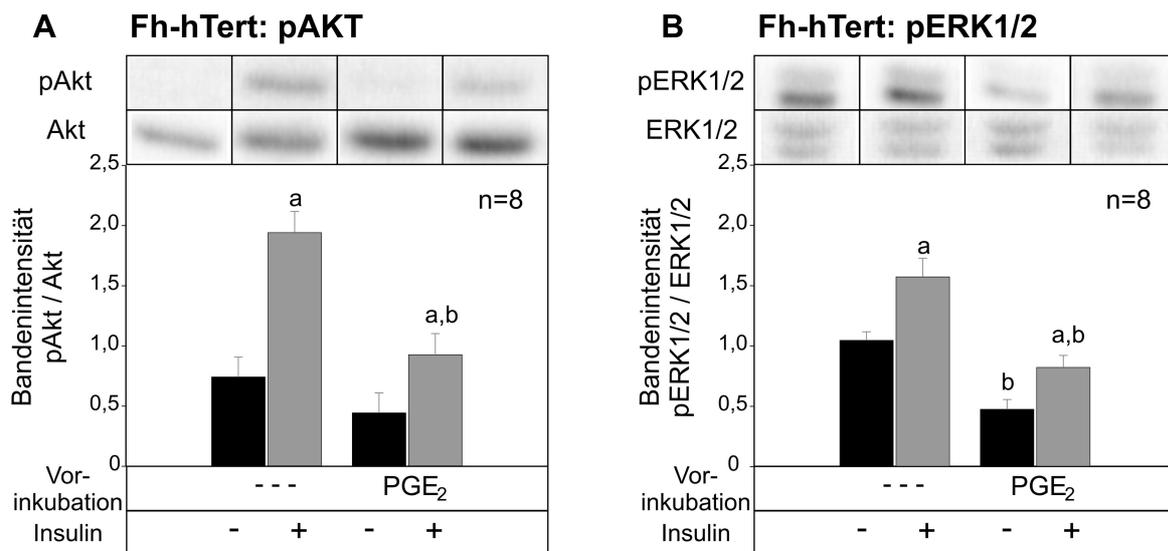


Abbildung 24: Modulation der insulinabhängigen Phosphorylierung von Akt und ERK1/2 in Fh-hTert-Zellen

Fh-hTert-Zellen wurden wie unter 3.1.2 beschrieben kultiviert, mit PGE₂ (10 μ M) für 330 min vorstimuliert und anschließend mit Insulin (10 nM) für 15 min stimuliert. Die Zellen wurden lysiert (siehe 3.9) und es wurden jeweils 40 μ g Protein für die Western-Blot-Analyse eingesetzt (siehe 3.10). Der Erstantikörper war gegen pAKT bzw. AKT (A), pERK1/2 bzw. ERK1/2 (B) gerichtet. Der Zweitantikörper war HRP-konjugiert. Hierzu wurden jeweils acht unabhängige Experimente durchgeführt. Die gezeigte Werte sind Mittelwerte \pm SEM. a: signifikant versus ohne Insulinstimulation; b: signifikant versus ohne PGE₂-Vorinkubation; p < 0,05; Student's t-Test für gepaarte Stichproben. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Western-Blot.

4.4.2 Modulation der Signalketten durch die Behandlung mit Inhibitoren

Fh-hTert-Zellen wurden nicht im Rahmen der vorliegenden Arbeit, aber innerhalb der Arbeitsgruppe mit dem Inhibitor PD98059 behandelt. Wie in den HepG2-EP4-Zellen steigerte PD98059 die insulinstimulierte Akt-Phosphorylierung signifikant (Abb. 25A). Im Gegensatz zu den transfizierten HepG2-Zelllinien war in den Fh-hTert-Zellen durch die Behandlung mit PD98059 weder die insulinstimulierte noch die PGE₂-abhängige ERK1/2-Phosphorylierung signifikant verringert (Abb. 25B).

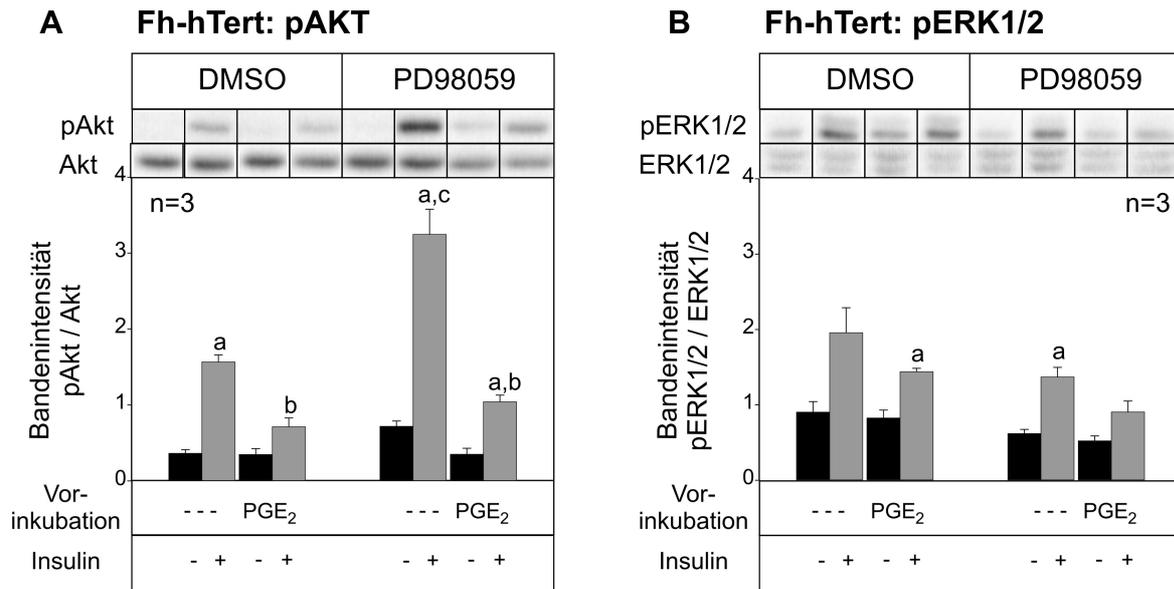


Abbildung 25: Modulation der insulinabhängigen Phosphorylierung von Akt und ERK1/2 in Fh-hTert-Zellen durch die Behandlung mit PD98059

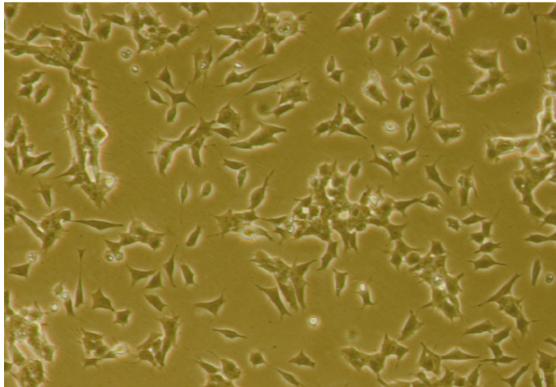
Fh-hTert-Zellen wurden wie unter 3.1.2 beschrieben kultiviert, mit PGE₂ (10 µM) für 330 min vorstimuliert und anschließend mit Insulin (10 nM) für 15 min stimuliert. Gleichzeitig wurden die Zellen mit DMSO als Kontrolle, oder PD98059 (50 µM) inkubiert. Die Zellen wurden lysiert (siehe 3.9) und es wurden jeweils 40 µg Protein für die Western-Blot-Analyse eingesetzt (siehe 3.10). Der Erstantikörper war gegen pAKT bzw. AKT (A), pERK1/2 bzw. ERK1/2 (B) gerichtet. Der Zweitantikörper war HRP-konjugiert. Hierzu wurden jeweils drei unabhängige Experimente durchgeführt. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte ± SEM. a: signifikant versus ohne Insulinstimulation; b: signifikant versus ohne PGE₂-Vorinkubation; p < 0,05; Student's t-Test für gepaarte Stichproben. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Western-Blot.

4.5 SH-SY5Y-Zellen

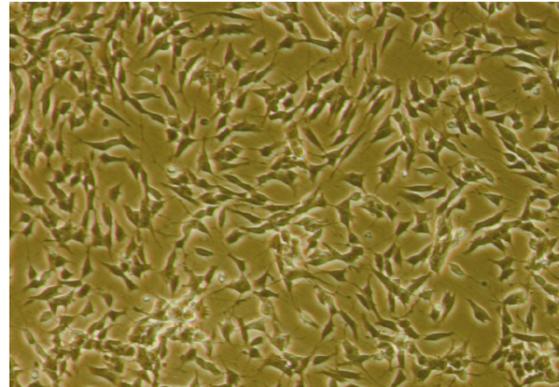
4.5.1 Charakterisierung der SH-SY5Y-Zellen

Durch die Behandlung der SH-SY5Y-Zellen mit Retinsäure differenzieren N-Typ Zellen zu einem neuronalen Phänotyp aus (siehe 3.1.3.3). Die damit einhergehende Ausbildung von Neuriten (PAHLMAN et al. 1984) konnte mikroskopisch beobachtet werden. In undifferenzierten Zellen bildeten sich keine Neuriten aus (Abb. 26A). In den mit Retinsäure behandelten Zellen dagegen konnte die Ausbildung von Axonen und Dendriten gezeigt werden (Abb. 26B-D). Diese sind für die für neuronale Zellen charakteristische Netzwerkbildung verantwortlich, welche in den D7-differenzierten Zellen deutlich zu erkennen war.

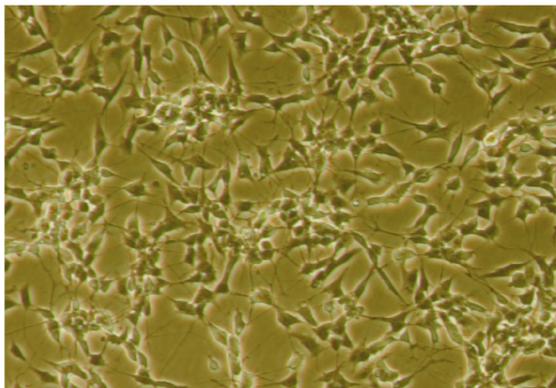
A undifferenziert: SH



B ausdifferenziert: D2



C ausdifferenziert: D5



D ausdifferenziert: D7

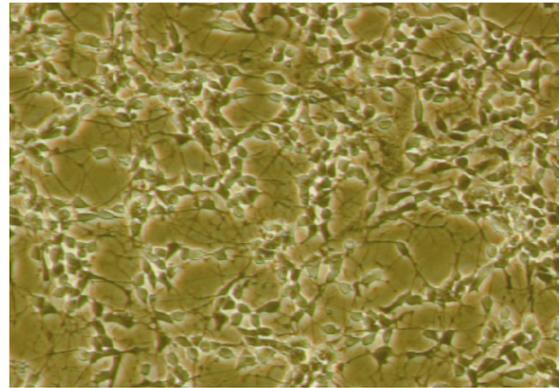


Abbildung 26: Kultur der neuronalen SH-SY5Y-Zellen

SH-SY5Y-Zellen wurden wie unter 3.1.3 beschrieben kultiviert. Zum Ausbilden von neuroneneigenschaften wurden die Zellen mit Retinsäure (10 μ M) ausdifferenziert. Im Gegensatz zu den undifferenzierten Zellen (Abb. 26A) kam es durch die Behandlung der Zellen mit Retinsäure zur Ausbildung von Neuriten (Abb. 26B-D).

Neurotrophine sind endogene Signalstoffe, die das Überleben, die Reifung sowie die Funktion von Neuronen regulieren. Der *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) ist einer von fünf Neurotrophinen, der über die Bindung an die membranständige Tyrosinkinase B (TrkB) einen antiapoptotischen Effekt auf neuronale Zellen ausübt. Neurotrophin-Rezeptoren werden in Abhängigkeit vom Differenzierungsstand verstärkt exprimiert. TrkB diente in der vorliegenden Arbeit als neuronaler Nachweis für die ausdifferenzierten SH-SY5Y-Zellen. In Übereinstimmung mit KAPLAN et al. (1993) wurde gezeigt werden, dass Retinsäure die Expression der TrkB in SH-SY5Y-Zellen bereits an Tag 2 induziert (Abb. 27A).

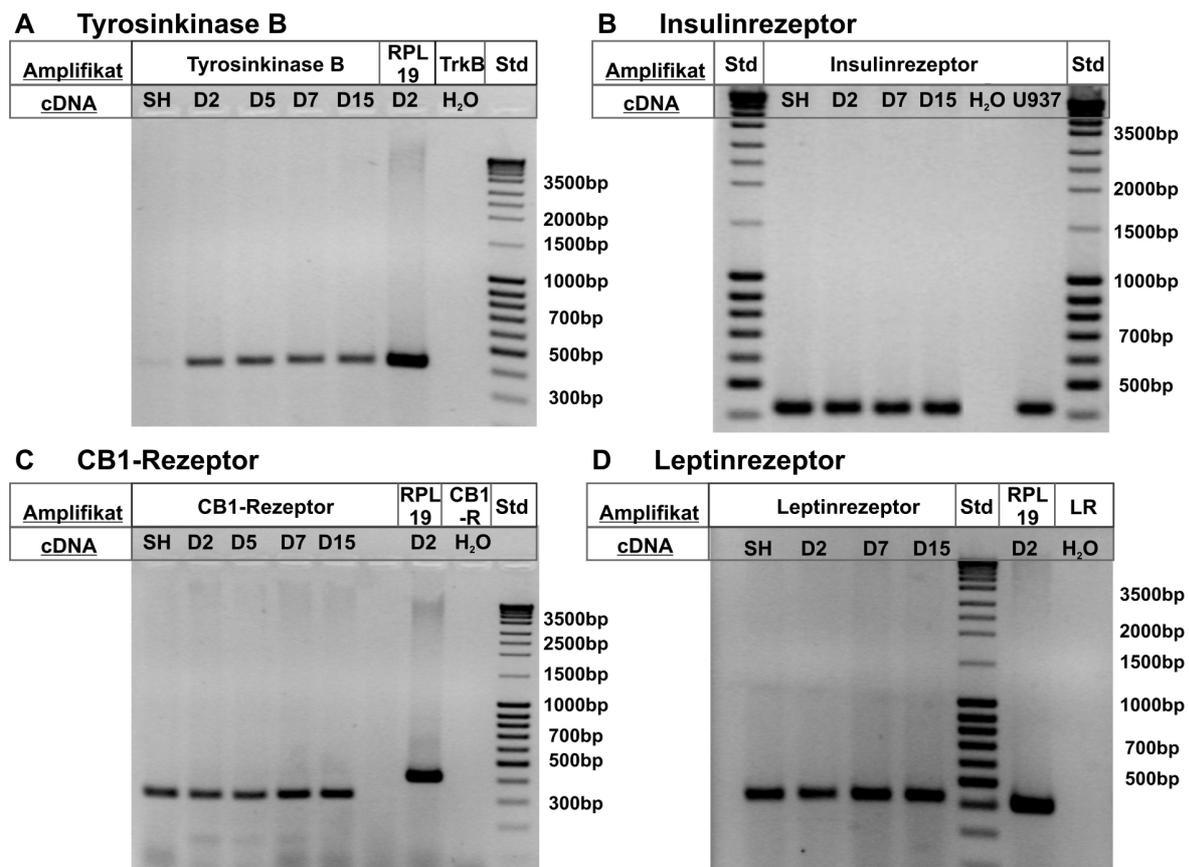


Abbildung 27: Charakterisierung der SH-SY5Y-Zellen

Die SH-SY5Y-Zellen wurden wie unter 3.1.3 beschrieben kultiviert. Für die RNA-Isolierung (siehe 3.5) wurden undifferenzierte Zellen (SH) sowie mit Retinsäure ausdifferenzierte Zellen (D2, D5, D7, D15) verwendet (siehe 3.1.3.3). Die unterschiedlich ausdifferenzierten Zellen wurden mittels semiquantitativer RT-PCR (siehe 3.6.4) auf die Genexpression der Tyrosinkinase B (A) als neuronalen Marker, sowie auf die Genexpression des Insulinrezeptors (B), des CB1-R (C) und des Leptinrezeptors (D) getestet. Die Genexpression von RPL19 einer Probe wurde mitgeführt, um für den Fall eines negativen PCR-Ergebnisses bei den untersuchten Genen einen Anhaltspunkt dafür zu haben, dass die RNA-Isolierung und die Reverse Transkription erfolgreich waren. U937-Zellen wurden in (B) eingesetzt, um zu prüfen, ob die PCR für den Insulinrezeptor erfolgreich war.

Da in den SH-SY5Y-Zellen vor allem der Insulinsignalweg untersucht werden sollte, wurde zuerst die Genexpression des Insulinrezeptors geprüft. Die SH-SY5Y-Zellen exprimierten endogen den Insulinrezeptor in undifferenziertem sowie in differenziertem Zustand (Abb. 27B). Darüber hinaus wurde die mRNA für den CB1-R in undifferenzierten und in Retinsäure-differenzierten Zellen nachgewiesen (Abb. 27C). Die mRNA für die lange Form des Leptinrezeptors (Ob-Rb) wurde ebenfalls in undifferenzierten und differenzierten SH-SY5Y-Zellen exprimiert (Abb. 27D).

4.5.2 Quantifizierung der PGE₂-Rezeptoren

Die Genexpression der vier verschiedenen PGE₂-Rezeptoren (EP1-4) wurde in undifferenzierten sowie in differenzierten (D2, D5, D7, D15) SH-SY5Y-Zellen mittels quantitativer *Real-Time*-PCR bestimmt (Abb. 28).

Das Gen für den EP1-Rezeptor war in den SH-SY5Y-Zellen sehr gering exprimiert. Die undifferenzierten SH-SY5Y-Zellen exprimierten am stärksten den EP2-Rezeptor, was auch HOSHINO et al. (2007) in ihrer Arbeit zeigen konnten. Dies gilt auch für die differenzierten Zellen, außer den D2-differenzierten Zellen, die insgesamt die geringste EP-Rezeptorexpression aufwiesen. Durch die Ausdifferenzierung mit Retinsäure schienen der EP3- und der EP4-Rezeptor in den D2- bis D7-differenzierten Zellen herunterreguliert zu werden. Dagegen wiesen die D15-differenzierten Zellen die höchste EP3-Rezeptorexpression auf. Der EP4-Rezeptor wurde nach fortlaufender Behandlung mit Retinsäure in den D15-differenzierten Zellen wieder verstärkt exprimiert.

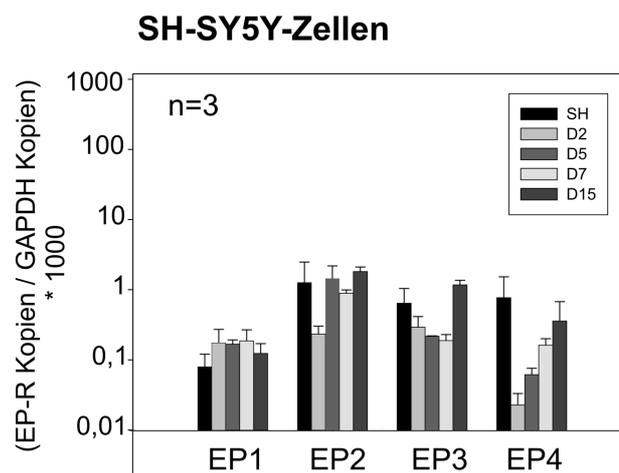


Abbildung 28: Quantifizierung der PGE₂-Rezeptoren in SH-SY5Y-Zellen

Die SH-SY5Y-Zellen wurden wie unter 3.1.3 beschrieben kultiviert. Die RNA wurde isoliert (siehe 3.5) und die mRNA-Kopienzahl für die PGE₂-Rezeptoren und GAPDH anhand von Eichgeraden mit entsprechenden Plasmid-DNA's quantifiziert (siehe 3.6.5). Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Versuchen in Dreifachbestimmung. SH = undifferenzierte Zellen; D2-15 = mit Retinsäure ausdifferenzierte Zellen.

SH-SY5Y-Zellen wurden stabil mit dem EP3 β -Rezeptor mit einer modifizierten Calcium-Phosphat-Methode transfiziert (3.2). Obwohl die Transfektionsrate der Zellen sehr gering war, konnte eine SH-SY5Y-EP3 β -Rezeptorzelllinie generiert werden. Jedoch war die Wachstumsrate der Zellen so gering, dass die Zelllinie für weitere Untersuchungen nicht verwendet werden konnte.

4.5.3 Kinetik und Dosiswirkungskurve der insulinabhängigen Akt-Phosphorylierung

Zur Ermittlung der geeigneten Inkubationszeit wurde für die SH-SY5Y-Zellen die Kinetik der insulinabhängigen Akt-Phosphorylierung untersucht. Nach 15- und 30-minütiger Inkubation der Zellen mit Insulin (10 nM) war die Phosphorylierung von Akt unabhängig vom Differenzierungsgrad maximal (Abb. 29A). Als geeignete Inkubationszeit für die Zellversuche mit den SH-SY5Y-Zellen wurden 15 min gewählt. In nicht mit Insulin behandelten Zellen (Kontrollen) wurde das Enzym nicht aktiviert.

Um die geeignete Insulinkonzentration zu ermitteln, wurden die Zellen für 15 min mit unterschiedlichen Insulinkonzentrationen (0 nM – 100 nM) stimuliert (Abb. 29B). Die insulinstimulierte Phosphorylierung von Akt war bei einer Konzentration von 100 nM am stärksten. Für die Zellversuche wurden 10 nM als geeignete Insulinkonzentration gewählt.

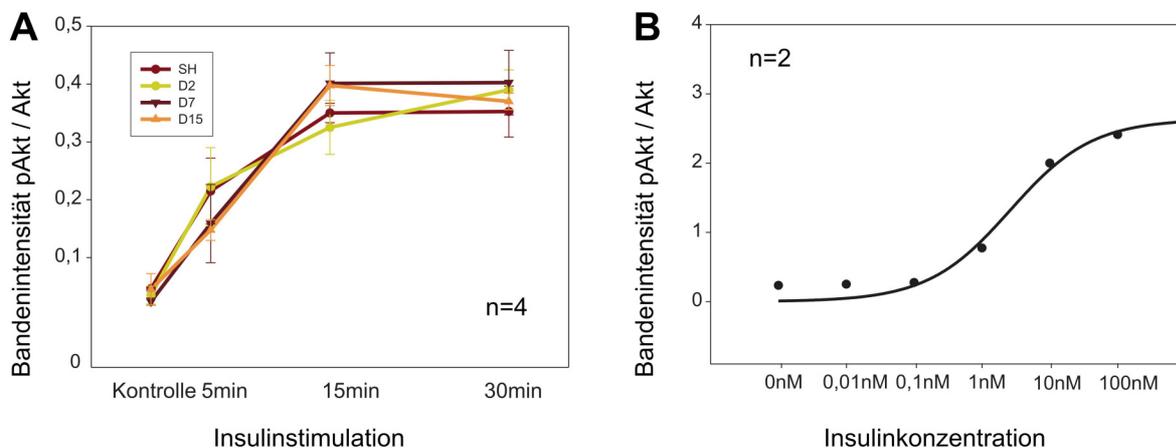


Abbildung 29: Kinetik und Dosiswirkungskurve der insulinabhängigen Akt-Phosphorylierung in SH-SY5Y-Zellen

Die SH-SY5Y-Zellen wurden wie unter 3.1.3 beschrieben kultiviert und für die Kinetik der insulinabhängigen Akt-Phosphorylierung (A) für 5, 15 und 30 min mit Insulin (10 nM) stimuliert. Die Zellen wurden lysiert und es wurden jeweils 30 μ g Protein für die Western-Blot-Analyse eingesetzt (siehe 3.10). Der Erstantikörper war gegen pAkt bzw. Akt gerichtet. Der Zweitantikörper war HRP-konjugiert. Hierzu wurden vier unabhängige Experimente durchgeführt. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm SEM. Für die Dosiswirkungskurve der insulinabhängigen Akt-Phosphorylierung (B) wurden die Zellen mit unterschiedlichen Insulinkonzentrationen (0 nM - 100 nM) für 15 min stimuliert. Hierzu wurde ein Experiment an D2 und ein Experiment an D7 durchgeführt. Die Ergebnisse wurden gemittelt.

4.5.4 Akutstimulation mit PGE₂ und Insulin

Um den akuten Einfluss von PGE₂ auf die Phosphorylierung von Akt zu untersuchen, wurden die SH-SY5Y-Zellen für 15 min mit PGE₂ stimuliert. Die 15-minütige Behandlung der Zellen mit PGE₂ steigerte die Phosphorylierung der Akt-Kinase nicht (Abb. 30). Insulin aber steigerte nach einer Inkubationszeit von 15 min die Akt-Phosphorylierung 11-fach im Vergleich zur Kontrolle. Die gleichzeitige Inkubation der Zellen mit PGE₂ und Insulin veränderte die Akt-Phosphorylierung nicht.

SH-SY5Y: PGE₂-Akutstimulation

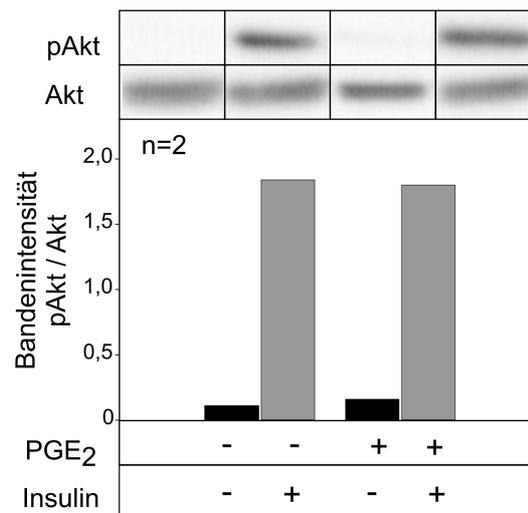


Abbildung 30: Akutstimulation mit PGE₂ und Insulin in SH-SY5Y-Zellen

Die SH-SY5Y-Zellen wurden wie unter 3.1.3 beschrieben kultiviert und für 15 min mit PGE₂ (10 µM) ± Insulin (10 nM) stimuliert. Die Zellen wurden lysiert und es wurden jeweils 30 µg Protein für die Western-Blot-Analyse eingesetzt (siehe 3.10). Der Erstantikörper war gegen pAkt bzw. Akt gerichtet, der Zweitantikörper war HRP-konjugiert. Hierzu wurde ein Experiment an D2 und ein Experiment an D7 durchgeführt. Die Werte wurden gemittelt. Dargestellt ist ein repräsentativer Western-Blot.

