

**„Crosstalk“ Mechanismen des Tumor Nekrose Faktors (TNF)  
und der freien Fettsäure Palmitat mit den Insulin Signalkaskaden  
- Modell für Insulin Resistenz an der Skelettmuskulatur**

von der Fakultät Geo- und Biowissenschaften  
der Universität Stuttgart

zur Erlangung der Würde eines  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
genehmigte Dissertation

vorgelegt von  
**Peter Storz**  
aus Marbach

Hauptberichter: Prof. Dr. K. Pfizenmaier

Mitberichter: Prof. Dr. F. Wollnik

Tag der mündlichen Prüfung: 29. November 1999

Universität Stuttgart  
Institut für Zellbiologie und Immunologie

1999

Berichte aus der Biologie

**Peter Storz**

**"Crosstalk" Mechanismen des Tumor Nekrose  
Faktors (TNF) und der freien Fettsäure Palmitat  
mit den Insulin Signalkaskaden - Modell für  
Insulin Resistenz an der Skelettmuskulatur**

D 93 (Diss. Universität Stuttgart)

Shaker Verlag  
Aachen 2000

Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme

*Storz, Peter:*

"Crosstalk" Mechanismen des Tumor Nekrose Faktors (TNF)  
und der freien Fettsäure Palmitat mit den Insulin Signalkaskaden -  
Modell für Insulin Resistenz an der Skelettmuskulatur / Peter Storz.

- Als Ms. gedr. - Aachen : Shaker, 2000

(Berichte aus der Biologie)

Zugl.: Stuttgart, Univ., Diss., 1999

ISBN 3-8265-6914-8

Copyright Shaker Verlag 2000

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen  
oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungs-  
anlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Als Manuskript gedruckt. Printed in Germany.

ISBN 3-8265-6914-8

ISSN 0945-0688

Shaker Verlag GmbH • Postfach 1290 • 52013 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: [www.shaker.de](http://www.shaker.de) • eMail: [info@shaker.de](mailto:info@shaker.de)

Für Rosa Lillich

## **Danksagung**

An dieser Stelle bedanke ich mich bei ...

- ... Herrn Prof. Dr. Klaus Pfizenmaier für die Überlassung des Themas, die hervorragende Betreuung, die Bereitschaft zur konstruktiven Diskussion von Ergebnissen und Manuskripten und für die Möglichkeit der eigenständigen Bearbeitung des Themas.
- ... Heike Döppler, ohne deren engagierten Einsatz das Etablieren dieses Projektes mit der aufwendigen Zellkultur, einschließlich der daraus resultierenden Publikationen, in dieser kurzen Zeit nicht möglich gewesen wäre.
- ... der Projektleiterin PD Dr. Gertraud Müller für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und, ebenso wie auch bei PD Dr. Franz-Josef Johannes, für gute Zusammenarbeit und für die Korrektur meiner Arbeit.
- ... allen Mitglieder der Arbeitsgruppen Johannes und Müller (Angelika Hausser, Gisela Link, Soizic Bourteele, Judith Müller) für die angenehme Arbeitsatmosphäre.
- ... meinen Eltern und Rosa Lillich für ihre Unterstützung.



## Inhalt

<b>Abkürzungen</b>	IV
<b>Zusammenfassung</b>	1
<b>1 Einleitung</b>	3
1.1 Zusammenhänge von Adipositas, NIDDM und Insulin Resistenz	3
1.2 Typ II Diabetes (NIDDM)	4
1.2.1 Entstehung und Krankheitsbild von NIDDM	5
1.2.2 Potentielle molekulare Ursachen der Insulin Resistenz	6
1.3 Der Glucosestoffwechsel und seine Rolle bei NIDDM	8
1.3.1 Steuerung des Blutzuckerspiegels - Glucose Homöostase im postabsorptiven Zustand	8
1.3.2 Glucose Homöostase im postprandialen Zustand	8
1.3.3 Glucose Metabolismus bei NIDDM Patienten	9
1.3.4 Glucosetransporter und ihre Expression	9
1.4 Fettgewebe, Fettstoffwechsel und deren Rolle bei Adipositas und NIDDM	10
1.4.1 Fettgewebe (Funktion und Regulation des Gewichts)	10
1.4.2 Fettstoffwechsel	12
1.4.3 Rolle der Fettsäuren bei Adipositas und NIDDM	12
1.5 Insulin und Insulin induzierte Signalkaskaden	13
1.5.1 Insulin und Insulin Rezeptoren	13
1.5.2 Insulin vermittelte Signaltransduktion	13
1.5.3 Regulation der Insulin vermittelten Signaltransduktion	17
1.5.4 Biologische Effekte der Insulin Signalkaskaden	17
1.5.5 Aktivität von Insulin Rezeptor und IRS-1 bei Insulin Resistenz und NIDDM	18
1.6 TNF, TNF Signalkaskaden und ihre Rolle bei NIDDM	19
1.6.1 TNF und TNF Rezeptoren	19
1.6.2 TNF Signaltransduktion und zelluläre Antworten	20
1.6.3 Potentielle Rolle von TNF bei Adipositas, NIDDM und Insulin Resistenz	21
1.7 Tiermodelle für Adipositas und NIDDM	23
1.7.1 Die TNF k/o und TNFR k/o Modelle	24
1.8 Zielsetzung	26
<b>2 Material und Methoden</b>	27
2.1 Reagenzien	27
2.1.1 Chemikalien	27
2.1.2 Pufferlösungen und Lösungen	28
2.1.3 Antikörper und Antiseren	29
2.1.4 Wachstumsfaktoren und Zytokine	30
2.1.5 Oligonukleotide, Reagenziensätze („Kits“) und Proteinstandards	30
2.1.6 Expressionvektoren und Reporterplasmide	31
2.2 Bakterienstämme und Nährmedien	31
2.3 Eukaryotische Zellen und Zellkultur	31
2.4 Experimentalmethoden	33
2.4.1 Transformation von Bakterien mittels Elektroporation	33