4.5.5 Modulation der insulinabhängigen Phosphorylierung von Akt und ERK1/2 durch Vorinkubation mit PGE₂

Die Vorbehandlung der Zellen mit PGE₂ für 330 min hemmte als Ergebnis von 15 unabhängigen Versuchen die insulinstimulierte **Akt**-Phosphorylierung nach 15 min nicht (Abb. 31aA). Für dieses Ergebnis wurden D2- und D7-differenzierte Zellen zusammengefasst. Innerhalb dieser 15 Versuche gab es jedoch acht Versuche, in denen die Vorinkubation mit PGE₂ die insulinstimulierte Akt-Phosphorylierung signifikant um den Faktor 1,6 hemmte (Abb. 31aC). In den restlichen sieben Versuchen steigerte die PGE₂-Vorinkubation signifikant die insulinstimulierte Akt-Phosphorylierung um das 1,3fache (Abb. 31aD). Die 15-minütige Insulinstimulation verstärkte die Phosphorylierung von **ERK1/2** in nicht vorbehandelten sowie in mit PGE₂-vorbehandelten Zellen signifikant gegenüber der Kontrolle (Abb. 31aB). Die Vorbehandlung mit PGE₂ allein steigerte die

Enzymphosphorylierung nicht. In PGE₂-vorbehandelten Zellen war die insulinstimulierte ERK1/2-Phosphorylierung gering, jedoch signifikant vermindert gegenüber der insulinstimulierten ERK1/2-Phosphorylierung in nicht vorbehandelten Zellen.

In den acht Versuchen, in denen die Vorinkubation mit PGE₂ die insulinstimulierten Akt-Phosphorylierung signifikant hemmte, war die insulinstimulierte ERK1/2-Phosphorylierung nach PGE₂-Vorinkubation leicht, jedoch nicht signifikant verringert (Abb. 31aE). Dieses Ergebnis stimmt mit der Gesamtzahl aller Versuche überein (Abb. 31aB). Auch in den sieben Versuchen, in denen die Vorinkubation mit PGE₂ insulinstimulierte Akt-Phosphorylierung signifikant steigerte, war die insulinstimulierte ERK1/2-Phosphorylierung nicht verändert (Abb. 31aF). Auch hier hemmte die PGE₂-Vorinkubation die insulinstimulierte ERK1/2-Phosphorylierung leicht. Es gibt somit keinen Zusammenhang zwischen der PGE₂-vermittelten Hemmung der insulinstimulierten Akt-Phosphorylierung und der PGE₂-abhängigen ERK1/2-Aktivierung.

Um zu überprüfen, ob der Differenzierungszeitpunkt der SH-SY5Y-Zellen einen Einfluss auf die PGE₂-vermittelte Modulation der insulinabhängigen Akt-Phosphorylierung hatte, wurden die Ergebnisse der D2- und D7-differenzierten Zellen auch getrennt begutachtet. In den D2-differenzierten Zellen hatte die Vorinkubation mit PGE₂ ebenfalls keinen Einfluss auf die insulinabhängige Akt-Phosphorylierung (Abb. 31bG). In den D7-differenzierten Zellen hemmte die PGE₂-Vorinkubation die insulinstimulierte Akt-Phosphorylierung leicht, dies jedoch nicht signifikant (Abb. 31bI). Die insulinstimulierte ERK1/2-Phosphorylierung wurde in den D2-differenzierten (Abb. 31bH) und den D7-differenzierten (Abb. 31bJ) Zellen leicht durch die PGE₂-Vorinkubation gehemmt.

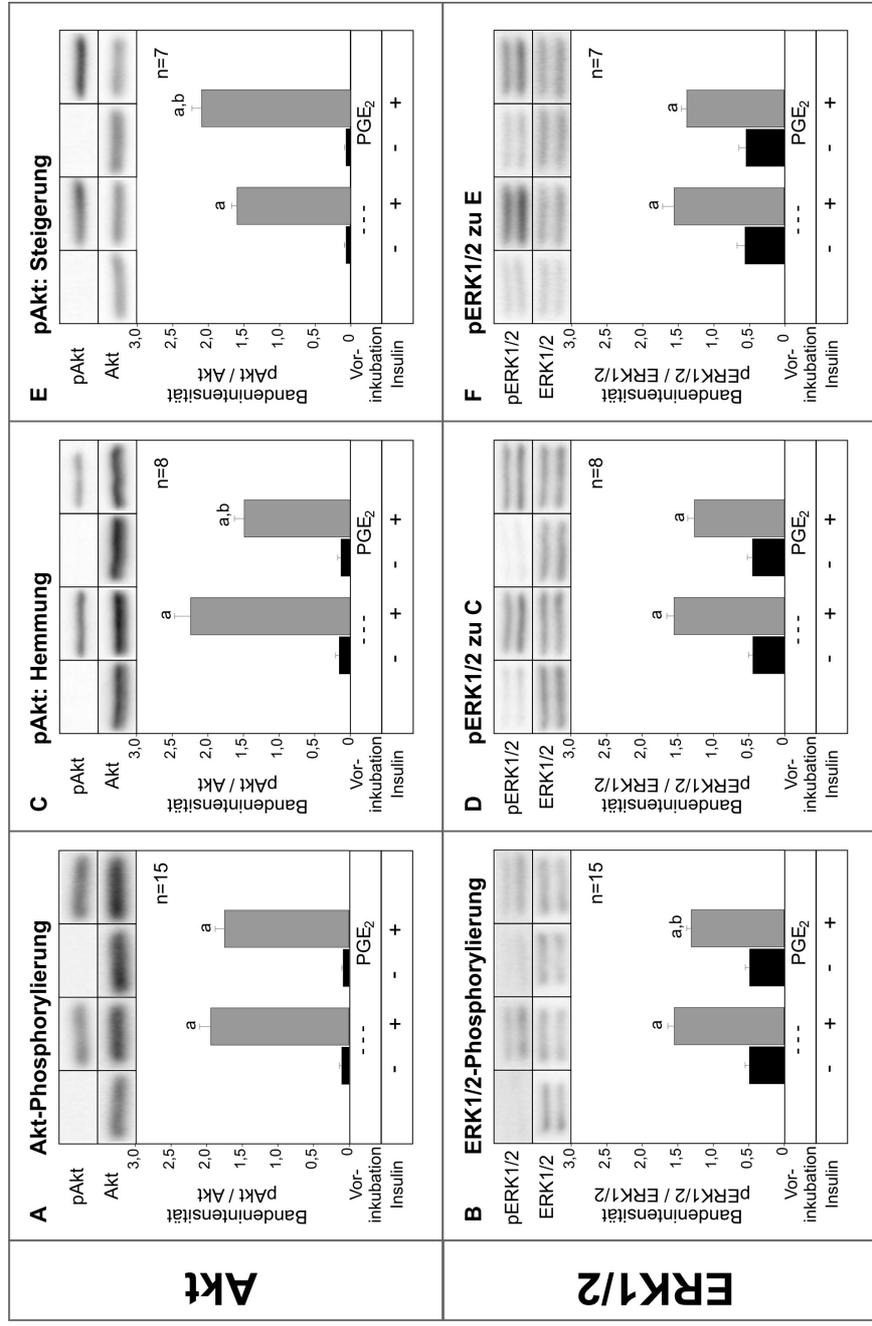


Abbildung 31a: Modulation der insulinabhängigen Phosphorylierung von Akt/ERK1/2 durch Vorinkubation mit PGE₂ in SH-SY5Y-Zellen

siehe Legende Abbildung 31b.

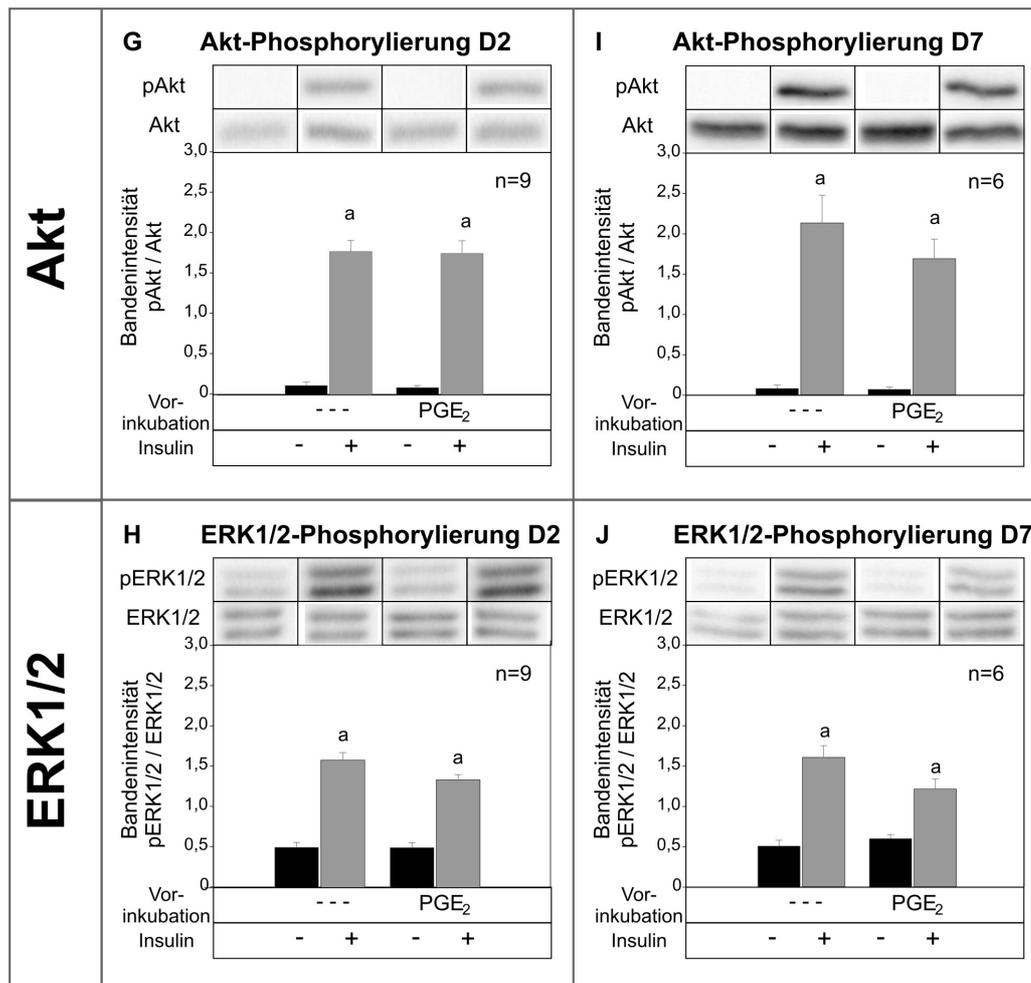


Abbildung 31b: Modulation der insulinabhängigen Phosphorylierung von Akt/ERK1/2 durch Vorinkubation mit PGE₂ in SH-SY5Y-Zellen

Die SH-SY5Y-Zellen wurden wie unter 3.1.3 beschrieben kultiviert, mit PGE₂ (10 µM) für 330 min vorstimuliert und anschließend mit Insulin (10 nM) für 15 min stimuliert. Es wurden D2- und D7-differenzierte Zellen verwendet. Die Zellen wurden lysiert (siehe 3.9) und es wurde jeweils 30 µg Protein für die Western-Blot-Analyse eingesetzt (siehe 3.10). Der Erstantikörper war gegen pAkt bzw. Akt (A, C, E, G, I), pERK1/2 bzw. ERK1/2 (B, D, F, H, J) gerichtet. Der Zweitantikörper war HRP-konjugiert. Hierzu wurde die in der Abbildung angegebene Anzahl unabhängiger Experimente durchgeführt. Abbildung 31a zeigt die zusammengefassten Ergebnisse von D2- und D7-differenzierten Zellen. Abbildung 31b zeigt die Ergebnisse der D2- und D7-differenzierten Zellen getrennt. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte ± SEM. a: signifikant versus ohne Insulinstimulation; b: signifikant versus ohne PGE₂-Vorinkubation; p < 0,05; Student's t-Test für gepaarte Stichproben. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Western-Blot.

4.6 N-41-Zellen

4.6.1 Charakterisierung der N-41-Zellen

N-41 sind immortalisierte hypothalamische Neuronen der Maus. Sie wurden auf die Genexpression des Insulinrezeptors und des CB1-Rezeptors untersucht. Die mRNA für diese beiden Rezeptoren wurden in den N-41-Zellen nachgewiesen (Abb. 32). Die mRNA für die lange Form des Leptinrezeptors (Ob-Rb) konnte in den Zellen nicht nachgewiesen werden.

4.6.2 Quantifizierung der PGE₂-Rezeptoren in N-41-Zellen

Die Genexpression der vier PGE₂-Rezeptoren (EP1-4) wurde in den Zellen mittels quantitativer *Real-Time*-PCR bestimmt (Abb. 33). Die hypothalamischen Zellen exprimierten am stärksten den EP1-Rezeptor und den EP4-Rezeptor. Der EP3- und der EP2-Rezeptor wurde in den Zellen praktisch nicht exprimiert.

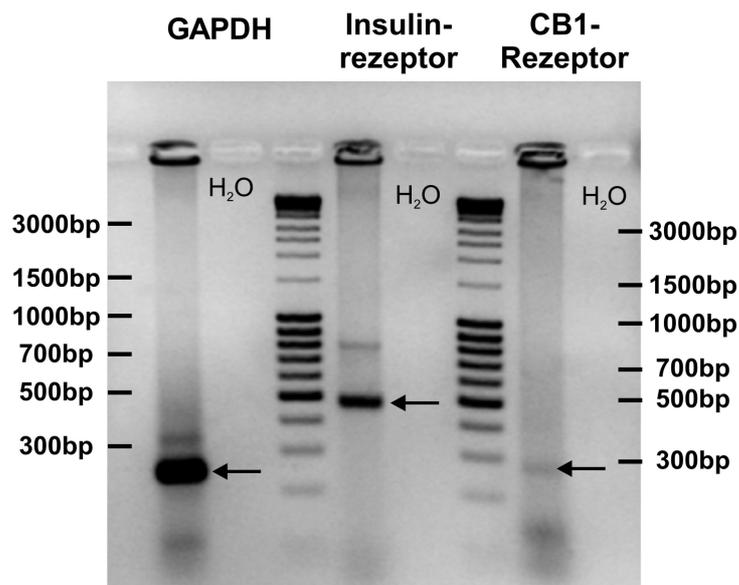


Abbildung 32: Charakterisierung der N-41-Zellen

Die N-41-Zellen wurden wie unter 3.1.4 beschrieben kultiviert. Die RNA wurde isoliert (siehe 3.5) und die PGE₂-Rezeptoren mittels semiquantitativer RT-PCR (siehe 3.6.4) auf die Genexpression des Insulinrezeptors, Leptinrezeptors und des CB1-Rezeptors getestet. Die Genexpression von GAPDH diente hierbei als Kontrolle für die Effizienz der RNA-Isolierung und cDNA-Synthese.

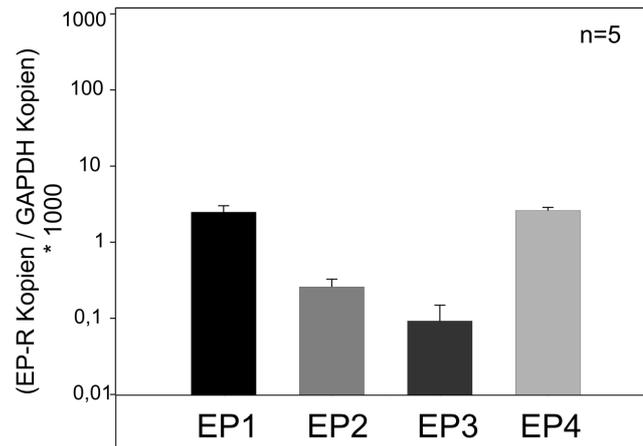


Abbildung 33: Quantifizierung der PGE₂-Rezeptoren in N-41-Zellen

Die N-41-Zellen wurden wie unter 3.1.4 beschrieben kultiviert. Die RNA wurde isoliert (siehe 3.5) und die mRNA-Kopienzahl für die PGE₂-Rezeptoren und GAPDH anhand von Eichgeraden mit entsprechenden Plasmid-DNA's quantifiziert (siehe 3.6.5). Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm SEM von fünf unabhängigen Versuchen in Dreifachbestimmung.

4.6.3 Kinetik und Dosiswirkungskurve der insulinabhängigen Akt-Phosphorylierung

Zur Ermittlung der geeigneten Inkubationszeit wurde für die N-41-Zellen eine Kinetik der insulinabhängigen Phosphorylierung von Akt untersucht. Nach 15- und 30-minütiger Inkubation der Zellen mit Insulin (10 nM) hatte die Phosphorylierung von Akt ein Plateau erreicht, welches bis zur 30-minütigen Stimulation kaum gesteigert werden konnte (Abb. 34A). Aus diesem Grund wurde als geeignete Inkubationszeit für die Zellversuche mit den N-41-Zellen 15 min gewählt. In den nicht mit Insulin behandelten Kontrollzellen wurde das Enzym nicht aktiviert.

Um die geeignete Insulinkonzentration zu ermitteln, wurden die Zellen für 15 min mit unterschiedlichen Insulinkonzentrationen (0 nM – 100 nM) stimuliert. Die insulinstimulierte Phosphorylierung von Akt ließ sich konzentrationsabhängig steigern. Da der Unterschied zwischen 10 nM und 100 nM gering war, wurden 10 nM als geeignete Konzentration gewählt (Abb. 34B).

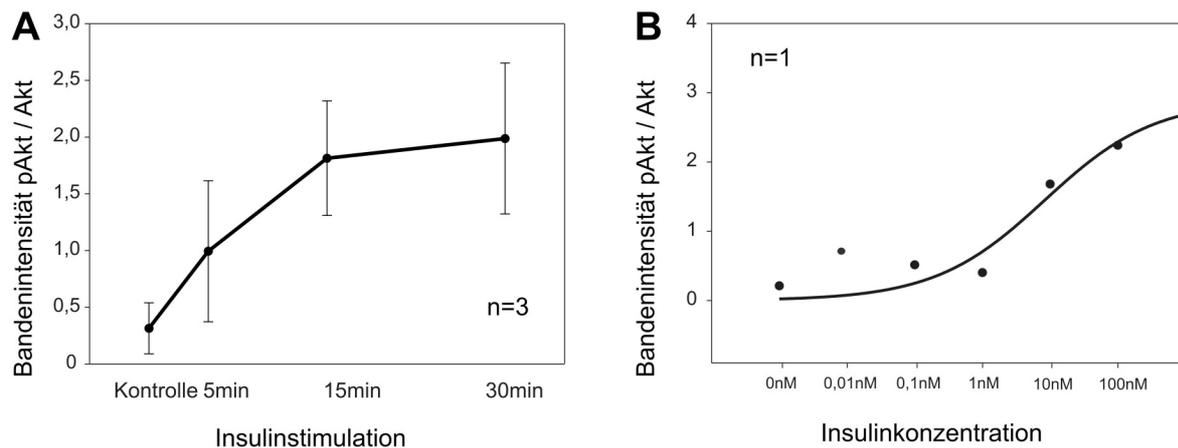


Abbildung 34: Kinetik und Dosiswirkungskurve der insulinabhängigen Akt-Phosphorylierung in N-41-Zellen

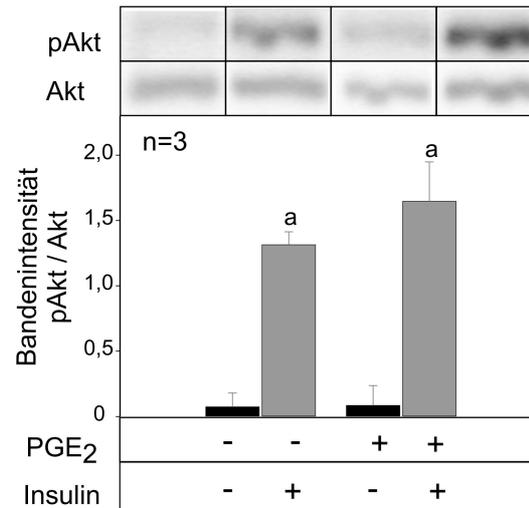
Die N-41-Zellen wurden wie unter 3.1.4 beschrieben kultiviert und für die Kinetik der insulinabhängigen Akt-Phosphorylierung (A) für 5, 15 und 30 min mit Insulin (10 nM) stimuliert. Die Zellen wurden lysiert (siehe 3.9) und es wurden jeweils 30-50 µg Protein für die Western-Blot-Analyse eingesetzt (siehe 3.10). Der Erstantikörper war gegen pAkt bzw. Akt gerichtet. Der Zweitantikörper war HRP-konjugiert. Hierzu wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm SEM. Für die Dosiswirkungskurve der insulinabhängigen Akt-Phosphorylierung (B) wurden die Zellen mit unterschiedlichen Insulinkonzentrationen (0 nM – 100 nM) für 15 min stimuliert. Hierzu wurde ein Experiment durchgeführt.

4.6.4 Akutstimulation mit PGE₂ und Insulin in N-41-Zellen

Dieses Experiment wurde wie auch in den SH-SY5Y-Zellen durchgeführt, um den akuten Einfluss (15 min) von PGE₂ auf die Phosphorylierung von Akt zu untersuchen. Die 15-minütige Behandlung der Zellen mit PGE₂ steigerte die Akt-Phosphorylierung nicht (Abb. 35). Insulin steigerte nach einer Inkubationszeit von 15 min die Akt-Phosphorylierung im Vergleich zur Kontrolle fast vierfach. Die gleichzeitige Stimulation mit Insulin und PGE₂ erzielte die stärkste Phosphorylierung von Akt, der Unterschied zur alleinigen Stimulation mit Insulin war jedoch nicht signifikant.

4.6.5 Modulation der insulinabhängigen Phosphorylierung von Akt und ERK1/2 durch Vorinkubation mit PGE₂ in N-41-Zellen

Die 15-minütige Insulinstimulation erhöhte die Akt-Phosphorylierung in den N-41-Zellen signifikant um das 3,5fache (Abb. 36A). Die Vorbehandlung der Zellen mit PGE₂ für 330 min hatte keinen Einfluss auf die insulinstimulierte Akt-Phosphorylierung. Die PGE₂-Vorinkubation alleine hemmte tendenziell die Phosphorylierung von Akt gegenüber der Kontrolle ($p < 0,1$). ERK1/2 wurde durch Insulin in den N-41-Zellen gegenüber der Kontrolle signifikant um das 1,7fache phosphoryliert (Abb. 36B). Die Vorbehandlung der Zellen mit PGE₂ reduzierte die insulinstimulierte ERK1/2-Phosphorylierung, dies jedoch nicht signifikant. PGE₂ alleine steigerte die ERK1/2-Phosphorylierung nicht.

N-41: PGE₂-Akutstimulation**Abbildung 35: Akutstimulation mit PGE₂ und Insulin in N-41-Zellen**

Die N-41-Zellen wurden wie unter 3.1.4 beschrieben kultiviert und für 15 min mit PGE₂ (10 μM) ± Insulin (10 nM) stimuliert. Die Zellen wurden lysiert und es wurde jeweils 30-50 μg Protein für die Western Blot-Analyse eingesetzt (siehe 3.10). Der Erstantikörper war gegen pAkt bzw. Akt gerichtet, der Zweitantikörper war HRP-konjugiert. Hierzu wurden drei Experimente durchgeführt. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte ± SEM. a: signifikant versus ohne Insulinstimulation; $p < 0,05$; Student's t-Test für gepaarte Stichproben. Dargestellt ist ein repräsentativer Western-Blot.

4.6.6 Akutstimulation mit ACEA in N-41-Zellen

Dieses Experiment wurde durchgeführt, um den akuten Einfluss von ACEA¹² (15 min) auf die Phosphorylierung von Akt zu untersuchen. Die 15-minütige Behandlung der N-41-Zellen mit Insulin steigerte die Akt-Phosphorylierung um den Faktor 13,5 (Abb. 37). ACEA steigerte nach einer Inkubationszeit von 15 min die Akt-Phosphorylierung im Vergleich zur Kontrolle 2,4-fach. Die gleichzeitige Inkubation der Zellen mit Insulin und ACEA veränderte die insulinabhängige Akt-Phosphorylierung nicht.

¹² ACEA = Arachidonyl 2'-chloroethylamid; ein CB1-R-Agonist.

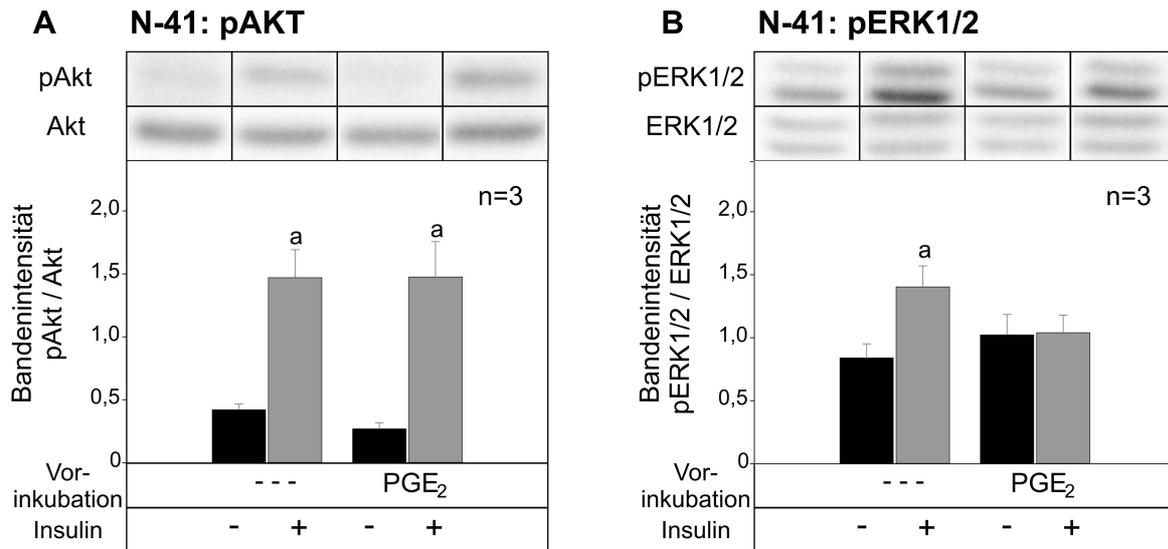


Abbildung 36: Modulation der insulinabhängigen Phosphorylierung von Akt und ERK1/2 durch Vorinkubation mit PGE₂ in N-41-Zellen

Die N-41-Zellen wurden wie unter 3.1.4 beschrieben kultiviert, mit PGE₂ (10 µM) für 330 min vorstimuliert und anschließend mit Insulin (10 nM) für 15 min stimuliert. Die Zellen wurden lysiert (siehe 3.9) und es wurde jeweils 30-50 µg Protein für die Western-Blot-Analyse eingesetzt (siehe 3.10). Der Erstantikörper war gegen pAkt bzw. Akt (A), pERK1/2 bzw. ERK1/2 (B) gerichtet. Der Zweitantikörper war HRP-konjugiert. Hierzu wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt. Die gezeigte Werte sind Mittelwerte ± SEM. a: signifikant versus ohne Insulinstimulation; $p < 0,05$; Student's t-Test für gepaarte Stichproben. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Western-Blot.

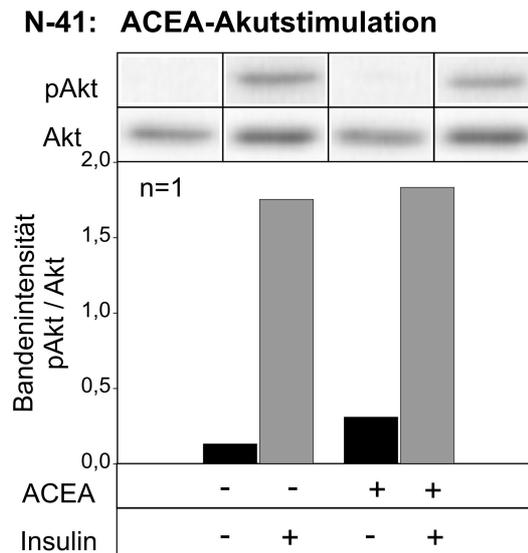


Abbildung 37: Akutstimulation mit ACEA und Insulin in N-41-Zellen

Die N-41-Zellen wurden wie unter 3.1.4 beschrieben kultiviert und für 15 min mit ACEA (10µM) ± Insulin (10 nM) stimuliert. Die Zellen wurden lysiert und es wurde jeweils 30-50 µg Protein für die Western Blot-Analyse eingesetzt (siehe 3.10). Der Erstantikörper war gegen pAkt bzw. Akt gerichtet, der Zweitantikörper war HRP-konjugiert. Hierzu wurde ein Experiment durchgeführt.

4.6.7 Modulation der insulinabhängigen Phosphorylierung von Akt und ERK1/2 durch Vorinkubation mit ACEA in N-41-Zellen

Die 15-minütige Insulinstimulation steigerte die **Akt**-Phosphorylierung in N-41-Zellen signifikant um das 3,5fache (Abb. 38A). Die Vorstimulation der Zellen mit ACEA für 330 min steigerte die Akt-Phosphorylierung nicht. Wurden die Zellen dagegen nach der Vorbehandlung mit ACEA für 15 min mit Insulin stimuliert, kam es zu einer signifikanten Steigerung der insulinabhängigen Akt-Phosphorylierung um den Faktor 1,6. Die Insulinstimulation verstärkte in den N-41-Zellen auch die **ERK1/2**-Phosphorylierung signifikant (Abb. 38B). Die Vorbehandlung der Zellen mit ACEA veränderte die ERK1/2-Phosphorylierung nicht. Diese Vorbehandlung hatte ebenso keinen Einfluss auf die insulin-stimulierte ERK1/2-Phosphorylierung.

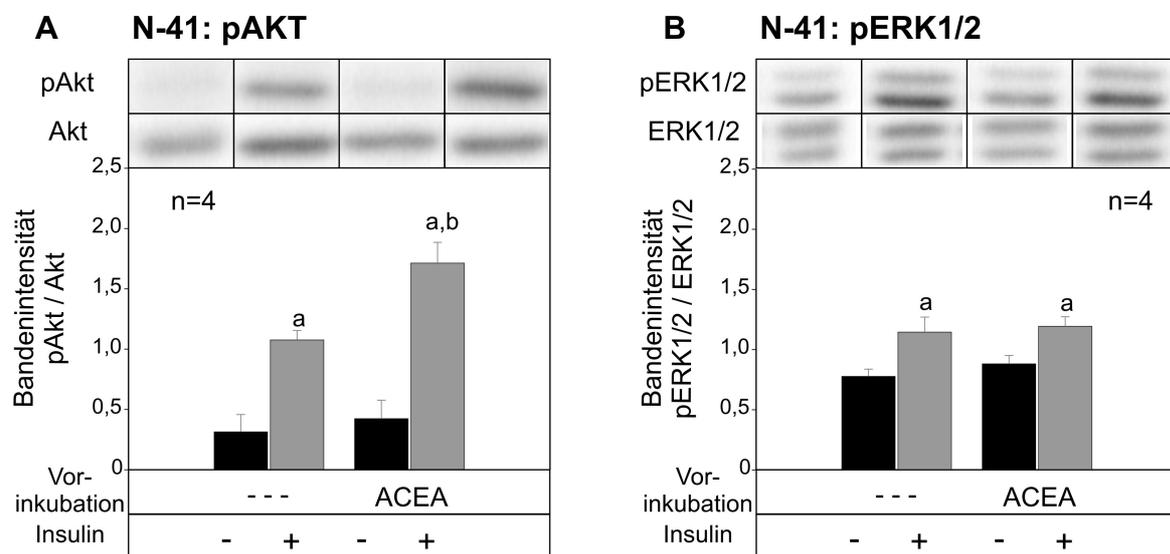


Abbildung 38: Modulation der insulinabhängigen Phosphorylierung von Akt und ERK1/2 durch Vorinkubation mit ACEA in N-41-Zellen

Die N-41-Zellen wurden wie unter 3.1.4 beschrieben kultiviert, mit ACEA (10 μ M) für 330 min vorstimuliert und anschließend mit Insulin (10 nM) für 15 min stimuliert. Die Zellen wurden lysiert (siehe 3.9) und es wurden jeweils 30-50 μ g Protein für die Western-Blot-Analyse eingesetzt (siehe 3.10). Der Erstantikörper war gegen pAkt bzw. Akt (A), pERK1/2 bzw. ERK1/2 (B) gerichtet. Der Zweitantikörper war HRP-konjugiert. Hierzu wurden vier unabhängige Experimente durchgeführt. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm SEM. a: signifikant versus ohne Insulinstimulation; b: signifikant versus ohne ACEA-Vorinkubation; $p < 0,05$; Student's t-Test für gepaarte Stichproben. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Western-Blot.

4.6.8 Überprüfung der Expression von Insulinzielgenen in N-41-Zellen

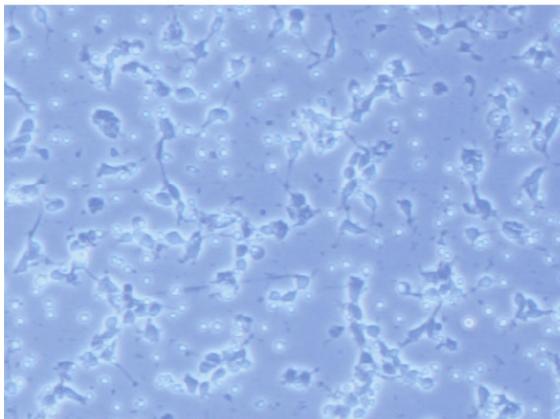
In N-41-Zellen sollte überprüft werden, ob bekannte Insulinzielgene durch die Behandlung mit Insulin reguliert werden. Als Zielgene, die durch Insulin in Nervenzellen induziert werden, wurden POMC und FAS gewählt. Beim AgRP handelt es sich um ein Gen, welches durch Insulin in Nervenzellen herunterreguliert wird (siehe 1.2). Von den drei untersuchten Genen wurde bei keinem die Expression positiv oder negativ durch Insulin (1-4 Stunden) beeinflusst (Daten nicht gezeigt).

4.7 Primäre hypothalamische Neuronen der Ratte

4.7.1 Charakterisierung der embryonalen hypothalamischen Zellen

Für die embryonale hypothalamische Zellkultur wurden trächtigen Ratten an E 17 die Embryonen entnommen. Die Neuronen wurden aus den embryonalen Hypothalami isoliert und für ein bis vier Tage kultiviert. Die hypothalamischen Neuronen wiesen am ersten Tag in Kultur nur wenige Neuriten auf (Abb. 39A). Am vierten Tag in Kultur konnte die Ausbildung zahlreicher Neuriten beobachtet werden (Abb. 39B). Mit steigender Kulturdauer starben immer mehr Zellen ab. Am siebten Tag enthielten die Kulturen fast nur noch tote Zellen, so dass alle Experimente mit den primären Neuronen am vierten Tag in Kultur durchgeführt wurden.

A 1. Tag in Kultur



B 4. Tag in Kultur

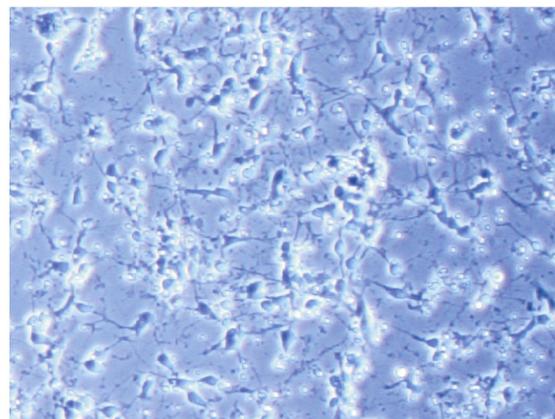


Abbildung 39: Embryonale hypothalamische Kulturen der Ratte

Trächtigen Ratten wurden an E 17 die Embryonen zur Präparation embryonaler hypothalamischer Kulturen entnommen (siehe 3.3). Die Hypothalami wurden wie unter 3.3.3 beschrieben isoliert, die Zellen vereinzelt und die Neuronen mit einer Zellzahl von 7×10^5 Zellen pro 35 mm beschichteter Zellkulturschale ausplattiert. Die Neuronen wurden für vier Tage kultiviert.

Die primären Neuronen exprimierten am vierten Tag in Kultur die Tyrosinkinase B nur schwach (Abb. 40). Ab dem siebten Tag in Kultur war der neuronale Marker weitaus stärker exprimiert. Da die Neuronen gemäß der Expression der Tyrosinkinase B am siebten Tag in Kultur besser differenziert waren, wären Neuronen in diesem Differenzierungszustand für die Experimente besser geeignet gewesen. Da jedoch die Kulturen am siebten fast nur noch tote Zellen enthielten, wurden die Experimente mit Neuronen am vierten Tag in Kultur durchgeführt.

Die primäre Neuronen wurden auch auf die Genexpression des Insulinrezeptors, der langen Form des Leptinrezeptors (Ob-Rb) und des CB1-Rezeptors untersucht. Die mRNA für alle drei Rezeptoren konnte in den Neuronen nachgewiesen werden (Abb. 40).

4.7.2 Quantifizierung der PGE₂-Rezeptoren in primären hypothalamischen Neuronen

Die mRNA für den EP3-Rezeptor konnte in den primären Neuronen praktisch nicht nachgewiesen werden (Abb. 42A). Die primären Neuronen exprimierten am stärksten den EP1-Rezeptor. Der EP2- und der EP4-Rezeptor wurden nur schwach exprimiert. Zum Vergleich der PGE₂-Rezeptorgenexpression der embryonalen Neuronen mit der Situation im adulten Tier wurden die Rezeptoren ebenfalls im adulten Rattenhypothalamus quantifiziert (Abb. 42B). Hier waren der EP1-, EP-2 und der EP3-Rezeptor etwa gleich stark exprimiert. Die mRNA für den EP4-Rezeptor konnte im adulten Rattenhypothalamus praktisch nicht nachgewiesen werden.

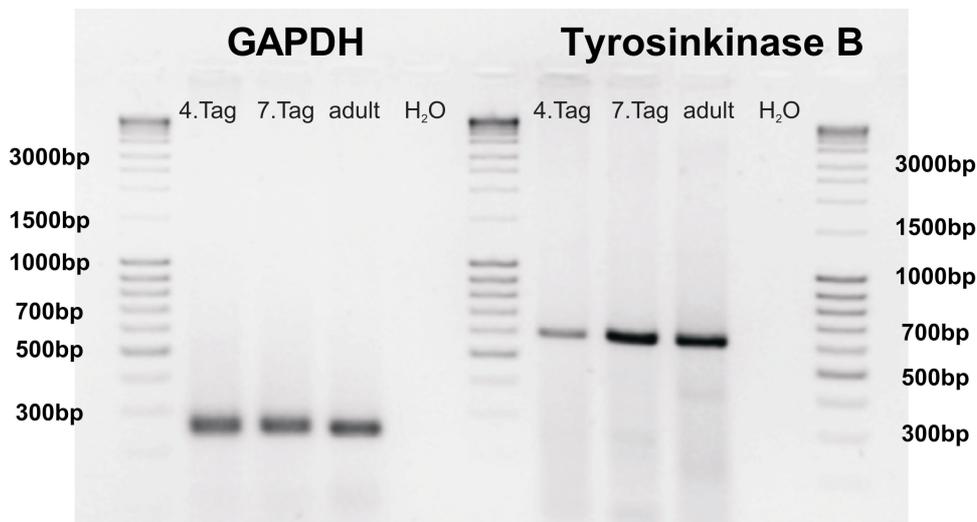


Abbildung 40: Neuronaler Marker in primären hypothalamischen Neuronen

Primäre Neuronen wurden wie unter 3.3.6 beschrieben kultiviert. Die RNA wurde am vierten und am siebten Tag in Kultur isoliert (siehe 3.5) und mittels semiquantitativer RT-PCR (siehe 3.6.4) auf die Genexpression der Tyrosinkinase B als neuronaler Marker getestet. Zum Vergleich diente isolierte RNA vom adulten Rattenhypothalamus. Die Genexpression von GAPDH diente hierbei als Kontrolle für die Effizienz der RNA-Isolierung und cDNA-Synthese.

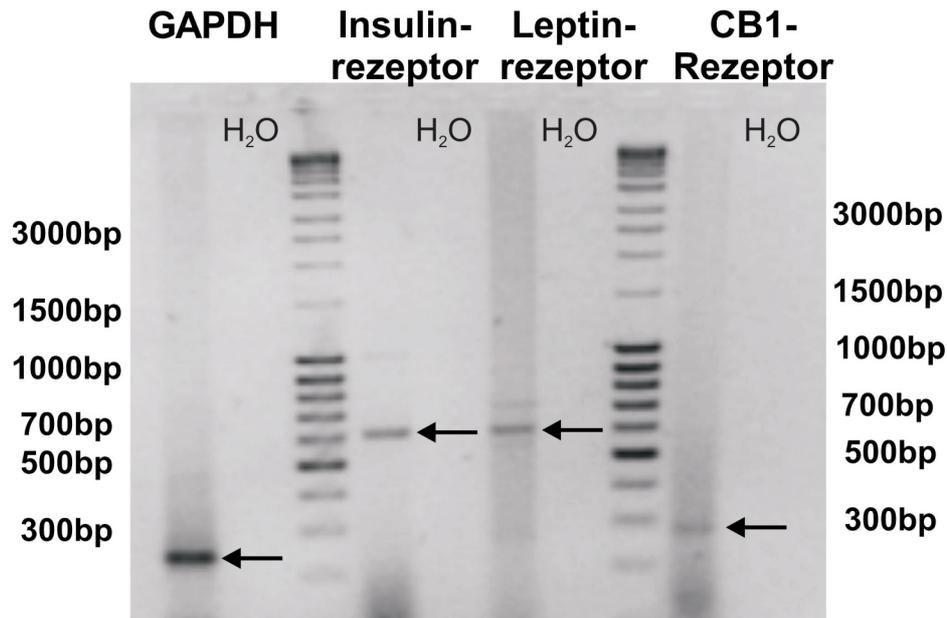


Abbildung 41: Charakterisierung der primären Neuronen

Primäre Neuronen wurden wie unter 3.3.6 beschrieben kultiviert. Die RNA wurde am vierten Tag in Kultur isoliert und mittels semiquantitativer RT-PCR (siehe 3.6.4) auf die Genexpression des Insulinrezeptors, Leptinrezeptors und des CB1-Rezeptors getestet. Die Genexpression von GAPDH diente hierbei als Kontrolle für die Effizienz der RNA-Isolierung und cDNA-Synthese.

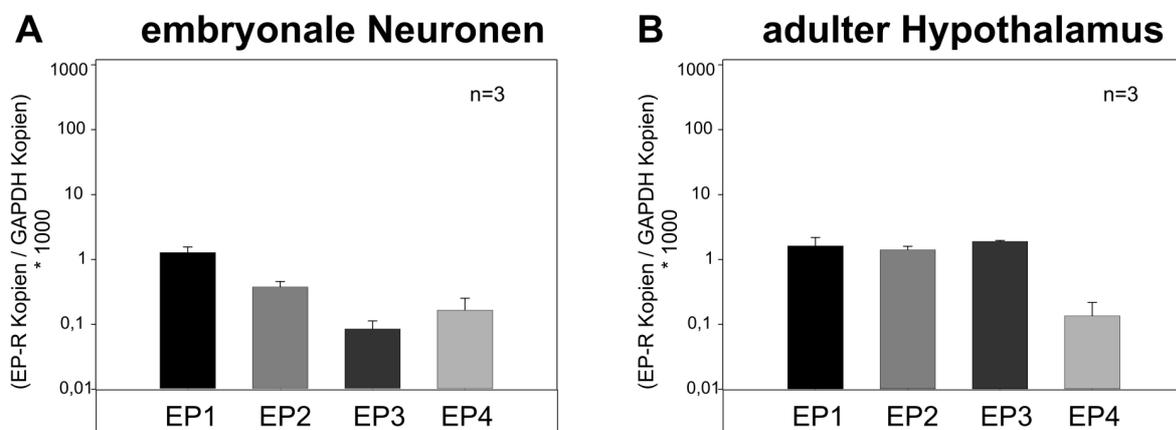


Abbildung 42: Quantifizierung der PGE₂-Rezeptoren in primären hypothalamischen Neuronen sowie im adulten Rattenhypothalamus

Primäre Neuronen (A) wurden wie unter 3.3.6 beschrieben kultiviert. Die RNA wurde am vierten Tag in Kultur isoliert (siehe 3.5) und die mRNA-Kopienzahl für die PGE₂-Rezeptoren und GAPDH anhand von Eichgeraden mit entsprechenden Plasmid-DNA's quantifiziert (siehe 3.6.5). Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm SEM von jeweils drei unabhängigen Versuchen in Dreifachbestimmung.

4.7.3 Kinetik und Dosiswirkungskurve der insulinabhängigen Akt-Phosphorylierung

Zur Ermittlung der geeigneten Inkubationszeit wurde für die primären Neuronen eine Kinetik der insulinabhängigen Akt-Phosphorylierung untersucht. Nach 15-minütiger Inkubation der Zellen mit Insulin (10 nM) war die Phosphorylierung von Akt maximal (Abb. 43A). Als geeignete Inkubationszeit für die Zellversuche mit den primären Neuronen wurden deshalb 15 min gewählt. Um die geeignete Insulinkonzentration zu ermitteln, wurden die primären Neuronen für 15 min mit unterschiedlichen Insulinkonzentrationen (0 nM – 100 nM) stimuliert. Die insulinstimulierte Phosphorylierung von Akt war bei einer Insulinkonzentration von 100 nM am stärksten (Abb. 43B). Bei einer Konzentration von 10 nM war die insulinstimulierte Phosphorylierung von Akt nur gering gegenüber der Kontrolle (0 nM) gesteigert. Da jedoch die neuronalen Zelllinien SH-SY5Y und N-41 mit einer Insulinkonzentration von 10 nM stimuliert wurden, wurde auch für die Zellversuche mit den primären Neuronen 10 nM als geeignete Insulinkonzentration gewählt. Die Ergebnisse aller nachfolgenden Versuche deuten darüber hinaus darauf hin, dass die schwache Akt-Phosphorylierung, die in diesem Versuch mit 10 nM Insulin beobachtet wurde, nicht repräsentativ war.

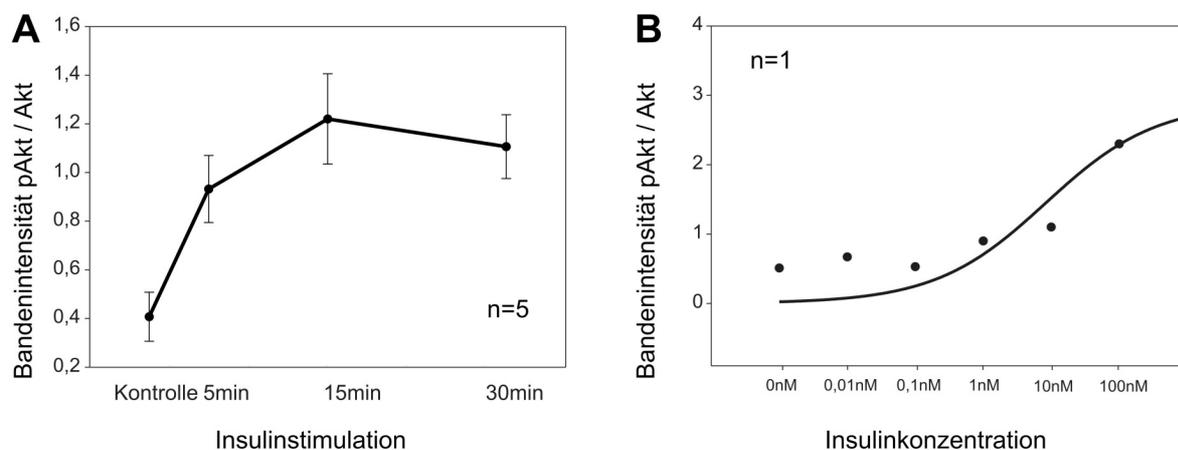


Abbildung 43: Kinetik und Dosiswirkungskurve der insulinabhängigen Akt-Phosphorylierung in primären hypothalamischen Neuronen

Primäre Neuronen wurden wie unter 3.3.6 beschrieben kultiviert und für die Kinetik der insulinabhängigen Akt-Phosphorylierung (A) für 5, 15 und 30 min mit Insulin (10 nM) stimuliert. Die Zellen wurden lysiert (siehe 3.9) und es wurden jeweils 30-50 µg Protein für die Western-Blot-Analyse eingesetzt (siehe 3.10). Der Erstantikörper war gegen pAkt bzw. Akt gerichtet. Der Zweitantikörper war HRP-konjugiert. Hierzu wurden fünf Experimente durchgeführt. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm SEM. Für die Dosiswirkungskurve der insulinabhängigen Akt-Phosphorylierung (B) wurden die primären Neuronen mit unterschiedlichen Insulinkonzentrationen (0 nM – 100 nM) für 15 min stimuliert. Hierzu wurde ein Experiment durchgeführt.

4.7.4 Akutstimulation mit PGE₂ und Insulin in primären hypothalamischen Neuronen

Die 15-minütige Behandlung der Zellen mit Insulin steigerte die Akt-Phosphorylierung um mehr als das Dreifache im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 44). PGE₂ steigerte die Akt-Phosphorylierung nicht. Die gleichzeitige Inkubation der Zellen mit PGE₂ und Insulin veränderte die insulinabhängige Akt-Phosphorylierung nicht.

4.7.5 Modulation der insulinabhängigen Phosphorylierung von Akt und ERK1/2 durch Vorinkubation mit PGE₂ in primären Neuronen

Die 15-minütige Insulinstimulation erhöhte die **Akt**-Phosphorylierung in den primären Neuronen etwa 14fach (Abb. 45A). Diese Steigerung war signifikant. Die Kontrolle in diesem Zellversuch zeigte ein deutlich geringeres pAkt/Akt-Verhältnis als die Kontrolle des Zellversuches für die Akutstimulation mit Insulin und PGE₂ (Abb. 44).

Die Vorbehandlung der Zellen mit PGE₂ steigerte die insulinstimulierten Akt-Phosphorylierung leicht, aber nicht signifikant. PGE₂ alleine erhöhte die Phosphorylierung von Akt gegenüber der Kontrolle, dies jedoch nicht signifikant. Insulin steigerte die **ERK1/2**-Phosphorylierung in den primären Neuronen um das 1,6fache sowohl mit als auch ohne PGE₂-Vorbehandlung (Abb. 45B). PGE₂ erhöhte die ERK1/2-Phosphorylierung nicht.

primäre Neuronen: PGE₂-Akutstimulation

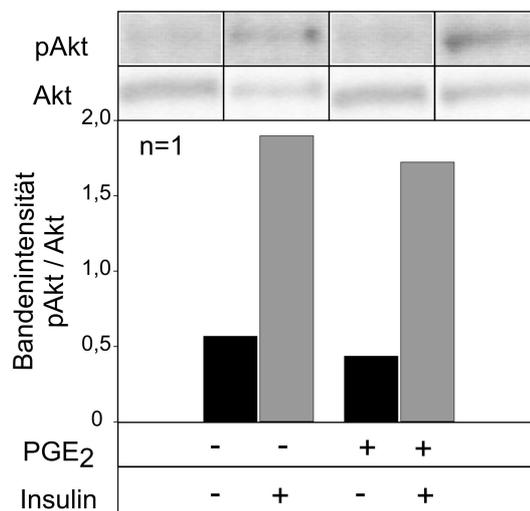


Abbildung 44: Akutstimulation mit PGE₂ und Insulin in primären hypothalamischen Neuronen

Die primären Neuronen wurden wie unter 3.3.6 beschrieben kultiviert und für 15 min mit PGE₂ (10 μM) oder Insulin (10 nM) stimuliert. Die Zellen wurden lysiert (siehe 3.9) und es wurde jeweils 30-50 μg Protein für die Western-Blot-Analyse eingesetzt (siehe 3.10). Der Erstantikörper war gegen pAkt bzw. Akt gerichtet, der Zweitantikörper war HRP-konjugiert. Hierzu wurde ein Experiment durchgeführt.

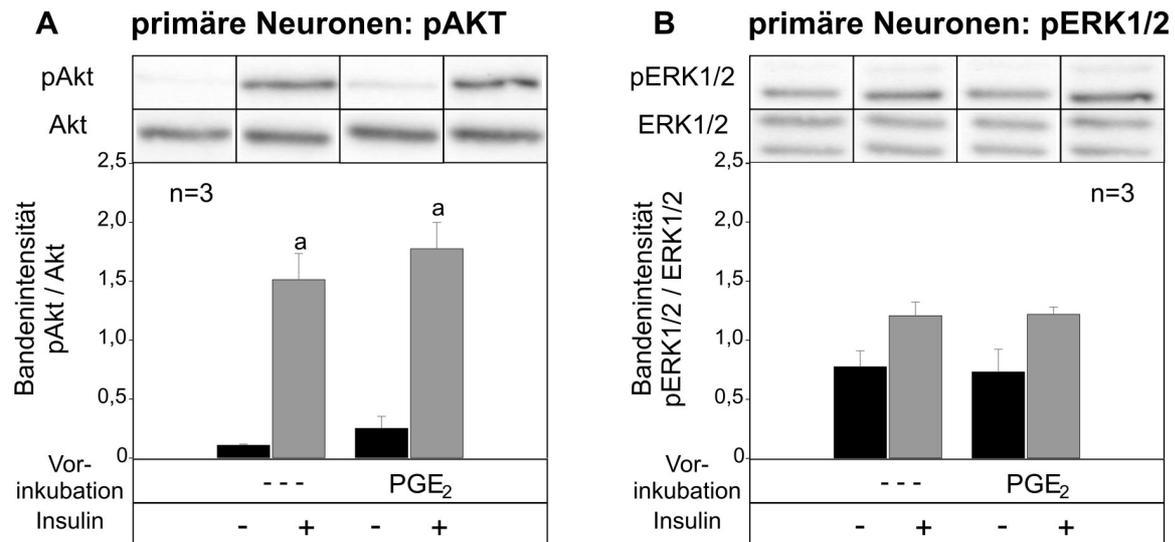


Abbildung 45: Modulation der insulinabhängigen Phosphorylierung von Akt und ERK1/2 durch Vorinkubation mit PGE₂ in primären hypothalamischen Neuronen

Die primären Neuronen wurden wie unter 3.3.6 beschrieben kultiviert, mit PGE₂ (10 μM) für 330 min vorstimuliert und anschließend mit Insulin (10 nM) für 15 min stimuliert. Die Zellen wurden lysiert (siehe 3.9) und es wurde jeweils 30-50 μg Protein für die Western-Blot-Analyse eingesetzt (siehe 3.10). Der Erstantikörper war gegen pAkt bzw. Akt (A), pERK1/2 bzw. ERK1/2 (B) gerichtet. Der Zweitantikörper war HRP-konjugiert. Hierzu wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt. Die gezeigte Werte sind Mittelwerte ± SEM. a: signifikant versus ohne Insulinstimulation; $p < 0,05$; Student's t-Test für gepaarte Stichproben. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Western-Blot.

4.7.6 Überprüfung der Expression von Insulinzielgenen in primären Neuronen

Wie auch in den N-41-Zellen wurde die Genexpression von POMC, AgRP und FAS in den primären Neuronen überprüft (siehe 4.5.8). Auch hier wurde die Expression von keinem der drei untersuchten Gene durch Insulin (1-4 Stunden) positiv oder negativ beeinflusst (Daten nicht gezeigt).

5 DISKUSSION

5.1 Modulation der insulinstimulierten Signalwege durch PGE₂

PGE₂ wird während entzündlicher Reaktionen im Organismus freigesetzt. Es wirkt vorwiegend lokal und kann zur kurz- und langfristigen Anpassung des Stoffwechsels in unterschiedlichen Geweben führen (McCOY et al. 2002). Bei länger anhaltenden Entzündungen, wie im Fall des Krankheitsbildes Adipositas oder Typ II Diabetes mellitus, sind die Zellen dauernd erhöhten Spiegeln von PGE₂ ausgesetzt. Diese pathophysiologische Situation sollte *in vitro* durch die Vorinkubation der Zellen für 330 min mit PGE₂ nachgestellt werden. Die Auswirkungen dieser Vorinkubation auf die nachfolgende Insulinstimulation wurden anschließend untersucht. Ein Fokus lag hierbei auf der Signalgebung über die vier verschiedenen PGE₂-Rezeptoren. Die verschiedenen Subtypen haben sich entwickelt, um fundamental verschiedene Funktionen bezüglich der Zellsignalgebung auszuüben (FUJINO & REGAN 2003). Das Gewebshormon PGE₂ kann also je nachdem an welchen Rezeptor es bindet, sehr verschiedene Signalwege aktivieren.

In vorangegangenen Arbeiten innerhalb der Arbeitsgruppe wurde der Einfluss von PGE₂ auf die hepatische Insulinresistenz untersucht. In primären Hepatozyten der Ratte schwächte PGE₂ die insulinabhängige Akt-Aktivierung ab (HENKEL et al. 2009). Primäre Rattenhepatozyten exprimierten ausschließlich den EP3-R auf einem hohen Niveau (Abb. 10). Für die vorliegende Arbeit wurden stabil transfizierte HepG2-Zellen, die jeweils nur einen der EP-Rezeptorsubtypen (EP1, EP3 β bzw. EP4) exprimierten (Abb. 11) herangezogen, um den Einfluss von PGE₂ über seine verschiedenen Rezeptoren auf den Insulinsignalweg zu untersuchen. Die Vorinkubation mit PGE₂ resultierte in diesen Zellen ebenfalls in einer Hemmung der insulinstimulierten Akt-Phosphorylierung (Abb. 13). Da es im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht gelang, eine HepG2-Zelllinie zu generieren, die nur den EP2-R exprimiert, wurden Fh-hTert-Zellen herangezogen, die den EP2- und den EP4-R exprimierten (Abb. 12), um die Signalgebung über den EP2-R näher betrachten zu können. Auch in diesen Zellen hemmte die Vorinkubation mit PGE₂ die insulinstimulierte Akt-Phosphorylierung signifikant (Abb. 23A).

Die Ergebnisse aus den primären Hepatozyten haben gezeigt, dass durch die Vorinkubation mit PGE₂ die Tyrosinphosphorylierung des Insulinrezeptors nicht beeinflusst wird (HENKEL et al. 2009). Das Insulinsignal wurde distal des Insulinrezeptors und proximal von Akt auf der Ebene des IRS durch die Vorinkubation mit PGE₂ unterbrochen. Serin/Threoninkinasen, wie zum Beispiel ERK1/2, können IRS an kritischen Serinresten phosphorylieren und somit die Weiterleitung des Insulinsignals blockieren (siehe Abb. 6). In allen drei untersuchten stabil transfizierten HepG2-Zelllinien steigerte die Vorinkubation

mit PGE₂ die insulinstimulierte ERK1/2-Phosphorylierung (Abb. 15). In diesen transfizierten HepG2-Zelllinien konnte darüber hinaus eine PGE₂-abhängige Serinphosphorylierung des IRS nachgewiesen werden (Abb. 17). Dies deutet daraufhin, dass die Steigerung der ERK1/2-Phosphorylierung über den EP1-, EP3 β - und EP4-R und eine ERK1/2-abhängige Serinphosphorylierung des IRS als gemeinsamer Mechanismus einen Beitrag zur beobachteten Hemmung der insulinstimulierten Akt-Phosphorylierung leisten.

5.1.1 Modulation über den EP1-Rezeptor

Die Signalgebung von PGE₂ über den G_q-gekoppelten EP1-R führt über PLC zur Aktivierung der PKC (siehe Abb. 46 und 1.4). Die PKC könnte nun als Serin/Threoninkinase die IRS-Phosphorylierung an Serinresten katalysieren und dadurch die Signalweiterleitung unterbrechen. Die PGE₂-abhängige Serinphosphorylierung des IRS in den HepG2-EP1-Zellen (Abb. 17B) könnte daher durch PKC vermittelt worden sein. Allerdings hob die Behandlung der HepG2-EP1-Zellen mit dem PKC-Inhibitor BIM die PGE₂-vermittelte Hemmung der insulinstimulierten Akt-Phosphorylierung nicht auf (Abb. 18A), so dass die PKC offensichtlich nicht an der PGE₂-abhängigen Hemmung der Akt-Phosphorylierung beteiligt war.

ERK1/2 ist eine weitere Serin/Threoninkinase, die zu der beobachteten IRS Serinphosphorylierung führen und das Insulinsignal unterbrechen könnte (BOUZAKRI et al. 2003). Deswegen wurde der Einfluss von PGE₂ auf die insulinvermittelte ERK1/2-Phosphorylierung untersucht. Tatsächlich wurde eine PGE₂-vermittelte Phosphorylierung von ERK1/2 in den HepG2-EP1-Zellen beobachtet, die offensichtlich stärker war als die PGE₂-abhängige ERK1/2-Phosphorylierung in allen anderen EP-R-exprimierenden Hepatomzelllinien (Abb. 15B). ERK1/2 kann Raf- oder Ras-abhängig über den G_q-gekoppelten EP1-R PKC-vermittelt aktiviert werden (siehe 1.4). Der PKC-Inhibitor BIM hemmte in den HepG2-EP1-Zellen die PGE₂-abhängige ERK1/2-Phosphorylierung deutlich (Abb. 18B). Neben der PKC-vermittelten Aktivierung, kann ERK1/2 auch noch über alle G-Proteine über den Mechanismus der EGFR-Transaktivierung phosphoryliert werden (siehe 1.4). Die Behandlung der Zellen mit dem MEK-Inhibitor PD98059 hemmte die PGE₂-abhängige ERK1/2-Phosphorylierung zwar signifikant, aber nicht vollständig (Abb. 18B). PD98059 hob die Hemmung der insulinstimulierten Akt-Phosphorylierung durch PGE₂ nicht auf (Abb. 18A). Es könnte daher sein, dass die nach Behandlung mit PD98059 verbleibende PGE₂-abhängige gesteigerte ERK1/2-Aktivität noch ausreicht, um die insulinabhängige Akt-Phosphorylierung zu hemmen. Dies wurde aber durch den Einsatz des zweiten MEK-Inhibitors U0126 bestätigt. U0126, ein weitaus wirksamerer MEK-Inhibitor als PD98059 (siehe 4.3), hemmte die PGE₂-vermittelte ERK1/2-Phosphorylierung fast vollständig und schwächte die PGE₂-abhängige Hemmung der insulinstimulierten Akt-Phosphorylierung

deutlich ab, hob sie aber ebenfalls nicht vollständig auf (Abb. 19). Somit spielte ERK1/2 mit Sicherheit eine Rolle bei der Modulation des Insulinsignals über den EP1-R. Es ist aber nicht auszuschließen, dass daneben noch andere Signalwege an der Hemmung der insulinabhängigen Akt-Aktivierung durch PGE₂ in den EP1-R-exprimierenden Zellen beteiligt sind.

U0126 steigerte in den HepG2-EP1-Zellen die insulinabhängige Akt-Phosphorylierung (Abb. 19A). Da in den HepG2-EP1-Zellen Insulin die ERK1/2-Phosphorylierung nicht steigerte, deutet dies daraufhin, dass ERK1/2 anscheinend PGE₂-unabhängig das Insulinsignal in diesen Zellen unterbrechen kann.

Die PI3K ist ein weiterer Effektor der PGE₂-vermittelten Signalübertragung über den EP1-R. Während die GTP-gebundene α -Untereinheit des G_q-gekoppelten Rezeptors die PLC aktiviert, resultiert die Bindung dieser Untereinheit an die PI3K in der Hemmung ihrer Lipidkinaseaktivität (BALLOU et al. 2000; BOMMAKATI et al. 2000). Dies geschieht durch eine direkte Bindung an die PI3K, die PLC-unabhängig ist (BALLOU et al. 2003; FAN et al. 2003) und in einer verringerten Akt-Aktivierung resultiert. Zwar hemmte PGE₂ alleine die Akt-Phosphorylierung nicht, jedoch kann dieser Mechanismus zur beobachteten Hemmung der insulinstimulierten Akt-Phosphorylierung nach PGE₂-Vorinkubation beitragen (Abb. 13B). Die aktivierte α -Untereinheit des G_q-gekoppelten Rezeptors verhindert darüber hinaus die Bindung von Ras an die PI3K. Die Bindung von aktivem Ras an die PI3K ist ein alternativer Weg zu deren Aktivierung (siehe 1.1.5), der so unterbunden wird und dadurch einen Beitrag zur PGE₂-abhängigen Hemmung der insulinvermittelten Akt-Aktivierung leisten könnte. Es ist möglich, dass der Aktivierung von Ras eine große Bedeutung bei der PGE₂-abhängigen Hemmung der insulinstimulierten Akt-Phosphorylierung zugesprochen werden kann. Der gleichzeitige Einsatz von Inhibitoren, die die Ras-Aktivierung verhindern, wie ein PKC- und ein EGFR-Inhibitor, wäre hierbei von großem Interesse.

Leider kann in diesen Zellen keine Aussage über die Beteiligung der Kinase mTOR an der PGE₂-abhängigen Modulation des Insulinsignalweges gemacht werden. Bei den vorliegenden HepG2-Zellen handelt es sich um Tumorzellen, in denen häufig eine Überaktivierung des mTOR-Signalweges zu beobachten ist (SAWYERS 2003). In Übereinstimmung mit anderen Arbeitsgruppen konnte eine basale Aktivierung dieses Signalweges in HepG2-Zellen bestätigt werden (KHAMZINA et al. 2005; MOTTET et al. 2003). In den in der Arbeit verwendeten HepG2-Zellen, sowie den HepG2-EP1-Zellen konnte nicht einmal die in der Literatur beschriebene insulinstimulierte mTOR-Phosphorylierung (ROUDIER et al. 2006; VARMA & KHANDELWAL 2007) beobachtet werden, da die basalen Phospho-mTOR-Spiegel bereits sehr hoch waren (Abb. 16B).

Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit, dass PGE_2 über einen G_q -gekoppelten Rezeptor der Insulinantwort entgegenwirkt, geht mit Ergebnissen aus früheren Studien einher. Allerdings wurde dort der zugrunde liegende Mechanismus noch nicht aufgeklärt. In Astrozyten und Muskelzellen hemmten Agonisten, die an G_q -Protein gekoppelte Rezeptoren binden, die insulinvermittelte Aktivierung der PI3K (BATTY & DOWNES 1996; FOLLI et al. 1997; VELLOSO et al. 1996). In Hepatozyten hatten G_q -Protein gekoppelte Rezeptoren durch die Inaktivierung der Glykogensynthese und die Aktivierung der Gluconeogenese ebenfalls antagonistische Auswirkungen auf den insulinvermittelten Effekt (HUTSON et al. 1976).

In der folgenden Abbildung sind die möglichen Mechanismen dargestellt, über die in der vorliegenden Arbeit EP1-R-abhängig wahrscheinlich das Insulinsignal moduliert wurde.

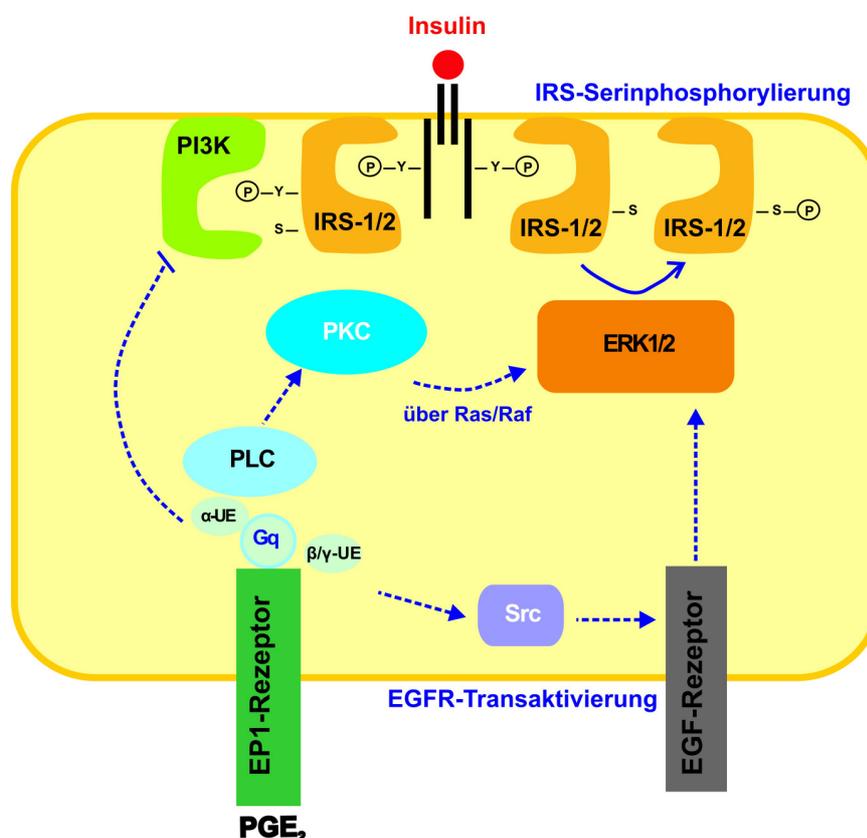


Abbildung 46: Modell über die Mechanismen der EP1-vermittelten Modulation der Insulinsignalgebung durch PGE_2

Der EP1-Rezeptor führt über die Kopplung an G_q -Proteine zur Aktivierung der PKC, die durch die Aktivierung von ERK1/2 zur Blockierung des Insulinsignals beiträgt. Durch die $\text{G}_{q\beta\gamma}$ -Untereinheiten kann auch der EGFR transaktiviert werden, dies führt ebenso zu einer ERK1/2-Aktivierung. Die G_α -Untereinheit kann auch die PI3K binden und somit ihre weitere Signalübertragung verhindern.

5.1.2 Modulation über den EP3 β -Rezeptor

Der Hauptsignalweg von PGE₂ über seinen EP3-R resultiert in der Hemmung der Adenylatzyklase über ein G_i-gekoppeltes Protein (siehe 1.4). Das inhibitorische G-Protein verringert die cAMP-Konzentration und unterdrückt somit die Aktivierung der PKA (siehe Abb. 47). Daneben bleibt durch die verringerte cAMP-Konzentration auch die Aktivierung von Epac (*exchange protein activated by cAMP*), einem weiteren cAMP-Effektor neben der PKA, aus (KAWASAKI et al. 1998). Epac fungiert als GTP-Austauschfaktor für die kleine GTPase Rap1 (DE ROOIJ et al. 1998). Epac kann die Kinase Akt stimulieren (MEI et al. 2002). Die Hemmung von Epac über den G_i-gekoppelten EP3 β -R könnte einen Beitrag zur PGE₂-vermittelten Hemmung der insulinstimulierten Akt-Phosphorylierung leisten (Abb. 13C).

Über die β -Isoform des EP3-R ist die Signalgebung von PGE₂ aber auch an ein G_q-Protein gekoppelt, wodurch die PLC aktiviert wird (siehe 1.4). Die Aktivierung der PLC führt, wie bereits beschrieben, zu einer Aktivierung von ERK1/2, die in den HepG2-EP3 β -Zellen nach Insulinstimulation auch beobachtet wurde (Abb. 15C). Allerdings hob die Behandlung der Zellen mit dem PKC-Inhibitor BIM die PGE₂-vermittelte Hemmung der insulinstimulierten Akt-Phosphorylierung nicht auf (Abb. 20A), so dass dieses Enzym an der EP3-R-abhängigen Unterbrechung des Insulinsignals nicht beteiligt war. ERK1/2 kann aber auch über die für alle EP-Rezeptoren charakteristische Transaktivierung des EGF-Rezeptors aktiviert werden. Die Behandlung der HepG2-EP3 β -Zellen mit dem MEK-Inhibitor PD98059 hemmte zwar die PGE₂-abhängige ERK1/2-Phosphorylierung stark (Abb. 20B), hob jedoch ebenfalls die PGE₂-vermittelte Hemmung der insulinstimulierten Akt-Phosphorylierung nicht auf (Abb. 20A). Der weitaus wirksamere MEK-Inhibitor U0126 jedoch hemmte die ERK1/2-Phosphorylierung fast komplett und verhinderte die PGE₂-vermittelte Hemmung der insulinstimulierten Akt-Phosphorylierung (Abb. 21). Dieses Ergebnis spricht der PGE₂-abhängigen Aktivierung der Serinkinase ERK1/2-Kinase eine bedeutende Rolle bei der PGE₂-vermittelten Unterbrechung des Insulinsignals zu. Die Unterbrechung des Insulinsignals konnte in den HepG2-EP3 β -Zellen durch eine gesteigerte PGE₂-abhängige Steigerung der insulinabhängigen Serinphosphorylierung des IRS beobachtet werden (Abb. 17C). Dies ist im Einklang mit bereits publizierten Ergebnissen der Arbeitsgruppe (HENKEL et al. 2009).

Die PGE₂-abhängige Aktivierung der Kinase mTOR kann ebenfalls durch IRS-Serinphosphorylierung das Insulinsignal blockieren. Zwar steigerte PGE₂ in den HepG2-EP3 β -Zellen die mTOR-Phosphorylierung (Abb. 16C), jedoch ist der Beitrag der PGE₂-vermittelten mTOR-Phosphorylierung zur Hemmung des Insulinsignals nicht eindeutig, da die PGE₂-Vorinkubation die insulinstimulierte mTOR-Phosphorylierung nicht weiter steigerte.

Eine Akt-vermittelte mTOR-Aktivierung (MATHENY & ADAMO 2009) durch PGE₂ ist sehr unwahrscheinlich, da PGE₂ die insulinstimulierte Akt-Phosphorylierung in den HepG2-EP3β-Zellen hemmte. Der Mechanismus, wie PGE₂ über den EP3β-R mTOR aktivieren konnte, ist bislang noch unklar.

Die folgende Abbildung gibt einen Überblick über die Mechanismen über die in der vorliegenden Arbeit EP3β-vermittelt wahrscheinlich das Insulinsignal moduliert wurde.

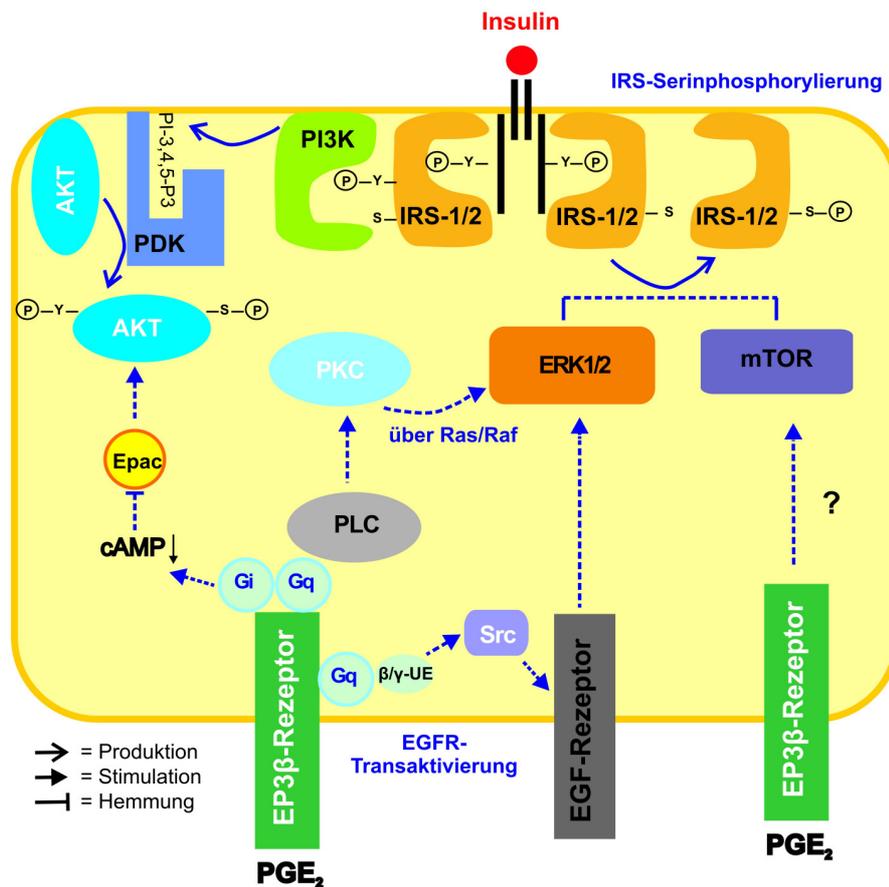


Abbildung 47: Modell über die Mechanismen der EP3β-vermittelten Modulation der Insulinsignale durch PGE₂

Durch die primäre Kopplung des EP3β-R an ein G_i-Protein wird der cAMP-Effektor Epac gehemmt. Dies resultiert in einer verminderten Epac-vermittelten Aktivierung von Akt. Die G_q-Kopplung des EP3β-R führt zur Aktivierung der PKC und ERK1/2. Die G_i- und G_q-vermittelte Transaktivierung des EGFR resultiert ebenfalls in einer ERK1/2-Aktivierung. Die Serin/Threoninkinasen ERK1/2 kann IRS-Proteine an kritischen Serinresten phosphorylieren und somit das Insulinsignal blockieren. Über einen bislang unbekanntem Mechanismus wurde mTOR EP3-R-abhängig aktiviert. Die Kinase mTOR kann ebenfalls durch Serinphosphorylierung das Insulinsignal negativ modulieren.

5.1.3 Modulation über den EP2- und EP4-Rezeptor

Die Signalgebung von PGE₂ über den EP2-R und den EP4-R erfolgt in beiden Fällen hauptsächlich über ein G_s-gekoppeltes Protein, wodurch die Adenylatzyklase aktiviert wird und die intrazelluläre cAMP-Konzentration steigt (siehe 1.4). Die durch cAMP-aktivierte PKA hat einen hemmenden Effekt auf die Kinase Akt (KIM et al. 2001) (siehe Abb. 48), die durch eine Blockierung der Bindung zwischen der PDK1 und Akt vermittelt wird. Diese G_s-gekoppelte Hemmung von Akt könnte zur Hemmung der insulinstimulierten Akt-Phosphorylierung durch PGE₂ beitragen, die in den HepG2-EP4-Zellen (Abb. 13D) und den Fh-hTert-Zellen (Abb. 24A) beobachtet wurde. Die Tatsache, dass der EP2-R stärker an die cAMP-Bildung gekoppelt ist (siehe 1.4), ist wohl der Grund dafür, dass die Hemmung der insulinstimulierten Akt-Phosphorylierung in den Fh-hTert-Zellen, die neben dem EP4-R auch den EP2-R exprimierten, deutlich stärker war als in den HepG2-EP4-Zellen.

Der EP4-R, nicht jedoch der EP2-R, kann über eine G_i-gekoppelte Signalübertragung die PI3K und ERK1/2- aktivieren (siehe 1.4). Die EP4-R-abhängige ERK1/2-Phosphorylierung wurde in den HepG2-EP4-Zellen (Abb. 15D) im Gegensatz zu den Fh-hTert-Zellen beobachtet. In den Fh-hTert-Zellen hemmte PGE₂ die insulinstimulierte ERK1/2-Phosphorylierung signifikant (Abb. 24B), wie es bei keiner der stabil transfizierten HepG2-Zellen zu beobachten war (Abb. 15). Dies ist somit ein EP2-R-spezifischer Effekt und wohl darauf zurückzuführen, dass die EP2-R-abhängige massive Aktivierung der PKA die ERK1/2-Phosphorylierung in den Fh-hTert-Zellen reduzierte. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die Raf-Phosphorylierung durch die PKA deren Aktivität hemmt und letztendlich zur Hemmung der Raf-vermittelten ERK1/2-Aktivierung führt (DHILLON et al. 2002; SIDOVAR et al. 2000). Befunde in der eigenen Arbeitsgruppe deuten daraufhin, dass eine Hemmung der PKA zwar die insulinabhängige Akt-Phosphorylierung verstärkt, jedoch die PGE₂-vermittelte Hemmung der insulinstimulierten Akt-Phosphorylierung nicht aufhebt. Daher scheint neben der PKA-abhängigen Hemmung der intrazellulären Weiterleitung des Insulinsignals über Akt noch ein weiterer paralleler Weg die insulinstimulierte Aktivierung von Akt unterdrücken zu können.

Die PGE₂-vermittelte Aktivierung von ERK1/2 in den HepG2-EP4-Zellen könnte neben der PKA-unabhängigen Aktivierung auch zusätzlich durch die EGFR-Transaktivierung erzielt worden sein. Die Betrachtung der Ergebnisse, in denen die HepG2-EP4-Zellen mit Inhibitoren behandelt wurden, lässt aufgrund der unter 4.3.3 beschriebenen Problematik keine Beurteilung über die Beteiligung der beeinflussten Zielstrukturen zu. Es kann lediglich die Aussage getätigt werden, dass aufgrund der durch PD98059-vermittelten signifikanten Steigerung der insulinstimulierten Akt-Phosphorylierung (Abb. 22A) der Kinase ERK1/2

eine Beteiligung an der negativen Rückkopplung der Insulinsignalübertragung zugesprochen werden kann.

Die Behandlung der Fh-hTert-Zellen mit dem MEK-Inhibitor PD98059 hemmte nur leicht die insulinstimulierte ERK1/2-Phosphorylierung (Abb. 25B), steigerte jedoch signifikant die insulinstimulierte Akt-Phosphorylierung, ohne deren PGE₂-abhängige Hemmung zu beeinflussen (Abb. 25A). Dies deutet daraufhin, dass ERK1/2 in den Fh-hTert-Zellen, wie auch in den HepG2-EP1-Zellen (siehe 5.1.1), PGE₂-unabhängig das Insulinsignal unterbrechen kann.

In den HepG2-EP4-Zellen steigerte die Vorinkubation mit PGE₂ die Serinphosphorylierung des IRS (Abb. 17D). Innerhalb der Arbeitsgruppe wurde die Serinphosphorylierung der Fh-hTert-Zellen durch die Vorinkubation mit PGE₂ genauer untersucht. In diesen Zellen steigerte PGE₂ nicht die Serinphosphorylierung des IRS (Daten nicht gezeigt), was sicherlich zum Teil auf die fehlende Aktivierung der Serin/Threoninkinase ERK1/2 zurückzuführen ist (Abb. 24B). PGE₂ kann über einen G_s-gekoppelten Rezeptor über die Transaktivierung des TNF-Rezeptors IKK β aktivieren (BANU et al. 2009). Die Serinkinase IKK β könnte ebenfalls einen Beitrag zu der bei den HepG2-EP4-Zellen beobachteten Serinphosphorylierung des IRS leisten. TNF α kann aber auch über die Aktivierung der Kinase IKK β mTOR aktivieren, welche wiederum IRS serinphosphorylieren kann (LEE et al. 2007). Es wurde bereits gezeigt, dass PGE₂ die Expression von NF- κ B positiv regulieren kann (POLIGONE & BALDWIN 2001). Erste Versuche innerhalb der Arbeitsgruppe zeigten mithilfe eines Reporterassays eine deutliche PGE₂-abhängige Aktivierung des NF- κ B-Promotors in den HepG2-EP4-Zellen (Daten nicht gezeigt). Dazu hob die Behandlung der Zellen mit einem IKK β -Inhibitor die Hemmung der insulinstimulierten Akt-Phosphorylierung in diesen Zellen auf (Daten nicht gezeigt). Warum PGE₂ in den Fh-hTert-Zellen den NF- κ B-Promotor nicht aktivieren konnte (Daten nicht gezeigt), ist bislang ungeklärt. Es ist möglich, dass verschiedene Signalwege in den Fh-hTert-Zellen an der negativen Modulation der Insulinsignalübertragung durch PGE₂ beteiligt sind, da in diesen Zellen der EP2-R und der EP4-R exprimiert sind. Hier bedarf es sicherlich weiterer Experimente sowie eine Kombination verschiedener Inhibitoren zur Aufklärung des Mechanismus der PGE₂-vermittelten Hemmung der insulinstimulierten Akt-Phosphorylierung über den EP2-R. Die Anfertigung einer stabil transfizierten HepG2-EP2-Zelllinie ist für die individuelle Untersuchung der Beteiligung des EP2-R an der Hemmung der insulinstimulierten Akt-Phosphorylierung durch PGE₂ unabdingbar.

Die folgende Abbildung stellt die Mechanismen dar, die in der vorliegenden Arbeit EP2-R- und EP4-R-abhängig wahrscheinlich das Insulinsignal modulieren konnten.

Expression der PGE₂-Rezeptoren als die primären Rattenhepatozyten und die stabil transfizierten HepG2-Zellen. Die Höhe des EP-R-Expressionsspiegels in den hier untersuchten neuronalen Zellen ist der EP-R-Expression in den Fh-hTert-Zellen ähnlich.

Die EP-R-Expression in den **SH-SY5Y-Zellen** variierte in Abhängigkeit von ihrem Differenzierungszustand (Abb. 28). SH-SY5Y-Zellen müssen zu einem neuronalen Phänotyp ausdifferenziert werden (siehe 3.1.3). Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die Differenzierung der Zellen zu induzieren. Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) (SPINELLI et al. 1982), Dibutyryl-cAMP (SCHULZE & PEREZ-POLO 1982) und Retinsäure (PAHLMAN et al. 1984) gehören zu den am häufigsten verwendeten Differenzierungsreagenzien. In der vorliegenden Arbeit wurden die SH-SY5Y-Zellen mit Retinsäure ausdifferenziert, da BENOMAR et al. (2005) dieses Protokoll für eine ähnliche Fragestellung herangezogen haben. Die Wahl des geeigneten Differenzierungsreagenz ist jedoch von großer Bedeutung, da abhängig davon unterschiedliche metabolische Signalwege beeinflusst werden. Retinsäure aktiviert den PI3K/Akt-Signalweg, der notwendig für die retinsäureinduzierte Differenzierung der Zellen ist (LÓPEZ-CARBALLO et al. 2002). Aus diesem Grund wurde den Zellen einen Tag vor dem Zellversuch (mit dem Wechsel auf das Kulturmedium III, siehe 3.1.3.1) die Retinsäure entzogen, da die Modulation des PI3K/Akt-Signalweges durch PGE₂ in diesen Zellen untersucht werden sollte. Die Variation der EP-R-Expression in den SH-SY5Y-Zellen könnte zum einen darauf zurückzuführen sein, dass die Retinsäure die Expression der Rezeptoren verändert. Zum anderen könnte die Differenzierung selbst, ein komplexer Prozess, der durch ein Zusammenspiel verschiedener intrazellulärer Komponenten reguliert wird, für die Veränderung der EP-R-Genexpression verantwortlich sein.

Mittels retroviralen Transfers von SV40 T-Ag in primäre hypothalamische Neuronen und anschließender Subklonierung wurde eine Reihe von immortalisierten hypothalamischen Zellmodellen generiert (BELSHAM et al. 2004). **N-41** ist eine dieser hypothalamischen Zelllinien, die für die vorliegende Arbeit als Modellsystem zur Untersuchung der physiologischen Relevanz herangezogen wurde. Sie exprimierten den EP1- und EP4-R (Abb. 33). Die Quantifizierung der EP-Rezeptoren in den **primären hypothalamischen Neuronen** und im adulten Rattenhypothalamus zeigte, dass die Expression der EP-R abhängig vom Differenzierungszustand der Neuronen ist (Abb. 42). Dies konnte bereits bei den durch Retinsäure ausdifferenzierten SH-SY5Y-Zellen beobachtet werden (Abb. 28). Die primären Neuronen wurden nicht mit Retinsäure stimuliert. Da Retinsäure jedoch ein endogener Differenzierungsfaktor für die Entwicklung des Nervensystems darstellt (McCAFFERY & DRÄGER 2000), könnte Retinsäure in den primären Neuronen ebenfalls die EP-R-Expression moduliert haben.

5.2.2 Pathophysiologische Bedeutung in neuronalen Zellen

Für die Untersuchung der Modulation der insulinstimulierten Akt-Phosphorylierung durch PGE_2 wurden differenzierte SH-SY5Y-Zellen, N-41-Zellen und vier Tage lang kultivierte primäre Neuronen verwendet. Obwohl es sich in allen Fällen um immortalisierte bzw. noch nicht vollständig ausdifferenzierte fötale Zellen handelt, konnte die Akt-Phosphorylierung in allen Zelltypen durch Insulin gesteigert werden. Im Gegensatz zu den EP-R-tragenden hepatischen Zellen, hemmte die Vorbehandlung mit PGE_2 in den neuronalen Zellen die insulinstimulierte Akt-Phosphorylierung nicht. Bei den **SH-SY5Y**-Zellen konnte allerdings innerhalb der Gesamtzahl aller Versuche ein Unterschied festgestellt werden (Abb. 31): bei der einen Hälfte der Versuche hemmte PGE_2 die insulinstimulierte Akt-Phosphorylierung deutlich (Abb. 31C), bei der anderen Hälfte steigerte die PGE_2 -Vorinkubation dagegen die insulinstimulierte Akt-Phosphorylierung signifikant (Abb. 31D). Hierfür könnte eine unterschiedliche EP-Rezeptorexpression verantwortlich gewesen sein. Es ist denkbar, dass in den Zellen, in denen eine Hemmung der insulinstimulierten Akt-Phosphorylierung beobachtet werden konnte, vermehrt die EP-R exprimiert waren, über die PGE_2 in den stabil transfizierten HepG2-Zellen eine starke Hemmung hervorgerufen hatte, wie zum Beispiel der EP3 β -R. In den Versuchen, in denen dagegen die insulinstimulierte Akt-Phosphorylierung gesteigert war, könnten insgesamt alle EP-R herunterreguliert gewesen sein oder, was wahrscheinlich erscheint, die Expression der assoziierten G-Proteine durch Retinsäure moduliert worden sein. Retinsäurebehandlung der SH-SY5Y-Zellen für sechs Tage induzierte die Expression inhibitorischer Untereinheiten der G-Proteine und reprimierte die Expression stimulatorischer Untereinheiten, was zu funktionellen Veränderungen der Signalweiterleitung über G-Protein gekoppelte Rezeptoren führen kann (AMMER & SCHULZ 1994). Die mit Retinsäure kultivierten SH-SY5Y-Zellen sind als Modellsystem zur Untersuchung der pathophysiologischen Relevanz nicht geeignet, da Retinsäure zusätzlich zur durch die Differenzierung veränderten Expression der EP-R die Expression der G-Protein Untereinheiten verändert. Zur Überprüfung der Expression der PGE_2 -Rezeptoren müssten parallel zu jedem Zellversuch Zellkulturschalen für die RNA-Isolierung mit herangezogen werden, um die EP-R Expression zu überprüfen. Darüber hinaus müsste gleichzeitig, zum Beispiel mittels Western-Blot-Analyse, das Vorhandensein der verschiedenen G-Protein Untereinheiten überprüft werden.

Die getrennte Betrachtung der D2- und D7-differenzierten Zellen zeigte eine leichte, nicht signifikante PGE_2 -vermittelte Hemmung der insulinstimulierten Akt-Phosphorylierung in den D7-differenzierten Zellen im Gegensatz zu den D2-differenzierten Zellen (Abb. 31b).

Es konnte jedoch keine eindeutige Abhängigkeit der Modulation der insulinstimulierten Akt-Phosphorylierung durch PGE₂ vom Differenzierungstag festgestellt werden.

Die Hemmung der insulinstimulierten ERK1/2-Phosphorylierung durch PGE₂ in den SH-SY5Y-Zellen ist bislang ungeklärt. Diese Hemmung wurde auch in den Fh-hTert-Zellen beobachtet, dort wurde sie auf die Signalgebung über den EP2-R zurückgeführt (siehe 5.1.3). Da der EP2-R in den SH-SY5Y-Zellen am stärksten exprimiert war (Abb. 28), ist es möglich, dass die Signalgebung über diesen Rezeptor die insulinstimulierte ERK1/2-Phosphorylierung hemmte. Allerdings würde dies nicht mit der Erkenntnis übereinstimmen, dass Retinsäure die stimulatorischen Untereinheiten der G-Proteine herunterreguliert (AMMER und SCHULZE 1994).

Die Vorinkubation mit PGE₂ hatte in den **N-41-Zellen** keinen Einfluss auf die insulinstimulierte Akt-Phosphorylierung, hemmte jedoch leicht, wenn auch nicht signifikant, die insulinstimulierte ERK1/2-Phosphorylierung (Abb. 36). Da diese Zellen ausschließlich den EP1- und den EP4-R exprimierten (Abb. 33), könnte man in Anlehnung an die Ergebnisse aus den HepG2-Zellen (siehe 5.1) davon ausgehen, dass die Vorinkubation mit PGE₂ zu einer Hemmung der insulinstimulierten Akt-Phosphorylierung und einer Steigerung der insulinabhängigen ERK1/2-Phosphorylierung führt. Dies war hier jedoch nicht der Fall und ist eventuell in dem niedrigen EP-R-Expressionsniveau der N-41-Zellen im Gegensatz zu den untersuchten stabil EP-R-überexprimierenden Hepatomzellen begründet. Es könnte sein, dass die niedrigen Expressionsspiegel der EP-R nicht ausreichten, um die insulinstimulierte Akt-Phosphorylierung zu modulieren, was allerdings den Ergebnissen aus den Fh-hTert-Zellen widerspricht, da die Expressionsspiegel der EP-R in diesen Zellen ebenfalls gering waren. Die Hemmung der insulinstimulierten Akt-Phosphorylierung und die Hemmung der insulinstimulierten ERK1/2-Phosphorylierung wurde in den Fh-hTert-Zellen der Signalübertragung über den EP2-R zugeschrieben. Dieser Rezeptor war jedoch in den N-41-Zellen praktisch nicht exprimiert.

In den N-41-Zellen wurde die Expression von in der Literatur beschriebenen neuronalen Insulinzielgenen, die insulinabhängig durch Akt reguliert werden, erstmalig untersucht. Diese Gene waren weder positiv noch negativ durch Insulin beeinflusst: weder POMC (BENOIT et al. 2002), Fettsäuresynthase (KIM et al. 2007), noch AgRP (SCHWARTZ et al. 2000) wurden durch Insulin reguliert. Dies geht wahrscheinlich mit einem zu geringen Expressionsniveau dieser unterschiedlichen Gene in den N-41-Zellen einher (MAYER et al. 2009). Für die Untersuchung der Regulation dieser Insulinzielgene sind N-43/5 für die POMC-Genexpression (CAI et al. 2007) und N-46 für die AgRP-Genexpression (MAYER et al. 2009) besser geeignet.

In den **primären Neuronen** beeinflusste die Vorinkubation mit PGE₂ weder die insulin-stimulierte Akt-Phosphorylierung, noch die insulinstimulierte ERK1/2-Phosphorylierung (Abb. 45). Diese fehlende Modulation könnte durch den geringen EP-R-Expressions-spiegel begründet werden, der darüber hinaus durch das sich entwickelnde Nervensystem starken Schwankungen unterliegt. Die Zellversuche mit den primären Neuronen wurden bereits am vierten Tag in Kultur durchgeführt, da eine längere Kultivierung der Zellen nicht möglich war, obwohl das vorliegende System eine Situation widerspiegelte, in der die Zellen noch nicht ganz ausdifferenziert waren (Abb. 40). Durch das für die Präparation und Kultivierung herangezogene Protokoll wurde die Kokultivierung primärer Gliazellen weitestgehend verhindert. Jedoch könnten sich vereinzelt Gliazellen in der neuronalen Zellkultur angesiedelt haben, die zu anderen PGE₂-Effekten führen. Gliazellen sind die Hauptregulatoren der angeborenen Immunantwort (CIMINO et al. 2008), synthetisieren selbst PGE₂ und können durch EP2-R-abhängige PKA-Signalgebung BDNF sezernieren, der wiederum selbst zelluläre Signale auslöst (HUTCHINSON et al. 2009).

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass sich die Regulation des Energiegleichgewichts im frühen Entwicklungsstadium von der Situation im adulten Tier unterscheidet. Das Neuropeptidsystem das in diese Regulation involviert ist, entwickelt sich erst zwei bis drei Wochen nach der Geburt (CARLO et al. 2007; DAS 2007). Davor wird die Expression der verschiedenen hypothalamischen Gene reguliert. POMC und das AgRP erreichen ihr Expressionsmaximum erst drei Wochen nach Geburt (AHIMA & HILEMAN 2000). Im Gegensatz zum adulten Tier konnte das Sättigungssignal Leptin im Hypothalamus von weniger als zwei Wochen alten Ratten die Nahrungsaufnahme nicht beeinflussen (PROULX et al. 2002). Diese unterschiedlichen, entwicklungsabhängigen Effekte auf die Nahrungsaufnahme und das Energiegleichgewicht sind ein adaptiver Mechanismus, um die Nahrungsaufnahme während der postnatalen Periode zu optimieren. In diesem kritischen Entwicklungszustand ist der Organismus abhängig von einer ausreichenden Energiezufuhr, die notwendig für Wachstum und Entwicklung ist (AHIMA & HILEMAN 2000). Dass das neuronale System während seiner frühen Entwicklung insensitiv für Sättigungssignale ist, unterstützt das Ergebnis der vorliegenden Arbeit. Die Genexpression von POMC und dem AgRP wurde in den primären Neuronen am vierten Tag in Kultur weder positiv noch negativ durch Insulin beeinflusst. Diese Erkenntnis liefert einen zusätzlichen Beweis dafür, dass die beiden Neuropeptide vor dem zwanzigsten Tag in Kultur nicht so reguliert werden wie im adulten System, da während der Entwicklung des Nervensystems eine ausreichende Energiezufuhr im Vordergrund steht. Von großem Interesse ist, ob und wie diese Neuropeptide zwischen dem vierten und dem zwanzigsten

Tag in Kultur durch Insulin reguliert werden. Hierfür unabdingbar ist eine längere Kultivierungsdauer der primären hypothalamischen Neuronen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass PGE_2 in den untersuchten neuronalen Zelllinien und primären Neuronen nicht wie in der Leber das Insulinsignal negativ moduliert. Man kann dagegen davon ausgehen, dass PGE_2 über seine EP-R synergistisch mit Insulin im Hypothalamus wirkt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass in SH-SY5Y- und N-41-Zellen PGE_2 die Phosphorylierung der Serin/Threoninkinase ERK1/2 hemmte (Abb. 31B/36B). Dies könnte zu einer verringerten Serinphosphorylierung des Insulinrezeptorsubstrats führen, was letztendlich die intrazelluläre Übertragung des Insulinsignals steigert. Dass PGE_2 im Hypothalamus eine insulinähnliche Wirkung hat, wurde bereits in verschiedenen Studien gezeigt. Die PGE_2 -Signalgebung über den EP4-R hemmte die Nahrungsaufnahme (OHINATA et al. 2006), während diese in EP3-*knockout*-Mäusen gesteigert war (SANCHEZ-ALAVEZ et al. 2006).

5.2.3 Pathophysiologische Bedeutung im peripheren Gewebe

PGE_2 wird als Reaktion auf proinflammatorische Zytokine aus verschiedenen Geweben von Zellen freigesetzt, deren Aufgabe nicht ausschließlich die Zytokinfreisetzung ist. Es wirkt auto- und parakrin (THOMAS & BALKWILL 1991). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine langfristige Exposition mit PGE_2 die hepatische Insulinsignalgebung über alle PGE_2 -Rezeptoren negativ beeinflusst und somit zur Insulinresistenz beiträgt. Bei Erkrankungen, die mit einer akuten oder chronischen Entzündung einhergehen, kann PGE_2 demzufolge die Ausbildung des Diabetes mellitus Typ II fördern. Das Krankheitsbild der Adipositas wird häufig von einer unterschweligen Entzündung begleitet und geht mit erhöhten Spiegeln von Entzündungsmarkern wie zum Beispiel $\text{TNF}\alpha$ und IL-6 einher (DAS 2002; siehe auch 1.3). Die negative Wirkung von IL-6 (LAGATHU et al. 2003; SENN et al. 2002) und $\text{TNF}\alpha$ (PLOMGAARD et al. 2005) auf die Insulinsensitivität wurde bereits nachgewiesen. Auch erhöhte PGE_2 -Spiegel korrelieren mit Adipositas (FAIN et al. 2002). Im peripheren Gewebe sind neben dem Fettgewebe selbst auch der Skelettmuskel und die Leber von der adipositasbedingten Entzündung betroffen. Die Insulinresistenz im adipösen Zustand entwickelt sich sukzessiv (DE LUCA & OLEFSKY 2008). Durch die Vergrößerung und Ausdehnung der Fettgewebsmasse, vor allem des intraabdominalen Fettes (DESPRÉS & LEMIEUX 2006), kommt es zur Hypertrophie und Hyperplasie der Adipozyten. Dies übersteigt das lokale Sauerstoffangebot und führt zur Hypoxie. Dadurch werden zelluläre stressbedingte Signalwege induziert, die zur lokalen Entzündung und der Freisetzung von Zytokinen und PGE_2 führen. PGE_2 gelangt nun über den Blutkreislauf in die Leber oder wird im Falle der Steatose (Lipidakkumulation der Leber) von Kupffer Zellen, den lokal ansässigen Makrophagen, in der Leber frei-

gesetzt. Dort kann PGE_2 dann die Insulinsignalübertragung hemmen und zur Ausbildung einer Insulinresistenz beitragen. Die lokalen Entzündungen aus Leber und Fettgewebe tragen dann zur systemischen Entzündung bei, von der auch der Skelettmuskel betroffen ist.

5.3 Modulation der insulinstimulierten Signalwege durch Endocannabinoide

5.3.1 Modulation durch ACEA in N-41-Zellen

Charakteristisch für das Krankheitsbild der Adipositas ist eine Überaktivierung des Endocannabinoidsystems. Diese pathophysiologische Situation sollte *in vitro* durch die Vorinkubation neuronaler Zellen mit Endocannabinoiden nachgestellt werden. Zur Untersuchung der Signalwechselwirkung zwischen dem Insulinsignalweg und der Signalgebung über Endocannabinoide wurde die hypothalamische Zelllinie N-41 herangezogen. Bei dem hierfür verwendeten Endocannabinoidrezeptoragonisten ACEA handelte es sich um einen selektiven CB1-Rezeptoragonisten (HILLARD et al. 1999). Die in der Literatur beschriebene CB1-Rezeptor-abhängige ERK1/2-Aktivierung (BOUABOULA et al. 1995; GALVEROPERH et al. 2002) konnte in den Zellen nicht beobachtet werden (Abb. 38B). Jedoch ist hier zu berücksichtigen, dass es sich bei den Endocannabinoiden um Lipidmediatoren handelt, die durch intrazelluläre Enzyme schnell wieder abgebaut werden. Für die Versuche im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Zellen für 330 min mit ACEA vorinkubiert. Es ist möglich, dass der Endocannabinoidrezeptoragonist während der Vorinkubation abgebaut wurde und dadurch keine ERK1/2-Phosphorylierung induzieren konnte. Gegen die Annahme, dass ACEA durch seinen schnellen Abbau keine Wirkung ausgeübt haben kann, spricht die Steigerung der insulinstimulierten Akt-Phosphorylierung nach Vorinkubation mit ACEA (Abb. 38A). Auch in einer Astrozytenzelllinie, die den CB1-R endogen exprimiert, konnte eine Aktivierung von Akt nachgewiesen werden, die G_i/G_o -Protein-abhängig ist (GOMÉZ DEL PULGAR et al. 2000). Prostatazellen weisen denselben Mechanismus auf (SÁNCHEZ et al. 2003). Aufgrund der in den HepG2-EP3 β -Zellen erzielten Ergebnisse (Abb. 13C), hätte man durch den G_i -gekoppelten CB1-R (FELDER et al. 1995) eine Hemmung der insulinstimulierten Akt-Phosphorylierung erwartet. Der CB1-R ist jedoch nicht ausschließlich an ein G_i -Protein gekoppelt, sondern auch an G_s -Proteine (BONHAUS et al. 1998). Darüber hinaus können Endocannabinoide durch die Kopplung an ein dem G_i -Protein eng verwandtes G_o -Protein verschiedene Ionenkanäle modulieren (DEADWYLER et al. 1995; McALLISTER et al. 1999). Endocannabinoide hemmen spannungsabhängige Calciumkanäle (MACKIE et al. 1993) und aktivieren Kaliumkanäle (MACKIE et al. 1995). Über die Hemmung der spannungsabhängigen Calciumkanäle werden die Freisetzung von Neurotransmittern und die glucoseinduzierte

Insulinausschüttung gehemmt (SAFAYHI et al. 1997). Die Folgen einer verringerten Wirkung des Sättigungssignals Insulin stimmen mit der in der Literatur beschriebenen appetitsteigernden Wirkung von Endocannabinoiden überein (siehe 1.5). Allerdings konnte dieser Effekt im vorliegenden Experiment nicht beobachtet werden. Interessanterweise erzielten MOTAGHEDI & McGRAW (2008) ein identisches Ergebnis. Sie untersuchten den Effekt eines natürlichen CB1-R-Agonisten auf die Insulinsignalgebung in einer Adipozytenzelllinie. Die Inkubation der Zellen mit dem CB1-R-Agonisten allein konnte die Phosphorylierung von Akt nicht beeinflussen, steigerte allerdings die insulinstimulierte Akt-Phosphorylierung, was in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte (Abb. 38A). Dies und die Tatsache, dass Endocannabinoide die Lipogenese in Adipozyten induzieren (COTA et al. 2003b), deuten auf einen insulinsensitivierenden Effekt von Endocannabinoiden hin. Die erhöhten Endocannabinoidspiegel bei Adipositas stellen eventuell einen kompensatorischen Mechanismus dar, um die Insulinwirkung zu verbessern und der Insulinresistenz entgegenzuwirken (MOTAGHEDI & McGRAW 2008).

5.3.2 Pathophysiologische Bedeutung der chronischen Exposition mit ACEA

Die Geschichte des medikamentösen appetitfördernden Einsatzes von Marijuana geht viele Tausend Jahre zurück. Die endogenen Cannabinoide wurden jedoch erst seit etwas mehr als 15 Jahren entdeckt (DEVANE et al. 1992). Obwohl in mehreren Systemen gezeigt wurde, dass Endocannabinoide die insulinabhängige Akt-Phosphorylierung verstärken, konnte beobachtet werden, dass der Missbrauch von Marijuana Glucoseintoleranz und Insulinresistenz induzieren kann (HOLLISTER & REAVEN 1974) und mit einem erhöhten Risiko für Steatose in Verbindung gebracht wird (HÉZODE et al. 2008). Dies ist unter Umständen auf einen indirekten Mechanismus zurückzuführen. Endocannabinoide sind ebenfalls in die Regulation der Nahrungsaufnahme und den Energiemetabolismus involviert (MATIAS & DI MARZO 2007). Die Überaktivierung des Endocannabinoidsystems bei Adipositas geht mit einer gesteigerten Nahrungsaufnahme und einer exzessiven Fettakkumulation einher (ENGELI 2008). Das Endocannabinoidsystem hat durch seine Wirkung auf Regulationszentren des Hypothalamus zentral eine entscheidende Rolle, durch die Expression des CB1-R in peripheren Geweben aber auch einen Einfluss auf Glucosehomöostase, Insulinsensitivität und Plasmalipidspiegel. Die die Adipositas begleitende unterschwellige Entzündung spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des Endocannabinoidsystems (KUNOS et al. 2008). Die dadurch vermittelte Makrophageneinwanderung korreliert mit einer gesteigerten Aktivität des Endocannabinoidsystems im viszeralen Fett von adipösen Patienten (KEMPF et al. 2007), da Makrophagen Endocannabinoide freisetzen können (DI MARZO et al. 1996). Die Erhöhung der

Fettgewebsmasse führt zu einer verringerten Adiponektinfreisetzung (OSEI-HYIAMA et al. 2005; PERWITZ et al. 2006). Adiponektin wird eine insulinsensitivierende Wirkung zugesprochen, die zumindest zum Teil über die Aktivierung der AMPK erzielt wird (YAMAUCHI et al. 2002). AMPK führt zur Tyrosinphosphorylierung des IRS und wirkt somit insulinverstärkend (FISHER 2006). Die appetitfördernde Natur der Endocannabinoidsignalgebung ist eventuell auf die negative Wechselwirkung mit der Adiponektinsignalgebung zurückzuführen. Endocannabinoide haben keine direkten Auswirkungen auf die Adiponektinfreisetzung (PAGANO et al. 2007). Die verringerte Adiponektinkonzentration ist eher ein sekundärer Effekt, der mit der Erhöhung der Fettgewebsmasse einhergeht, die die Folge der appetitsteigernden Wirkung von Endocannabinoiden ist (NOGUEIRAS et al. 2008). Die Aktivierung der CB1-Rezeptoren in der Leber fördert die hepatische Lipogenese und kann eine hepatische Steatose zur Folge haben (GARY-BOBO et al. 2007). CB1-Rezeptoren sind im Skelettmuskel bei Adipositas hochreguliert (PAGOTTO et al. 2006). Die erhöhten Plasmaendocannabinoidspiegel beeinflussen letztendlich die Regulation des Energiemetabolismus im Gehirn (D'EON et al. 2008), da sie leicht die Blut-Hirn-Schranke passieren (MECHOUALM et al. 1998).

Die im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesene insulinsensitivierende Wirkung des Endocannabinoidrezeptoragonisten (siehe 5.3.1.), könnte zunächst die Effizienz des Systems erhöhen. Auf lange Sicht dagegen, also bei einer lang andauernden Aktivierung des Endocannabinoidsystems durch Übergewicht, könnte die insulinsensitivierende Wirkung eine Überaktivierung des Akt-Signalweges hervorrufen, was letztendlich zu einer Herunterregulierung der Insulinwirkung führt. Die daraus resultierende Insulinresistenz führt wiederum zu einer Erhöhung der Endocannabinoidspiegel, da Insulin eine hemmende Wirkung auf die Endocannabinoidproduktion hat (IOZZO 2009). Die durch die Überaktivierung des Endocannabinoidsystems induzierte Insulinresistenz kann die Ausbildung des Diabetes mellitus Typ II fördern und zur Ausbildung weiterer Krankheiten des metabolischen Syndroms beitragen.

Die insulinsensitivierende Wirkung der Endocannabinoide, die in der vorliegenden Arbeit aufgezeigt wurde, spricht nicht für die Behandlung von insulinresistenten Patienten mit dem Endocannabinoidrezeptorantagonisten Rimonabant. Endocannabinoidrezeptorantagonisten, wie zum Beispiel Rimonabant, sind heute Ziel pharmakologischer Studien für die Adipositas therapie. Rimonabant wurde als Wirkstoff in einem Arzneimittel als Appetitzügler bei Übergewichtigen eingesetzt. Das Medikament wurde aufgrund seiner assoziierten Risiken für Depressionen und Angstzustände 2006 in der Europäischen Union vom Markt genommen. Aus ähnlichen Gründen erhielt Rimonabant 2007 keine Zulassung in den USA (PACHER & STEFFENS 2009).

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die adipositasbedingte Insulinresistenz geht mit einer unterschweligen Entzündungsreaktion einher. Als Antwort auf dieses Entzündungsgeschehen wird PGE_2 unter anderem von Kupfer Zellen der Leber freigesetzt und kann seine Wirkung über vier PGE_2 -Rezeptor-subtypen (EP1-EP4) vermitteln. In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass PGE_2 in Rattenhepatozyten über den EP3-R ERK1/2-abhängig die intrazelluläre Weiterleitung des Insulinsignals hemmt. Über die Modulation der Insulinrezeptorsignalkette durch andere EP-Rezeptoren war bisher nichts bekannt. Daher sollte in stabil transfizierten Zelllinien, die jeweils nur einen der vier EP-Rezeptor-subtypen exprimierten, der Einfluss von PGE_2 auf die Insulinrezeptorsignalkette untersucht werden. Es wurden HepG2-Zellen, die keinen funktionalen EP-Rezeptor aufwiesen, sowie HepG2-Zellen, die stabil den EP1-R (HepG2-EP1), den EP3 β -R (HepG2-EP3 β) oder den EP4-R (HepG2-EP4) exprimierten, sowie die humane fötale Hepatozytenzelllinie, Fh-hTert, die den EP2- und den EP4-R exprimiert, für die Untersuchungen verwendet. Die Zellen wurden für 330 min mit PGE_2 (10 μM) vorinkubiert, um die pathophysiologische Situation nachzustellen und anschließend mit Insulin (10 nM) für 15 min stimuliert. Die insulinabhängige Akt- und ERK1/2-Phosphorylierung wurde im Western-Blot bestimmt.

In allen Hepatomzelllinien die EP-R exprimierten, nicht aber in der Zelllinie, die keinen EP-R exprimiert, hemmte PGE_2 die insulinstimulierte Akt-Phosphorylierung. In allen drei stabil transfizierten Zelllinien, nicht jedoch in den Fh-hTert-Zellen, steigerte PGE_2 die basale und insulinstimulierte Phosphorylierung der Serin/Threoninkinase ERK1/2. In den HepG2-EP1- und den HepG2-EP3 β -Zellen steigerte PGE_2 mutmaßlich über die ERK1/2-Aktivierung die Serinphosphorylierung des IRS, welche die Weiterleitung des Insulinsignals blockiert. Die Hemmung der Aktivierung von ERK1/2 hob in EP3-R-exprimierenden Zellen die Abschwächung der Insulinsignalübertragung teilweise auf. In diesen Zellen scheint die ERK1/2-Aktivierung die größte Bedeutung für die Hemmung der insulinstimulierten Akt-Phosphorylierung zu haben. Da durch die Hemmstoffe die PGE_2 -abhängige Modulation nicht vollständig aufgehoben wurde, scheinen darüber hinaus aber noch andere Mechanismen zur Modulation beizutragen. In den Fh-hTert-Zellen wurde die Insulinrezeptorsignalkette offensichtlich über einen ERK1/2-unabhängigen, bisher nicht identifizierten Weg unterbrochen.

Eine gesteigerte PGE_2 -Bildung im Rahmen der Adipositas ist nicht auf die peripheren Gewebe beschränkt. Auch im Hypothalamus können bei Adipositas Zeichen einer Entzündung nachgewiesen werden, die mit einer gesteigerten PGE_2 -Bildung einhergehen. Daher wurde das EP-R-Profil von primären hypothalamischen Neuronen und neuronalen Modell-

zelllinien charakterisiert, um zu prüfen, ob PGE_2 in hypothalamischen Neuronen die Insulinsignalkette in ähnlicher Weise unterbricht wie in Hepatozyten. In allen neuronalen Zellen hemmte die Vorinkubation mit PGE_2 die insulinstimulierte Akt-Phosphorylierung nicht. In der neuronalen hypothalamischen Zelllinie N-41 wirkte PGE_2 eher synergistisch mit Insulin. In durch Retinsäure ausdifferenzierten SH-SY5Y-Zellen waren die Ergebnisse allerdings widersprüchlich. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Expression der EP-Rezeptoren im Verlauf der Kultur stark schwankte und somit die EP-R-Ausstattung der Zellen zwischen den Zellversuchen variierte. Auch in den primären hypothalamischen Neuronen variierte die EP-R-Expression abhängig vom Differenzierungszustand und PGE_2 beeinflusste die insulinstimulierte Akt-Phosphorylierung nicht. Obwohl in allen neuronalen Zellen die Akt-Phosphorylierung durch Insulin gesteigert wurde, konnte in keiner der Zellen eine insulinabhängige Regulation der Expression von Insulinzielgenen (POMC und AgRP) nachgewiesen werden. Das liegt wahrscheinlich an dem niedrigen Differenzierungsgrad der untersuchten Zellen.

Im Rahmen der Adipositas kommt es zu einer Überaktivierung des Endocannabinoidsystems. Endocannabinoidrezeptoren sind mit den EP-Rezeptoren verwandt. Daher wurde geprüft, ob Endocannabinoide die Insulinsignalweiterleitung in ähnlicher Weise beeinflussen können wie PGE_2 . Die Vorinkubation der N-41-Zellen für 330 min mit einem Endocannabinoidrezeptoragonisten steigerte die insulinstimulierte Akt-Phosphorylierung, was auf einen insulinsensitiven Effekt von Endocannabinoiden hindeutet. Dies steht im Widerspruch zu der in der Literatur beschriebenen endocannabinoidabhängigen Insulinresistenz, die aber auf indirekte, durch Endocannabinoide ausgelöste Veränderungen zurückzuführen sein könnte.

LITERATURVERZEICHNIS

- AGUIRRE V, UCHIDA T, YENUSH L, DAVIS R, WHITE MF (2000): The c-Jun NH₂-terminal Kinase Promotes Insulin Resistance during Association with Insulin Receptor Substrate-1 and Phosphorylation of Ser³⁰⁷. *The Journal of Biological Chemistry* 275 (12), p. 9047-9054.
- AGUIRRE V, WERNER ED, GIRAUD J, LEE YH, SHOELSON SE, WHITE MF (2002): Phosphorylation of Ser307 in Insulin Receptors Substrate-1 Blocks Interactions with the Insulin Receptor and Inhibits Insulin Action. *The Journal of Biological Chemistry* 277 (2), p. 1531-1537.
- AHIMA RS, HILEMAN SM (2000): Postnatal Regulation of Hypothalamic Neuropeptide Expression by Leptin: Implications for Energy Balance and Body Weight Regulation. *Regulatory Peptides* 92 (1-3), p. 1-7.
- AISTON S, COGHLAN MP, AGIUS L (2003): Inactivation of phosphorylase is a major component of the mechanism by which insulin stimulates hepatic glycogen synthesis. *European Journal of Biochemistry* 270 (13), p. 2773-2781.
- ALESSI DR, CUENDA A, COHEN P, DUDLEY DT, SALTIEL AR (1995): PD 098059 Is a specific Inhibitor of the Activation of Mitogen-activated Protein Kinase Kinase *in Vitro* and *in Vivo*. *The Journal of Biological Chemistry* 270 (46), p. 27489-27494.
- ALESSI DR, ANDJELKOVIC M, CAUDWELL B, CRON P, MORRICE N, COHEN P, HEMMINGS BA (1996): Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *The EMBO Journal* 15 (23), p. 6541-6551.
- AMMER H, SCHULZ R (1994): Retinoic Acid-Induced Differentiation of Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells is Associated with Changes in the Abundance of G Proteins. *Journal of Neurochemistry* 62 (4), p. 1310-1318.
- AN S, YANG J, SO SW, ZENG L, GOETZL EJ (1994): Isoforms of the EP3 subtype of human prostaglandin E2 receptor transduce both intracellular calcium and cAMP signals. *Biochemistry* 14496-14502.
- BALLOU LM, CROSS ME, HUANG S, McREYNOLDS EM, ZHANG BX, LIN RZ (2000): Differential Regulation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt and p70 S6 Kinase Pathway by the α_{1A} -Adrenergic Receptor in Rat-1 Fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry* 275 (7), p. 4803-4809.
- BALLOU LM, LIN HY, JIANG YP, LIN RZ (2003): Activated G α_q Inhibits p110 α Phosphatidylinositol 3-Kinase and Akt. *The Journal of Biological Chemistry* 278 (26), p. 23472-23479.
- BANU SK, LEE J, SPEIGHTS VO Jr, STARZINSKI-POWITZ A, AROSH JA (2009): Selective Inhibition of Prostaglandin E2 Receptors EP2 and EP4 Induces Apoptosis of Human Endometriotic Cells Through Suppression of ERK1/2, Akt, NF κ B, and β -Catenin Pathways

- and Activation of Intrinsic Apoptotic Mechanisms. *Molecular Endocrinology* 23 (8), p. 1291-1305.
- BASTARD JP, MAACHI M, LAGATHU C, KIM MJ, CARON M, VIDAL H, CAPEAU J, FEVE B (2006): Recent Advances in the Relationship Between Obesity, Inflammation and Insulin Resistance. *European Cytokine Network* 17, p. 4-12.
- BATTY IH, DOWNES CP (1996): Thrombin receptors modulate insulin-stimulated phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate accumulation in 1321N1 astrocytoma cells. *The Biochemical Journal* 317 (2), p. 347-351.
- BELSHAM DD, CAI F, CUI H, SMUKLER SR, SALAPATEK AM, SHKRETA L (2004): Generation of a Phenotypic Array of Hypothalamic Neuronal Cell Models to Study Complex Neuroendocrine Disorders. *Endocrinology* 145 (1), p. 393-400.
- BENOIT SC, AIR EL, COOLEN LM, STRAUSS R, JACKMAN A, CLEGG DJ, SEELEY RJ, WOODS SC (2002): The Catabolic Action of Insulin in the Brain is Mediated by Melanocortins. *The Journal of Neuroscience* 22 (20), p. 9048-9052.
- BENOMAR Y, ROY AF, AUBOURG A, DJIANE J, TAOUIS M (2005): Cross down-regulation of leptin and insulin receptor expression and signalling in a human neuronal cell line. *Biochemical Journal* 388(3), p. 929-939.
- BIEDLER JL, HELSON L, SPENGLER BA (1973): Morphology and Growth, Tumorigenicity, and Cytogenetics of Human Neuroblastoma Cells in continuous Culture. *Cancer Research* 33, p. 2643-2652.
- BIEDLER JL, ROFFLER-TARLOV S, SCHACHNER M, FREEDMAN LS (1978): Multiple Neurotransmitter Synthesis by Human Neuroblastoma Cell Lines and Clones. *Cancer Research* 38, p. 3571-3757.
- BOMMAKATI RK, VINAYAK S, SIMONDS WF (2000): Dual Regulation of Akt/Protein Kinase B by Heterotrimeric G Protein Subunits. *The Journal of Biological Chemistry* 275 (49), p. 38870-38876.
- BONHAUS DW, CHANG LK, KWAN J, MARTIN GR (1998): Dual Activation and Inhibition of Adenylyl Cyclase by Cannabinoid Receptor Agonists: Evidence for Agonist-Specific Trafficking of Intracellular Responses. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 287 (3), p. 884-888.
- BÖRSCH-HAUBOLD AG, PASQUET S, WATSON SP (1998): Direct Inhibition of Cyclooxygenase-1 and -2 by the Kinase Inhibitors SB 203580 and PD 98059. *The Journal of Biological Chemistry* 273 (44), p. 28766-28772.

- BOTTENSTEIN JE, SATO GH (1979): Growth of rat neuroblastoma cell line in serum-free supplemented medium. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76 (1), p. 514-517.
- BOUABOULA M, POINOT-CHAZEL C, BOURRIÉ B,; CANAT X, CALANDRA B, RINALDI-CARMONA M, LE FUR G, CASELLAS P (1995) : Activation of Mitogen-Activated Protein Kinases by Stimulation of the Central Cannabinoid Receptor CB1. *Biochemical Journal* 312 (2), p. 637-641.
- BOUZAKRI K, ROQUES M, GUAL P, ESPINOSA S, GUEBRE-EGZIABHER F, RIOU JP, LAVILLE M, LE MARCHAND-BRUSTEL Y, TANTI JF, VIDAL H (2003): Reduced Activation of Phosphatidylinositol-3 Kinase and Increased Serine 636 Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate-1 in Primary Culture of Skeletal Muscle Cells From Patients with Type 2 Diabetes. *Diabetes* 52 (6), p. 1319-1325.
- BRADFORD MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, p. 248-254.
- BREINIG M, RIEKER R, EITENEUEN E, WERTENBRUCH T, HAUGG AM, HELMKE BM, SCHIRMACHER P, KERN A (2008): Differential expression of E-prostanoid receptors in human hepatocellular carcinoma. *International Journal of Cancer* 122 (3), p. 547-557.
- BRUUN JM, LIHN AS, VERDICH C, PEDERSEN SB, TOUBRO S, ASTRUP A, RICHELSEN B (2003): Regulation of Adiponectin by Adipose Tissue-Derived Cytokines: In Vivo and In Vitro Investigation in Humans. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 285 (3), p. E527-533.
- BUCHANAN FG, WANG D, BARGIACCHI F, DUBOIS RN (2003): Prostaglandin E₂ Regulates Cell Migration via the Intracellular Activation of the Epidermal Growth Factor Receptor. *The Journal of Biological Chemistry* 278 (37), p. 35451-35457.
- CAI F, GYULKHANDANYAN AV, WHEELER MB, BELSHAM DD (2007): Glucose Regulates AMP-activated Protein Kinase Activity and Gene Expression in Clonal, Hypothalamic Neurons Expressing Proopiomelanocortin: Additive Effects of Leptin or Insulin. *The Journal of Endocrinology* 192 (3), p. 605-614.
- CAO C, MATSUMURA K, YAMAGATA K, WATANABE Y (1996): Endothelial Cells of the Rat Brain Vasculature Express Cyclooxygenase-2 mRNA in Response to Systemic Interleukin-1 beta: A Possible Site of Prostaglandin Synthesis Responsible for Fever. *Brain Research* 733 (2), p. 263-272.

- CAMERON AJ, DE RYCKER M, CALLEJA V, ALCOR D, KJAER S, KOSTELECKY B, SAURIN A, FAISAL A, LAGUERRE M, HEMMING BA, McDONALD N, LARIJANI B, PARKER PJ (2007): Protein kinases, from B to C. *Biochemical Society Transactions* 35 (5), p. 1013-1017.
- CARDOSO S, CORREIA S, SANTOS RX, CARVALHO C, SANTOS MS, OLIVEIRA CR, PERRY G, SMITH MA, ZHU X, MOREIRA PI (2009): Insulin is a Two-Edged Knife on The Brain. *Journal of Alzheimer's Disease* (18), p. 483-507.
- CARLO AS, PYRSKI C, LOUDES C, FAIVRE-BAUMAN A, EPELBAUM J, WILLIAMS LM, MEYERHOF W (2007): Leptin Sensitivity in the Developing Rat Hypothalamus. *Endocrinology* 148(12), p. 6073-6082.
- CHA YI, SOLNICA-KREZEL L, DuBOIS RN (2006): Fishing for Prostanoids: Deciphering the Developmental Functions of Cyclooxygenase-Derived Prostaglandins. *Developmental Biology* 289 (2), p. 263-272.
- CHANG L, CHIANG S-H, SALTIEL AR (2004): Insulin Signaling and the Regulation of Glucose Transport. *Molecular Medicine* 10, p. 65-71.
- CHEATHAM B, KAHN R (1995): Insulin Action and the Insulin Signaling Network. *Endocrine Reviews* 16(2), p. 117-142.
- CHO H, MU J, KIM JK, THORVALDSEB JL, CHU Q, CRENSHAW EB, KAESTNER KH, BARTOLOMEI MS, SHULMAN GI, BIRNBAUM MJ (2001): Insulin Resistance and Diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt 2 (PKB β). *Science* 292 (5522), p. 1728-1731.
- CHRISTIE MJ, VAUGHAN CW (2001): Neurobiology. Cannabinoids Act Backwards. *Nature* 410 (6828), p. 527-530.
- CIMINO PJ, KEENE CD, BREYER RM, MONTINE KS, MONTINE TJ (2008): Therapeutic Targets in Prostaglandin E2 Signaling for Neurologic Disease. *Current Medical Chemistry* 15 (19), p. 1863-1869.
- COLEMAN RA, SMITH WL, NARUMIYA AS (1994): Classification of Prostanoid Receptors: Properties, Distribution, and Structure of the Receptors and Their Subtypes. *Pharmacological Reviews* 46 (2), p. 206-229.
- COTA D, MARSICANO G, LUTZ B, VICENNATI V, STALLA GK, PASQUALIS R, PAGOTTO U (2003a): Endogenous cannabinoid system as a modulator of food intake. *International Journal of Obesity* 27, p. 289-301.

- COTA D, MARSICANO G, TSCHÖP M, GRÜBLER Y, FLACHSKAMM C, SCHUBERT M, AUER D, YASSOURIDIS A, THÖNE-REINEKE C, ORTMANN S, TOMASSONI F, CERVINO C, NISOLI E, LINTHORST AC, PASQUALI R, LUTZ B, STALLA GK, PAGOTTO U (2003b): The Endogenous Cannabinoid System Affects Energy Balance via Central Orexigenic Drive and Peripheral Lipogenesis. *The Journal of Clinical Investigation* 112 (3), p. 423-431.
- COTA D (2007): CB1 receptors: emerging evidence for central and peripheral mechanisms that regulate energy balance, metabolism, and cardiovascular health. *Diabetes/Metabolism and Research and Reviews* 23 (7), p. 507-517.
- CROSS DA, ALESSI DR, COHEN P, ANDJELKOVICH M, HEMMINGS BA (1995): Inhibition of Glycogen Synthase Kinase-3 by Insulin mediated by Protein Kinase B. *Nature* 378 (6559), p. 785-789.
- DAS UN (2002): Is Metabolic Syndrome X an Inflammatory Condition? *Experimental Biology and Medicine* 227 (11), p. 989-997.
- DAS UN (2007): Is metabolic syndrome X a disorder of the brain with the initiation of low-grade systemic inflammatory events during the perinatal period? *The Journal of Nutritional Biochemistry* 18 (11), p. 701-713.
- DAS UN (2009): Obesity: Genes, Brain, Gut, and Environment. *Nutrition [Epub ahead of print]*
- DATTA SR, DUDEK H, TAO X, MASTERS S, FU H, GOTOH Y, GREENBERG ME (1997): Akt Phosphorylation of BAD Couples Survival Signals to the Cell-Intrinsic Death Machinery. *Cell* 91 (2), p. 231-241.
- DEADWYLER SA, HAMPSON RE, MU J, WHYTE A, CHILDERS S (1995): Cannabinoids Modulates Voltage Sensitive Potassium A-Curren in Hippocampal Neurons via a cAMP-dependent Process. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 273 (2), p. 734-743.
- DE FEA K, ROTH RA (1997): Modulation of Insulin Receptor Substrate-1 Tyrosine Phosphorylation and Fncion by Mitogen-activated Protein Kinase. *The Journal of Biological Chemistry* 272 (50), p. 31400-31406.
- DE LUCA C, OLEFSKY JM (2008): Inflammation and Insulin Resistance. *FEBS Letters* 582 (1), p. 97-105.
- DENT P, REARDON DB, PARK JS, BOWERS G, LOGSDON C, VALERIE K, SCHMIDT-ULLRICH R (1999): Radiation-induced Release of Transforming Growth Factor α Activates the Epidermal Growth Factor Receptor and Mitogen-activated Protein Kinase Pathway in Carcinoma Cells, Leaing to Increased Proliferation and Protection from Radiation-induced Cell Death. *Molecular Biology of the Cell* 10 (8), p. 2493-2506.

- D'EON TM, PIERCE KA, ROIX JJ, TYLER A, CHEN H, TEIXEIRA SR (2008): The Role of Adipocyte Insulin Resistance in the Pathogenesis of Obesity-Related Elevations in Endocannabinoids. *Diabetes* 57 (5), p. 1262-1268.
- DERIJK R, BERKENBOSCH F (1991): The immune-hypothalamo-pituitary-adrenal axis and autoimmunity. *The International Journal of Neuroscience* 59 (1-3), p. 91-100.
- DE ROOIJ J, ZWARTKRUIS FJ, VERHEIJEN ME, COOL RH, NIJMAN SM, WITTINGHOFER A, BOS JL (1998): Epac is a Rap1 Guanine-Nucleotide-Exchange Factor Directly Activated by cyclic AMP. *Nature* 396 (6710), p. 474-477.
- DESAI S, ASHBY B (2001): Agoist-Induced Internalization and Mitogen-Activated Protein Kinase Activation of the Human Prostaglandin EP4 Receptor. *FEBS Letters* 501 (2-3), p. 156-160.
- DESPRÉS JP, LEMIEUX I (2006): Abdominal Obesity and Metabolic Syndrome. *Nature* 444 (7121), p. 881- 887.
- DEVANE WA, HANUS L, BREUER A, PERTWEE RG, BRIDGES AJ, STEVENSON LA, GRIFFIN G, GIBSON D, MANDELBAUM A, ETINGER A, MECHOULAM R (1992): Isolation and Structure of a rain constituent that binds to the Cannabinoid Receptor. *Science* 258 (5090), p. 1946-1949.
- DHILLON AS, POLLOCK C, STEEN H, SHAW PE, MISCHAK H, KOLCH W (2002): Cyclic AMP-Dependent Kinase Regulates Raf-1 Kinase Mainly by Phosphorylation of Serine 259. *Molecular and Cellular Biology* 22 (10), p. 3237-3246.
- DIEHL AM (2002): Nonalcoholic Steatosis and Steatohepatitis IV. Nonalcoholic Fatty Liver Disease Abnormalities in Macrophage Function and Cytokines. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 282, p. G1-G5.
- DI MARZO V, DE PETROCELLIS L, SEPE N, BUONO A (1996): Biosynthesis of Anandamide and Related Acylethanolamides in mouse J774 Macrophages and N18 Neuroblastoma Cells. *The Biochemical Journal* 316 (3), p. 977-984.
- DI MARZO V, GOPARAJU SK, WANG L, LIU J, BÁTKAI S, JÁRAI Z, FEZZA F, MIURA GI, PALMITER RD, SUGIURAK T, KUNOS G (2001): Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature* 410 (6830), p. 822-825.
- DOWER WJ, MILLER JF, RAGSDALE CW (1988): High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research* 16 (13), p. 6127-6145.
- DUCKWORTH BC, CANTLEY LC (1997): Conditional Inhibition of the Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade by Wortmannin. Dependence on Signal Strength. *The Journal of Biological Chemistry* 272 (44), p. 27665-27770.

- DUDLEY DT, PANG L, DECKER SJ, BRIDGES AJ, SALTIEL AR (1995): A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92, p. 7686-7689.
- DUMMLER B, HEMMINGS BA (2007): Physiological roles of PKB/Akt isoforms in development and disease. *Biochemical Society Transactions* 35 (2), p. 231-235.
- EGUCHI N, HAYASHI H, URADE Y, ITO S, HAYASHO O (1988): Central Action of Prostaglandin E2 and its Methyl Ester in the Induction of Hyperthermia after their systemic Administration in Urethane-Anesthetized Rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 247 (2), p. 671-679.
- ENGELI S, BÖHNKE J, FELDPAUSCH M, GORZELNIAK K, JANKE J, BÁTKAI S, PACHER P, HARVEY-WHITE J, LUFT FC, SHARMA AM, JORDAN J (2005): Activation of the Peripheral Endocannabinoid System in human Obesity. *Diabetes* 54 (10), p. 2838-2843.
- ENGELI S (2008): The Endocannabinoid System, Obesity, and Insulin Resistance. *Current Cardiovascular Risk Reports* 2, p. 72-78.
- ERLICH HA, GELFAND D, SNINSKY JJ (1991): Recent Advances in the Polymerase Chain Reaction. *Science* 252 (5013), p. 1643-1651.
- EVANS JL, GODFINE D, MADDUX BA, GRODSKY GM (2003): Are Oxidative Stress-Activated Signaling Pathways Mediators of Insulin Resistance and β -Cell Dysfunction? *Diabetes* 52, p. 1-8.
- FACCHINETTI V, OUYANG W, WEI H, SOTO N, LAZORCHAK A, GOULD C, LOWRY C, NEWTON AC, MAO Y, MIAO RQ, SESSA WC, QIN J, ZHANG P, SU B, JACINTO E (2008): The mammalian target of rapamycin complex 2 controls folding and stability of Akt and protein kinase C. *The EMBO Journal* 27 (14), p. 1932-1943.
- FAIN JN, LEFFLER CW, BAHOUTH SW, RICE AM, RIVKEES SA (2000): Regulation of leptin release and lipolysis by PGE₂ in rat adipose tissue. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 62 (4), p. 343-350.
- FAIN JN, KANU A, BAHOUTH SW, COWAN GSM Jr, HILER ML, LEFFLER CW (2002): Comparison of PGE₂, prostacyclin and leptin release by human adipocytes versus explants of adipose tissue in primary culture. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 67 (6), p. 467-473.
- FAN G, BALLOU LM, LIN RZ (2003): Phospholipase C-independent Activation of Glycogen Synthase-3 β and C-terminal Src Kinase by G α_q . *The Journal of Biological Chemistry* 278 (52), p. 52432-52436.

- FAVATA MF, KURUMI YH, MANOS EJ, DAULERIO AJ, STRADLEY DA, FEESER WS, VAN DYK DE, PITTS WJ, EARL RA, HOBBS F, COPELAND RA, MAGOLDA RL, SCHERLE PA, TRZASKOS JM (1998): Identification of a Novel Inhibitor of Mitogen-activated Protein Kinase Kinase. *The Journal of Biological Chemistry* 273 (29), p. 18623-18632.
- FELDER CC, JOYCE KE, BRILEY EM, MANSOURI J, MACKIE K, BLOND O, LAI Y, MA AL, MITCHELL RL (1995): Comparison of the Pharmacology and Signal Transduction of the Human Cannabinoid CB1 and CB2 Receptors. *Molecular Pharmacology* 48 (3), p. 443-450.
- FENNEKOHL A, SCHIEFERDECKER HL, JUNGERMANN K, PÜSCHEL GP (1999): Differential expression of prostanoid receptors in hepatocytes, Kupffer cells, sinusoidal endothelial cells and stellate cells of rat liver. *Journal of Hepatology* 30, p. 38-47.
- FENNEKOHL A, LUCAS M, PÜSCHEL GP (2000): Induction by Interleukin 6 of G_s-coupled Prostaglandin E₂ Receptors in Rat Hepatocytes Mediating a Prostaglandin E₂-Dependent Inhibition of the Hepatocyte's Acute Phase Response. *Hepatology* 1 (5), p. 1128-1134.
- FISHER JS (2006): Potential Role of the AMP-Activated Protein Kinase in Regulation of Insulin Action. *Cellscience* 2 (3), p. 68-81.
- FOLLI F, KAHN CR, HANSEN H, BOUCHIE JL, FEENER EP (1997): Angiotensin II Inhibits Insulin Signaling in Aortic Smooth Muscle Cells at Multiple Levels. A Potential Role for Serine Phosphorylation in Insulin/Angiotensin II Crosstalk. *The Journal of Clinical Investigation* 100 (9), p. 2158-2169.
- FUJINO H, WEST KA, REGAN JW (2002): Phosphorylation of Glykogen Synthase Kinase-3 and Stimulation of T-Cell Factor Signaling Following Activation of EP2 and EP4 Prostanoid Receptors by Prostaglandin E2. *The Journal of Biological Chemistry* 277 (4), p. 2614-2619.
- FUJINO H, REGAN JW (2003): Prostanoid Receptors and Phosphatidylinositol 3-Kinase: A Pathway to Cancer? *Trends in Pharmacological Science* 24 (7), p. 335-340.
- FUJINO H, SALVI S, REGAN JW (2005): Differential Regulation of Phosphorylation of the cAMP Response Element-Binding Protein After Activation of EP2 and EP4 Prostanoid Receptors by Prostaglandin E2. *Molecular Pharmacology* 68, p. 251-259.
- FUJINO H, REGAN JW (2006): EP₄ Prostanoid Receptor Coupling to a Pertussis Toxin-Sensitive Inhibitory G Protein. *Molecular Pharmacology* 69, p. 5-10.
- FUNK CD (2001): Prostaglandins and Leukotrienes: Advances in Eicosanoid Biology. *Science* 294 (5548), p. 1871-1875.
- GALIÈGUE S, MARY S, MARCHAND J, DUSSOSSOY D, CARRIÈRE D, CARAYON P, BOUABOULA M, SHIRE D, LE FUR G, CASELLAS P (1995) : Expression of Central and Peripheral Cannabinoid Receptors in Human Immune Tissues and Leukocyte Subpopulations. *European Journal of Biochemistry* 232 (1), p. 54-61.

- GALVE-ROPERH I, RUEDA D, GÓMEZ DEL PULGAR T, VELASCO G, GUZMÁN M (2002): Mechanism of Extracellular Signal-Regulated Kinase Activation by the CB₁ Cannabinoid Receptor. *Molecular Pharmacology* 62 (6), p. 1385-1392.
- GAO Z, HWANG D, BATAILLE F, LEFEVRE M, YORK D, QUON MJ, YE L (2002): Serine Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate 1 by Inhibitor κ B Kinase Complex. *The Journal of Biological Chemistry* 277 (50), p. 48115-48121.
- GAONI Y, MECHOULAM R (1964): Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. *Journal of the American Chemical Society* 86, p. 1646-1647.
- GARY-BOBO M, ELACHOURI G, GALLAS JF, JANIAC P, MARINI P, RAVINET-TRILLOU C, CHABBERT M, CRUCCIOLI N, PFERSDORFF C, ROQUE C, ARNONE M, CROCI T, SOUBRIÉ P, OURY-DONAT F, MAFFRAND JP, SCATTON B, LACHERETZ F, LE FUR G, HERBERT JM, BENSALID M (2007): Rimonabant Reduces Obesity-Associated Hepatic Steatosis and Features of Metabolic Syndrome in Obese Zucker fa/fa Rats. *Hepatology* 46 (1), p. 122-129.
- GRAHAM FL, VAN DER EB AJ (1973): Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology* 54(2), p. 536-539.
- GUAL P, LE MARCHAND-BRUSTEL Y, TANTI JF (2005): Positive and negative regulation of insulin signalling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie* 87 (1), p. 99-109.
- HALLSCHMID M, BENEDICT C, SCHULTES B, BORN J, KERN W (2008): Obese men respond to cognitive but not to catabolic brain insulin signalling. *International Journal of Obesity* 32 (2), p. 275-282.
- HALLSCHMID M, SCHULTES B (2009): Central nervous insulin resistance: a promising target in the treatment of metabolic and cognitive disorders? *Diabetologica* 52 (11), p. 2264-2269.
- HANADA M, FENG J, HEMMING BA (2004): Structure, regulation and function of PKB/AKT – a major therapeutic target. *Biochimica et Biophysica Acta* 1697 (1-2), p. 3-16.
- HARRINGTON LS, FINDLAY GM, GRAY A, TOLKACHEVA T, WIGFIELD S, REBHOLZ H, BARNETT J, LESLIE NR, CHENG S, SHEPHERD PR, GOUT I, DOWNES CP, LAMB RF (2004): The TSC1-2 Tumor Suppressor Controls Insulin-PI3K Signaling via Regulation of IRS Proteins. *The Journal of Cell Biology* 166 (2), p. 213-223.
- HAVRANKOVA J, ROTH J, BROWNSTEIN M (1978): Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. *Nature* 272, p. 827-829.
- HENKEL J, NEUSCHÄFER-RUBE F, PATHE-NEUSCHÄFER-RUBE A, PÜSCHEL GP (2009): Aggravation by Prostaglandin E₂ of Interleukin-6-Dependent Insulin Resistance in Hepatocytes. *Hepatology* 50 (3), p. 781-790.

- HERKENHAM M, LYNN AB, LITTLE MD, JOHNSON MR, MELVIN LS, DE COSTA BR, RICE KC (1990): Cannabinoid Receptor Localization in Brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87 (5), p. 1932-1936.
- HÉZODE C, ZAFRANI ES, ROUDOT-THORAVAL F, COSTENTIN C, HESSAMI A, BOUVIER-ALIAS M, MEDKOUR F, PAWLOSTKY JM, LOTERSZTAJN S, MALLAT A (2008): Daily Cannabis Use: Novel Risk Factor of Steatosis Severity in Patients with Chronic Hepatitis C. *Gastroenterology* 134 (2), p. 432-439.
- HILLARD CJ, MANNA S, GREENBERG MJ, DiCAMELLI R, ROSS RA, STEVENSON LA, MURPHY V, PERTWEE RG, CAMPBELL WB (1999): Synthesis and Characterization of Potent and Selective Agonists of the Neuronal Cannabinoid Receptor (CB1). *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 289 (3), p. 1427-1433.
- HILLS CE, BRUNSKILL NJ (2008): Intracellular Signaling by C-Peptide. *Experimental Diabetes Research* 2008, ID 635158, 8 pages.
- HOCHHOLDINGER F, BAIER G, NOGALO A, BAUER B, GRUNICKE HH, ÜBERALL F (1999): Novel Membrane-Targeted ERK1 and ERK2 Chimeras Which Act as Dominant Negative Isotype-Specific Mitogen-Activated Protein Kinase Inhibitors of Ras-Raf-Mediated Transcriptional Activation of c-fos in NIH 3T3 Cells. *Molecular and Cellular Biology* 19 (12), p. 8052-8065.
- HOLLISTER LE, REAVEN GM (1974): Delta-9-Tetrahydrocannabinol and Glucose Tolerance. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 16 (2), p. 297-302.
- HOSHINO T, NAKAYA T, HOMAN T, TANAKA K, SUGOMOTO Y, ARAKI W, NARITA M, NARUMIYA S, SUZUKI T, MIZUSHIMA T (2007): Involvement of Prostaglandin E₂ in Production of Amyloid- β Peptides both in Vitro and Vivo. *Journal of Biological Chemistry* 282(45), p. 32676-32688.
- HOTAMISLIGIL GS (2006): Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444 (7121), p. 860-867.
- HOWLETT AC, BARTH F, BONNER TI, CABRAL G, CASELLAS P, DEVANE WA, FELDER CC, HERKENHAM M, MACKIE K, MARTIN BR, MECHOULAM R, PERTWEE RG (2002): International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of Cannabinoid Receptors. *Pharmacological Reviews* 54 (2), p. 161-202.
- HU E, LIANG P, SPIEGELMAN BM (1996): AdiposeQ is a Novel Adipose-Specific Gene Dysregulated in Obesity. *The Journal of Biological Chemistry* 271 (18), p. 10697-10703.
- HUBBARD SR (1997): Crystal structure of the activated insulin receptor tyrosine kinase in complex with peptide substrate and ATP analog. *The EMBO Journal* 16, p. 5572-5581.

- HUTCHINSON AJ, CHOU CL, ISRAEL DD, XU W, REGAN JW (2009): Activation of EP2 Prostanoid Receptors in Human Glial Cell Lines Stimulates the Secretion of BDNF. *Neurochemistry International* 54 (7), p. 439-446.
- HUTSON NJ, BRUMLEY FT, ASSIMACOPOULOS FD, HARPER SC, EXTON JH (1976): Studies on the α -Adrenergic Activation of Hepatic Glucose Output. *The Journal of Biological Chemistry* 251 (17), p. 5200-5208.
- INTERNATIONALE DIABETES FEDERATION (2006): The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome.
- INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (2009): Diabetes Atlas Fourth Edition.
- IOZZO P (2009): Viewpoints of the way to the Consensus Session: Where Does Insulin Resistance Start? The Adipose Tissue. *Diabetes Care* 32 (S1), p. S168-S173.
- IRIE A, SUGIMOTO Y, NAMBA T, HARAZONO A, HONDA A, WATABE A, NEGISHI M, NARUMIYA S, ICHIKAWA A (1993): Third isoform of the prostaglandin-E-receptor EP₃ subtype with different C-terminal tail coupling to both stimulation and inhibition of adenylate cyclase. *European Journal of Biochemistry* 217 (1), 313-318.
- JAGER J, GRÉMEAUX T, CORMONT M, LE MARCHAND-BRUSTEL Y, TANTI JF (2007) : Interleukin-1 β -Induced Insulin Resistance in Adipocytes through Down-Regulation of Insulin Receptor Substrate-1 Expression. *Endocrinology* 148 (1), p. 241-251.
- KABURAGI Y, YAMAMOTO-HONDA R, TOBE K, UEKI K, YACHI M, AKANUMA Y, STEPHENS RM, KAPLAN D, YAZAKI Y, KADOWAKI T (1995): The Role of the NPXY motif in the insulin receptor tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and Shc. *Endocrinology* 136 (8), p. 3437-3443.
- KAIYALA KJ, PRIGEON RL, KAHN SE, WOODS SC, SCHWARTZ MW (2000): Obesity Induced by a High-Fat Diet Is Associated with Reduced Brain Insulin Transport in Dogs. *Diabetes* 49 (9), p. 1525-1533.
- KAMURA T, SATO S, HAQUE D, LIU L, KAELIN WG Jr, CONAWAY RC, CONAWAY JW (1998): The Elongin BC complex interacts with the conserved SOCS-box motif present in members of the SOCS, ras, WD-40 repeat, and ankyrin repeat families. *Genes & Development* 12, p. 3872-3881.
- KAPLAN DR, MATSUMOTO K, LUCARELLI E, THIELE CJ (1993): Induction TrkB by Retinoic Acid Mediates Biologic Responsiveness to BDNF and Differentiation of Human Neuroblastoma Cells. *Neuron* 11, p. 321-331.
- KAWASAKI H, SPRINGETT GM, MOCHIZUKI N, TOKI S, NAKAYA M, MATSUDA M, HOUSMAN DE, GRAYBIEL AM (1998): A Family of cAMP-Binding Proteins That Directly Activates Rap1. *Science* 282 (5397), p. 2275-2279.

- KEMPF K, HECTOR J, STRATE T, SCHWARZLOH B, ROSE B, HERDER C, MARTIN S, ALGENSTAEDT P (2007): Immune-Mediated Activation of the Endocannabinoid System in Visceral Adipose Tissue in Obesity. *Hormone and Metabolic Research* 39 (8), p. 596-600.
- KERN W, BENEDICT C, SCHULTES B, PLOHR F, MOSER A, BORN J, FEHM HL, HALL-SCHMID M (2006): Low cerebrospinal fluid insulin levels in obese humans. *Diabetologica* 49 (11), p. 2790-2792.
- KHAMZINA L, VEILLEUX A, BERGERON S, MARETTE A (2005) : Increased Activation of the Mammalian Target of Rapamycin Pathway in Liver and Skeletal Muscle of Obese Rats: Possible Involvement in Obesity-Linked Insulin Resistance. *Endocrinology* 146 (3), p. 1473-1481.
- KIDO Y, NAKAE J, ACCILI D (2001): The Insulin Receptor and Its Cellular Targets. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86(3), p. 972-979.
- KIM S, JEE K, KIM D, KOH H, CHUNG J (2001): Cyclic AMP Inhibits Akt Activity by Blocking the Membrane Localization of PDK1. *The Journal of Biological Chemistry* 276 (16), p. 12864-12870.
- KIM EK, KLEMAN AM, RONNETT GV (2007): Fatty Acid Synthase Gene Regulation in Primary Hypothalamic Neurons. *Neuroscience Letters* 423 (3), p. 200-204.
- KITAMURA T, KITAMURA Y, KURODA S, HINO Y, ANDO M, KOTANI K, KONISHI H, MATSUZAKI H, KIKKAWA U, OGAWA W, KASUGA M (1999): Insulin-Induced Phosphorylation and Activation of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase 3B by the Serine-Threonine Kinase Akt. *Molecular and Cellular Biology* 19 (9), p. 6286-6296.
- KNOWLES BB, HOWE CC, ADEN DP (1980): Human Hepatocellular Carcinoma Cell lines Secrete the Major Plasma Proteins and Hepatitis B Surface Antigen. *Science* 209 (4455), p. 497-499.
- KUNOS G, OSEI-HYIAMAN D, LIU J, GODLEWSKI G, BÁT KAI S (2008): *The Journal of Biological Chemistry* 283 (48), p. 33021-33025.
- LAEMMLI UK (1970): Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259), p. 680-685.
- LAGATHU C, BASTARD JP, AUCLAIR M, MAACHI M, CAPEAU J, CARON M (2003): Chronic Interleukin-6 (IL-6) Treatment Increased IL-6 Secretion and Induced Insulin Resistance in Adipocyte: Prevention by Rosiglitazone. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 311 (2), p. 372-379.
- LAVAN BE, LANE WS, LIENHARD GE (1997a): The 60-kDa Phosphotyrosine Protein in Insulin-treated Adipocytes Is a New Member of the Insulin Receptor Substrate Family. *The Journal of Biological Chemistry* 272 (17), p. 11439-11443.

- LAVAN BE, FANTIN VR, CHANG ET, LANE WS, KELLER SR, LIENHARD GE (1997b) : A Novel 160-kDa Phosphotyrosine Protein in Insulin-treated Embryonic Kidney Cells Is a New Member of the Insulin Receptor Substrate Family. *The Journal of Biological Chemistry* 272 (34), p. 21403-21407.
- LAWRENCE JC Jr, ROACH PJ (1997): New Insights into the Role and Mechanism of Glycogen Synthase Activation by Insulin. *Diabetes* 46 (4), p. 541-547.
- LEE DF, KUO HP, CHEN CT, HSU JM, CHOU CK, WEI Y, SUN HL, LI LY, PING B, HUANG WC, HE X, HUNG JY, LAI CC, DING Q, SU JL, YANG JY, SAHIN AA, HORTOBAGYI GN, TSAI FJ, TSAI CH, HUNG MC (2007): IKK β Suppression of TSC1 Links Inflammation and Tumot Angiogenesis via the mTOR pathway. *Cell* 130 (3), p. 440-455.
- LÓPEZ-CARBALLO G, MORENO L, MASIÁ S, PÉREZ P, BARETTINO D (2002): Activation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaling Pathway by Retinoic Acid is Required for Neural Differentiation of SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 277 (28), p. 25297-25304.
- LOUDES C, PETIT F, KORDON C, FAIVRE-BAUMAN A (1999): Distinct populations of hypothalamic dopaminergic neurons exhibit differential responses to brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and neurotrophin-3 (NT3). *European Journal of Neuroscience* 11(3), p. 617-624.
- MACKIE K, DEVANE WA, HILLE B (1993): Anandamide, an Endogenous Cannabinoid, Inhibits Calcium Currents as a Partial Agonist in N18 Neuroblastoma Cells. *Molecular Pharmacology* 44 (3), p. 498-503.
- MACKIE K, LAI Y, WESTENBROEK R, MITCHELL R (1995): Cannabinoids Activate an Inwardly Rectifying Potassium Conductance and Inhibit Q-Type Calcium Currents in AtT20 Cells Transfected with rat Brain Cannabinoid Receptor. *The Journal of Neuroscience* 5 (10), p. 6552-6561.
- MATHENY RW Jr, ADAMO ML (2009): Current perspectives on Akt Akt-ivation and Akt-ions. *Experimental Biology and Medicine* 234 (11), p. 1264-1270.
- MATIAS I, DI MARZO V (2007): Endocannabinoids and the Control of Energy Balance. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 18 (1), p. 27-37.
- MATIAS I, CRISTINO L, DI MARZO V (2008): Endocannabinoids: Some Like it Fat (and Sweet Too). *Journal of Neuroendocrinology* 20 (1), p. 100-109.
- MATOZAKI T, MURATA Y, SAITO Y, OKAZAWA H, OHNISHI H (2009): Protein tyrosine phosphatase SHP-2: A proto-oncogene product that promotes Ras activation. *Cancer Science* 100 (10), p. 1786-1793.

- MAYER CM, BELSHAM DD (2009): Insulin Directly Regulates NPY and AgRP Gene Expression via the MAPK MEK/ERK Signal Transduction Pathway in mHypoE-46 Hypothalamic Neurons. *Molecular and Cellular Endocrinology* 307 (1-2), p. 99-108.
- McALLISTER SD, GRIFFIN G, SATIN LS, ABOOD ME (1999): Cannabinoid Receptors can Activate and Inhibit G Protein-coupled Inwardly Rectifying Potassium Channels in a Xenopus Expression System. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 291 (2), p. 618-626.
- McCAFFERY P, DRÄGER UC (2000): Regulation of Retinoic Acid Signaling in the Embryonic Nervous System: A Master Differentiation Factor. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 11 (3), p. 233-249.
- McCOY JM, WICKS JR, AUDOLY LP (2002): The Role of Prostaglandin E2 Receptors in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *The Journal of Clinical Investigation* 110 (5), p. 651-658.
- MECHOULAM R, BEN-SHABAT S, HANUS L, LIGUMSKY M, KAMINSKI NE, SCHATZ AR, GOPHER A, ALMOG S, MARTIN BR, COMPTON DR et al. (1995): Identification of an endogenous 2-Monoglyceride, present in canine gut, that binds to Cannabinoid Receptors. *Biochemica Pharmacology* 50 (1), p. 83-90.
- MEI FC, QIAO J, TSYGANKVA OM, MEINKOTH JL, QUILLIAM LA, CHENG X (2002): Differential Signaling of Cyclic AMP: Opposing Effects of Exchange Protein Directly Activated by Cyclic AMP and cAMP-Dependent Protein Kinase on Protein Kinase B Activation. *The Journal of Biological Chemistry* 277 (13), p. 11497-11504.
- MORI H, HANADA R, HANADA T, AKI D, MASHIMA R, NISHINAKAMURA H, TORISU T, CHIEN KR, YASUKAWA H, YOSHIMURA A (2004): SOCS3 deficiency in the brain elevates leptin sensitivity and confers resistance to diet induced obesity. *Nature Medicine* 10 (7), p. 739-743.
- MORRISON DK, CUTLER RE (1997): The Complexity of Raf-1 Regulation. *Current Opinion in Cell Biology* 9 (2), p. 174-179.
- MOTAGHEDI R, McGRAW TE (2008): The CB1 Endocannabinoid System Modulates Adipocyte Insulin Sensitivity. *Obesity* 16 (8), p. 1727-1734.
- MOTTET D, DUMONT V, DECCACHE Y, DEMAZY C, NINANE N, RAES M, MICHIELS C (2003): Regulation of Hypoxia-inducible Factor-1 α Protein Level during Hypoxic Conditions by the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt/Glycogen Synthase Kinase 3 β Pathway in HepG2 Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 278 (33), p. 31277-31285.

- NAKAE J, PARK B-C, ACCILI D (1999): Insulin Stimulates Phosphorylation of the Forkhead Transcription Factor FKHR on Serine 253 through a Wortmannin-sensitive Pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 274 (23), p. 15982-15985.
- NARUMIYA S, SUGIMOTO Y, USHIKUBI F (1999): Prostanoid Receptors: Structures, Properties, and Functions. *Physiological Reviews* 79 (4), p. 1193-1226.
- NAVÉ BT, OUWENS M, WITHERS DJ, ALESSI DR, SHEPHERD PR (1999): Mammalian Target of Rapamycin is a Direct Target for Protein Kinase B: Identification of a Convergence Point for Opposing Effects of Insulin and Amino-Acid Deficiency on Protein Translation. *Biochemical Journal* 344 (2), p. 427-431.
- NEUSCHÄFER-RUBE F, HÄNECKE K, BLASCHKE V, JUNGERMANN K, PÜSCHEL GP (1997): The C-terminal domain of the G_s-coupled EP₄ receptor confers agonist-dependent coupling control to G_i but no coupling to G_s in a receptor hybrid with the Gi-coupled EP₃ receptor. *FEBS Letters* 401 (2-3), p. 185-190.
- NISWENDER KD, MORRISON CD, CLEGG DJ, OLSON R, BASKIN DG, MYERS MG Jr, SEELEY RJ, SCHWARTZ MW (2003): Insulin Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase in the Hypothalamic Arcuate Nucleus: A Key Mediator of Insulin-Induced Anorexia. *Diabetes* 52 (2), p. 227-231.
- NOGUEIRAS R, ROHNER-JEANRENAUD F, WOODS SC, TSCHÖP MH (2008): The Endocannabinoid System in the Control of Glucose Homeostasis. *Journal of Neuroendocrinology* 20 (1), p. 147-151.
- OBICI S, FENG Z, KARKANIAS G, BASKIN DG, ROSSETTI L (2002): Decreasing hypothalamic insulin receptors causes hyperphagia and insulin resistance in rats. *Nature Neuroscience* 5 (6), p. 566-572.
- OHINATA K.; SUETSUGU K.; FUKIWARA Y.; YOSHIKAWA M. (2006): Activation of prostaglandin E receptor EP4 subtype suppresses food intake in mice. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 81 (1-2), p. 31-36.
- OKABAYASHI Y, MADDUX BA, McDONALD AR, LOGSON CD, WILLIAMS JA, GOLDFINE ID (1989): Mechanism of insulin-induced insulin-receptor downregulation. Decrease of receptor biosynthesis and mRNA levels. *Diabetes* 38 (2), 182-187.
- OSBORN O, GRAM H, ZORRILLA EP, CINTI B, BARTFAI T (2008): Insights into the roles of the inflammatory mediators IL-1, IL-18 and PGE₂ in obesity and insulin resistance. *Swiss Medical Weekly* 138 (45-46), p. 665-673.

- OSEI-HYIAMAN D, DePETRILLO M, PACHER P, LIU J, RADAIEVA S, BÁTKAI S, HARVEY-WHITE J, MACKIE K, OFFERTÁLER L, WANG L, KUNOS G (2005): Endocannabinoid Activation at Hepatic CB1 Receptors Stimulates Fatty Acid Synthesis and Contributes to Diet-Induced Obesity. *The Journal of Clinical Investigation* 115 (5), p. 1298-1305.
- PACHER P, STEFFENS S (2009): The Emerging Role of the Endocannabinoid System in Cardiovascular Disease. *Seminars in Immunopathology* 31 (1), p. 63-77.
- PAGOTTO U, MARSICANO G, COTA D, LUTZ B, PASQUALI R (2006): The Emerging Role of the Endocannabinoid System in Endocrine Regulation and Energy Balance. *Endocrine Reviews* 27 (1), p. 73-100.
- PAHLMAN S, RUUSALA AI, ABRAHAMSSON L, MATTSSON ME, ESSCHER T (1984): Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol-ester-induced differentiation. *Cell differentiation* 14(2), p. 135-144.
- PAI R, SOREGHAN B, SZABO IL, PAVELKA M, BAATAR D, TARNAWSKI AS (2002): Prostaglandin E₂ transactivates EGF Receptor: A Novel Mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy. *Nature Medicine* 8 (3), p. 289-293.
- PARK CR, SEELEY RJ, CRAFT S, WOODS SC (2001): Intracerebroventricular insulin enhances memory in a passive-avoidance task. *Physiology & Behavior* 68 (4), p. 509-514.
- PARKER PJ, PARKINSON SJ (2001): AGC protein kinase phosphorylation and protein kinase C. *Biochemical Society Transactions* 29 (6), p. 860-863.
- PEARSON G, ROBINSON F, BEERS GIBSON T, XU BE, KARANDIKAR M, BERMAN K, COBB MH (2001): Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions. *Endocrine Reviews* 22 (2), p. 153-183.
- PERWITZ N, FASSHAUER M, KLEIN J (2006): Cannabinoid Receptor Signaling Directly Inhibits Thermogenesis and Alters Expression of Adiponectin and Visfatin. *Hormone and Metabolic Research* 38 (5), p. 356-358.
- PETERSON RT, BEAL PA, COMB MJ, SCHREIBER SL (2000): FKBP12-Rapamycin-Associated Protein (FRAP) Autophosphorylates at Serine 2481 under Translationally Repressive Conditions. *The Journal of Biological Chemistry* 275 (10), p. 7416-7423.
- PFAFFL MW (2004): Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA-Quantifizierung. *BIOspektrum* 1/04 10.Jahrgang, p. 92-95.
- PIOMELLI D (2003): The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nature Reviews Neuroscience* 4 (11), p. 873-884.
- PLAS DR, THOMPSON CB (2005): Akt-dependent transformation: there is more to growth than just surviving. *Oncogene* 24 (59), p. 7435-7442.

- PLOMGAARD P, BOUZAKRI K, KROGH-MADSEN R, MITTENDORFER B, ZIERATH JR, PEDERSEN BK (2005): Tumor Necrosis Factor- α Induces Skeletal Muscle Insulin Resistance in Healthy Human Subjects via Inhibition of Akt Substrate 160 Phosphorylation. *Diabetes* 54 (10), p. 2939-2945.
- PLUM L, BELGARDT BF, BRÜNING JC (2006): Central insulin action in energy and glucose homeostasis. *The Journal of Clinical Investigation* 116 (7), p. 1761-1766.
- POLIGONE B, BALDWIN AS (2001): Positive and Negative Regulation of NF- κ B by COX-2: Roles of different Prostaglandins. *The Journal of Biological Chemistry* 276 (42), p. 38658-38664.
- POSEY KA, CLEGG DJ, PRINTZ RL, BYUN J, MORTON GJ, VIVEKANANDAN-GIRI A, PENNATHUR S, BASKIN DG, HEINECKE JW, WOODS SC, SCHWARTZ MW, NISWENDER KD (2009): Hypothalamic proinflammatory lipid accumulation, inflammation, and insulin resistance in rats fed a high-fat diet. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*. 296 (5), p. E1003-E1012.
- PROUD CG (2006): Regulation of protein synthesis by insulin. *Biochemical Society Transactions* 34 (2), p. 213-216.
- PROULX K, RICHARD D, WALKER CD (2002): Leptin Regulates Appetite-Related Neuropeptides in the Hypothalamus of Developing Rats without Affecting Food Intake. *Endocrinology* 143 (12), p. 4683-4692.
- PÜSCHEL GP, KIRCHNER C, SCHRÖDER A, JUNGERMANN K (1993): Glycogenolytic and antiglycogenolytic prostaglandin E₂ actions in rat hepatocytes are mediated via different signalling pathways. *European Journal of Biochemistry* 218 (3), p. 1083-1089.
- PUIG O, TIJAN R (2005): Transcriptional feedback control of insulin receptor by dFOXO/FOXO1. *Genes & Development* 19 (20), p. 2435-3446.
- REGAN JW, BAILEY TJ, PEPPERL DJ, PIERCE KL, BOGARDUS AM, DONELLO JE, FAIRBAIRN CE, KEDZIE KM, WOODWARD DF, GIL DW (1994): Cloning of a Novel Human Prostaglandin Receptor with Characteristics of the Pharmacologically Defined EP2 Subtype. *Molecular Pharmacology* 46 (2), p. 213-220.
- RODRIGUEZ-VICIANA P, WANE PH, DHAND R, VANHAESEBROECK B, GOUT I, FRY MJ, WATERFIELD MD, DOWNWARD J (1994): Phosphatidylinositol-3OH Kinase as a direct Target of Ras. *Nature* 370 (6490), p. 527-532.
- ROSS RA, SPENGLER BA, BIEDLER JL (1983): Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *Journal of the National Cancer Institute* 71(4), p. 741-747.

- ROUDIER E, MISTAFA O, STENIUS U (2006): Statins induce mammalian target of rapamycin (mTOR)-mediated inhibition of Akt signaling and sensitize p53-deficient cells to cytostatic drugs. *Molecular Cancer Therapeutics* 5 (11), p. 2706-271.
- RUI L, YUAN M, FRANTZ D, SHOELSON S, WHITE MF (2002) : SOCS-1 and SOCS-3 Block Insulin Signaling by Ubiquitin-mediated Degradation of IRS1 and IRS2. *The Journal of Biological Chemistry* 277 (44), p. 42394-42398.
- SAFAYHI H, HAASE H, KRAMER U, BIHLMAYER A, ROENFELDT M, AMMON HP, FROSCHMAYR M, CASSIDY TN, MORANO I, AHLIJANIAN MK, STRIESSNIG J (1997): L-Type Calcium Channels in Insulin-Secreting Cells: Biochemical Characterization and Phosphorylation in RINm5F Cells. *Molecular Endocrinology* 11 (5), p. 619-629.
- SAKAMOTO K, HOLMAN GD (2008): Emerging role for AS160/TBC1D4 and TBC1D1 in the regulation of GLUT4 traffic. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 295 (1), p. E29-E37.
- SALTIEL AR, KAHN CR (2001): Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414, p. 799-806.
- SÁNCHEZ MG, RUIZ-LLORENTE L, SÁNCHEZ AM, DÍAZ-LAVIADA I (2003): Activation of Phosphoinositide 3-Kinase/PKB Pathway by CB1 and CB2 Cannabinoid Receptors Expressed in Prostate PC-3 Cells. Involvement of RAF-1 Stimulation and NGF Induction. *Cell Signalling* 15 (9), p. 851-859.
- SANCHEZ-ALAVEZ M, KLEIN I, BROWNELL SE, TABAREAN IV, DAVIS CN, CONTI B, BARTFAI T (2007): Night Eating and Obesity in the EP3-Deficient Mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (8), p. 3009-314.
- SARBASSOV DD, GUERTIN DA, ALI SM, SABATINI DM (2005): Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307 (5712), p. 1098-1101.
- SAWYERS CL (2003): Will mTOR inhibitors make it as cancer drugs? *Cancer Cell* 4 (5), p. 343-348.
- SCHEID MP, WOODGETT JR (2003): Unravelling the activation mechanisms of protein kinase B/Akt. *FEBS Letters* 546: p. 108-112.
- SCHÖNWASSER DC, MARAIS RM, MARSHALL CJ, PARKER PJ (1998): Activation of the Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathway by Conventional, Novel, And Atypical Protein Kinase C Isoforms. *Molecular and Cellular Biology* 18 (2), p. 790-798.
- SCHULZE I, PEREZ-POLO JR (1982): Nerve Growth Factor and cyclic AMP: Opposite Effects on Neuroblastoma-Substrate Adhesion. *Journal of Neuroscience Research* 8 (2-3), p. 393-411.

- SCHWANER I, OFFERMANN S, SPICHER K, SEIFERT R, SCHULZ G (1995): Differential Activation of Gi and Gs Proteins by E- and I-type Prostaglandins in membranes from the human erythroleukaemia cell line, HEL. *Biochimica et Biophysica Acta* 1265, p. 8-14.
- SCHWARTZ MW, BERGMAN RN, KAHN SE, TABORSKY GJ Jr, FISHER LD, SIPOLS AJ, WOODS SC, STEIL GM, PORTE D Jr (1991): Evidence for entry of plasma insulin into the cerebrospinal fluid through an intermediate compartment in dogs. Quantitative aspects and implications for transport. *The Journal of Clinical Investigation* 88, p. 1272-1281.
- SCHWARTZ M.W.; WOODS S.C.; PORTE D. Jr.; SEELEY R.J.; BASKIN D.G. (2000): Central Nervous System Control of Food Intake. *Nature* 404 (6778), p. 661-671.
- SCHWARTZ MW, PORTE D Jr (2005): Diabetes, Obesity, and the Brain. *Science* 307 (5708), p. 375-379.
- SENN JJ, KLOVER PJ, NOWAK IA, MOONEY RA (2002): Interleukin-1 Induces Cellular Insulin Resistance in Hepatocytes. *Diabetes* 51 (12), p. 3391-3399.
- SENN JJ, KLOVER PJ, NOWAK IA, ZIMMERS TA, KONIARIS LG, FURLANETTO RW, MOONEY RA (2003): Suppressor of Cytokine Signaling-3 (SOCS-3), a Potential Mediator of Interleukin-6-dependent Insulin Resistance in Hepatocytes. *The Journal of Biological Chemistry* 278 (16), p. 13740-13746.
- SHEPHERD PR, WITHERS DJ, SIDDLE K (1998): Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *The Biochemical Journal* 333 (3), p. 471-490.
- SHOELSON SE, LEE J, YUAN M (2003): Inflammation and the IKK β /I κ B/NF- κ B axis in obesity- and diet-induced insulin resistance. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* 27 (3), p. S49-S52.
- SIDOVAR MF, KOZLOWSKI P, LEE JW, COLLINS MA, GRAVS LM (2000): Phosphorylation of Serine 43 is not Required for Inhibition of c-Ras Kinase by the cAMP-Dependent Protein Kinase. *The Journal of Biological Chemistry* 275 (37), p. 28688-28694.
- SMITH WL, GARAVITO RM, DE WITT DL (1996): Prostaglandin Endoperoxide H Synthases (Cyclooxygenases)-1 and -2. *The Journal of Biological Chemistry* 271 (52), p. 33157-33160.
- SMITH WL, DE WITT DL, GARAVITO RM (2000): Cyclooxygenases: Structural, Cellular, and Molecular Biology. *Annual Review of Biochemistry* 69, p. 145-182.
- SMITH PM, FERGUSON AV (2008): Neurophysiology of Hunger and Satiety. *Developmental Disabilities Research Overviews* 14 (2), p. 96-104.
- SPINELLI W, SONNENFELD KH, ISHII DN (1982): Effects of Phorbol Ester Tumor Promoters and Nerve Growth Factor on Neurite Outgrowth in Cultured Human Neuroblastoma Cells. *Cancer Research* 42 (12), p. 5067-5073.

- STAAL SP, HARTLEY JW, ROWE WP (1977): Isolation of transforming murine leukaemia viruses from mice with a high incidence of spontaneous lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74 (7), p. 3065-3067.
- SUGIMOTO Y, SHIGEMOTO R, NAMBA T, NEGISHI M, MIZUNO N, NARUMIYA S, ICHIKAWA A (1994): Distribution of the messenger RNA for the Prostaglandin E Receptor Subtype EP3 in the mouse nervous system. *Neuroscience* 62 (3), p. 919-928.
- SUGIMOTO Y, NARUMIYA S (2007): Prostaglandin E Receptors. *The Journal of Biological Chemistry* 282 (16), p. 11613-11617.
- TAKAI Y, SASAKI T, MATOZAKI T (2001): Small GTP-Binding Proteins. *Physiological Reviews* 81 (1), p. 153-208.
- THIRONE AC, HUANG C, KLIP A (2006): Tissue-specific roles of IRS proteins in insulin signalling and glucose transport. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 17(2), p. 72-78.
- THOMAS H, BALKWILL FR (1991): Effects of Interferons and Other Cytokines on Tumors in Animals: A Review. *Pharmacology & Therapeutics* 52 (3), p. 307-330.
- TOKER A, MEYER M, REDDY KK, FALCK JR, ANEJA R, ANEJA S, PARRA A, BURNS DJ, BALLAS LM, CANTLEY LC (1994): Activation of Protein Kinase C Family Members by the Novel Polyphosphoinositides PtdIns-3,4-P₂ and PtdIns-3,4,5-P₃. *The Journal of Biological Chemistry* 269 (51), p. 32358-32367.
- TZATSOS A, KANDROR KV (2006): Nutrients Suppress Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaling via Raptor-Dependent mTOR-mediated Insulin Receptor Substrate 1 Phosphorylation. *Molecular and Cellular Biology* 26 (1), p. 63-76.
- UEKI K, KONDO T, KAHN CR (2004): Suppressor of Cytokine Signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 Cause Insulin Resistance through Inhibition of Tyrosine Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate Proteins by Discrete Mechanisms. *Molecular and Cellular Biology* 24 (12), p. 5434-5446.
- ULLRICH A, SCHLESSINGER J (1990): Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61, p. 203-212.
- VANHAESEBROECK B, ALESSI DR (2000): The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *The Biochemical Journal* 346 (3), p. 561-576.
- VARMA S, KHANDELWAL RL (2007): Effects of Rapamycin on Cell Proliferation and Phosphorylation of mTOR and p70(S6K) in HepG2 and HepG2 Cells Overexpressing Constitutively Active Akt/PKB. *Biochimica et Biophysica Acta* 1770, p. 71-78.
- VELLOSO LA, FOLLI F, SUN XJ, WHITE MF, SAAD MJ, KAHN CR (1996): Cross-talk between the insulin and angiotensin signalling systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93 (22), p. 12490-12495.

- VIRKAMÄKI A, UEKI K, KAHN CR (1999): Protein-protein interaction in insulin signalling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation* 103 (7), p. 931-943.
- WEGE H, LE HT, CHUI MS, LIU L, WU J, GIRI R, MALHI H, SAPPAL BS, KUMARAN V, GUPTA S, ZERN MA (2003): Telomerase reconstitution immortalizes human fetal hepatocytes without disrupting their differentiation potential. *Gastroenterology* 124 (2), p. 432-444.
- WELLEN KE, HOTAMISLIGIL GS (2005): Inflammation, stress, and diabetes. *The Journal of Clinical Investigation* 115 (5), p. 1111-1119.
- WHITE MF, KAHN CR (1994): The Insulin Signaling System. *The Journal of Biological Chemistry* 269 (1), p. 1-4.
- WHITE MF (1998): The IRS-signaling system: a network of docking proteins that mediate insulin and cytokine action. *Recent Progress in Hormone Research* 53, p. 119-138.
- WHITE MF (2002): IRS proteins and the common path to diabetes. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 283 (3), p. E413-422.
- WOODS SC, SEELEY RJ (2001): Insulin as an adiposity signal. *International Journal of Obesity* 25(5), p. S35-S38.
- WOODS SC, SEELEY RJ, COTA D (2008): Regulation of Food Intake Through Hypothalamic Signaling Networks Involving mTOR. *Annual Review of Nutrition* 28, p. 295-311.
- WOODS SC, D'ALESSIO DA (2008): Central Control of Body Weight and Appetite. *The Journal of Endocrinology and Metabolism* 93 (11), p. S37-S50.
- YAMAUCHI T, KAMON J, MINOKOSHI Y, ITO Y, WAKI H, UCHIDA S, YAMASHITA S, NODA M, KITA S, UEKI K, ETO K, AKANUMA Y, FROGUEL P, FOUFELLE F, CARLING D, KIMURA S, NAGAI R, KAHN BB, KADOWAKI T (2002): Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature Medicine* 8 (11), p. 1288-1295.
- YAMAUCHI T, HARA K, KUBOTA N, TERAUCHI Y, TOBE K, FROGUEL P, NAGAI R, KADOWAKI T (2003): Dual Roles of Adiponectin/Acrp30 in vivo as an Anti-Diabetic and Anti-Atherogenic Adipokine. *Current Drug Targets. Immune, Endocrine and Metabolic Disorders* 3 (4), p. 243-254.
- YIP CC (1992): The insulin-binding domain of insulin receptor is encoded by exon 2 and exon 3. *Journal of Cellular Biochemistry* 48, p. 19-25.
- YONEZAWA K, ANDO A, KABURAGI Y, YAMAMOTO-HONDA R, KITAMURA T, HARA K, NAKAFUKU M, OKABAYASHI Y, KADOWAKI T, KAZIRO Y, KASUGA M (1994): Signal Transduction Pathways from Insulin Receptors to Ras. *The Journal of Biological Chemistry* 269 (6), p. 4634-4640.

- YOUNGREN JF (2007): Regulation of insulin receptor function. *Cellular and Molecular Life Sciences* 64 (7-8), p. 873-891.
- ZEYDA M, STULNIG TM (2009): Obesity, Inflammation, and Insulin Resistance – A Mini-Review. *Gerontology* 55 (4), p. 379-386.
- ZHANG Y, PROENCA R, MAFFEI M, BARONE M, LEOPOLD L, FRIEDMAN JM (1994): Positional Cloning of the Mouse Obese Gene and its Human Homologue. *Nature* 372 (6505), p. 425-432.
- ZHANG W, PATIL S, CHAUHAN B, GUO S, POWELL DR, LE J, KLOTSAS A, MATIKA R, XIAO X, FRANKS R, HEIDENREICH KA, SAJAN MP, FARESE RV, STOLZ DB, TSO P, KOO SH, MONTMINIY M, UNTERMAN TG (2006): FoxO1 Regulates Multiple Metabolic Pathways in the Liver. *The Journal of Biological Chemistry* 281 (15), p. 10105-10117.
- ZHANG X, ZHANG G, ZHANG H, KARIN M, BAI H, CAI D (2008): Hypothalamic IKK β /NF- κ B and ER Stress Link Overnutrition to Energy Imbalance and Obesity. *Cell* 135 (1), p. 61-73.

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Püschel. Er hat es mir ermöglicht, diese Doktorarbeit in der Abteilung Biochemie der Ernährung der Universität Potsdam in Kooperation mit dem Deutschen Institut für Ernährungsforschung zu schreiben. Vielen Dank für die Überlassung dieses interessanten Themas, die wissenschaftliche Betreuung und das Vertrauen.

Allen Gutachtern danke ich für Ihre Bereitschaft zur Übernahme der Gutachtertätigkeit.

Ich danke allen derzeitigen und ehemaligen Kollegen der Abteilung Biochemie der Ernährung für die motivierende Arbeitsatmosphäre, die Hilfsbereitschaft und die aufmunternden Worte in den schwierigen und frustrierenden Phasen meiner Doktorandenzeit. Hier gilt mein größter Dank Janin Henkel, nicht nur für die Einarbeitung in den Laboralltag, sondern auch für die täglichen Hilfestellungen und nicht zuletzt für ihre Freundschaft. Dr. habil. Frank Neuschäfer-Rube danke ich vor allem für die tatkräftige Unterstützung in Bezug auf die molekularbiologischen Experimente und bei den vielen kleinen praktischen Fragen des Forscheralltags. Bei Dr. Andrea Pathe-Neuschäfer-Rube bedanke ich mich ganz herzlich für die Hilfe und Unterstützung in der Kultivierung der Zelllinien und der stabilen Transfektion der Zellen, sowie für die unkomplizierte und angenehme gemeinsame Arbeit in der Zellkultur. Den technischen Assistentinnen danke ich für die zahlreichen Zuarbeiten: allen voran Manuela Kuna, Ines Kahnt, Christina Völker und Camilla Schönberg. Auch allen anderen Kollegen, Doktoranden und Diplomanden der Abteilung, die mich auf diesem Weg begleitet haben, sei an dieser Stelle herzlichst gedankt: Dr. Bettina Schewe, Stefanie Lieske, Heidi Mahler, Daniela Gärtner, Jessica Vogler, Andreas Bader, Katharina Schleicher und Janet Laake.

Für das kritische Korrekturlesen meiner Arbeit bedanke ich mich außerdem bei Frau Dr. Anna Kipp, die sich aufopferungsvoll jeder Seite dieser Arbeit gewidmet hat und mir diesbezüglich wissenschaftliche und freundschaftliche Hilfestellung geleistet hat. Meinen Freunden, allen voran meinen zwei besten Freundinnen Moni und Andrea, danke ich für die Unterstützung fernab der biochemischen Forschung in den letzten drei Jahren.

Mein größter Dank gilt den wichtigsten Menschen in meinem Leben: meinen Eltern, meiner Schwester Anja und meinem Freund Thomas. Ich danke Euch von ganzem Herzen, dass Ihr IMMER für mich da seid, mich liebt und jeden Tag stolz auf mich seid. Thomas, Dir danke ich vor allem dafür, dass Du mich unermüdlich dabei unterstützt, meinen eigenen Weg zu gehen, diesen jedoch immer gemeinsam mit mir beschreitest.

Potsdam, im Juli 2010

Daniela Strohm