2.4.2	Präparation von Plasmid DNA	33
2.4.3	Photometrische Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren	33
2.4.4	DNA Degradationsnachweis („DNA Ladder“)	33
2.4.5	Agarosegel Elektrophorese	34
2.4.6	Transiente Transfektion von Rat I HIR c15 Zellen	34
2.4.7	Tests auf Luciferaseaktivität und $\beta$ -Galaktosidaseaktivität	35
2.4.8	Herstellung von Zellysaten	35
2.4.9	Herstellung von Kernextrakten	35
2.4.10	Isolation mikrosomaler Membranen (Liu <i>et al.</i> , 1995)	36
2.4.11	Proteinbestimmung	36
2.4.12	Immunpräzipitation	36
2.4.13	Kinase Aktivitätstests	37
2.4.14	Dünnschicht Chromatographie	39
2.4.15	NF- $\kappa$ B und STAT5 EMSA („electrophoretic mobility shift assay“)	39
2.4.16	Native Polyacrylamidgel Elektrophorese	40
2.4.17	SDS-Polyacrylamidgel Elektrophorese (SDS-PAGE)	40
2.4.18	Elektrotransfer von Proteinen auf Nitrozellulose Membran	41
2.4.19	Immuno Blot/ Western Blot Analyse	41
2.4.20	Autoradiographie	41
2.4.21	2-Deoxy-Glucose Aufnahme Test	41
2.4.22	Nachweis der DNA Synthese durch Thymidineinbau	42
2.4.23	Färbungen zum Nachweis von Apoptose/Proliferation/Zellzahl	42
2.4.24	Immunfluoreszenz Färbungen	43
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>45</b>
3.1	pmi28 Myotuben als neues Zellmodell zur Untersuchung der Insulin Resistenz im murinen Muskel	45
3.1.1	Differenzierung von pmi28 Myoblasten zu pmi28 Myotuben	45
3.1.2	Funktionalität der Insulin und der TNF Signalwege	46
3.1.3	TNF induzierte Apoptose in pmi28 Myotuben	47
3.2	Interferenzen des Palmitats und der TNF Signalwege mit der Insulin Signalkaskade in pmi28 Myotuben	48
3.2.1	Hemmung der Insulin induzierten Tyrosin Phosphorylierungen von IR $\beta$ und IRS-1 durch TNF	48
3.2.2	Hemmung der Insulin induzierten Aktivierung von STAT5 durch TNF	49
3.2.3	Reduktion der IRS-1 gebundenen PI 3-Kinaseaktivität durch TNF	51
3.2.4	Einfluß von TNF auf die durch Insulin stimulierte Glucose Aufnahme	52
3.2.5	Regulation des GLUT1 Glucosetransporters durch TNF	53
3.2.6	Spezifische Hemmung der Insulin induzierten Glucose Aufnahme durch Palmitat	54
3.2.7	Spezifische Hemmung der Insulin vermittelten IR $\beta$ und IRS-1 Tyrosin Phosphorylierungen durch Palmitat	55
3.2.8	Ceramidbildung nach Stimulation mit Palmitat und TNF	57
3.2.9	Einfluß von Ceramid auf die Insulin vermittelten Tyrosin Phosphorylierungen von IR $\beta$ und IRS-1	58
3.2.10	Hemmung der Insulin vermittelten Akt/PKB Phosphorylierung durch Palmitat	58

3.2.11 Hemmung der TNF vermittelten Steigerung des basalen Glucose Transports durch Palmitat	60
3.3 TNF/Insulin Crosstalk in Kym-1 Rhabdomyosarkomzellen – Hemmung mitogener Signalwege	61
3.3.1 Untersuchung verschiedener Rhabdomyosarkom Zelllinien auf einen „Crosstalk“ der TNF und Insulin Signalwege	61
3.3.2 Expression funktioneller Insulin und TNF Signalwege	62
3.3.3 Insulin Abhängigkeit der Proliferation von Kym-1 Zellen	63
3.3.4 Insulin induzierte STAT5b Tyrosin Phosphorylierung	64
3.3.5 Hemmung der Insulin induzierten Phosphorylierungen von IR $\beta$ , STAT5b und IRS-1 durch TNF	66
3.3.6 Hemmung der Insulin induzierten IRS-1 Phosphorylierung durch den Typ I TNF Rezeptor	68
3.3.7 Hemmung der Insulin induzierten Aktivierung der Raf1/MEK/MAPK Kaskade durch TNF	69
3.3.8 Hemmung der zellulären Proliferation durch TNF	70
3.3.9 Differenzierung von Kym-1 mit TNF	72
3.4 Entwicklung eines Testsystems zur Bestimmung der Insulin Rezeptor Aktivität in Rat1 HIR c15 Zellen	73
3.4.1 Insulin induzierte Tyrosin Phosphorylierungen der IR $\beta$ -Kette und von STAT5b	73
3.4.2 Transfektion von Rat1 HIR c15 Zellen mittels Lipofektion	74
3.4.3 Insulin induzierte STAT5b abhängige Aktivierung eines Luciferase Reportergens	75
3.4.4 Potenzierung der Insulin induzierten Luciferase Aktivität durch Dexamethason	77
<b>4 Diskussion</b>	78
4.1 pmi28 Myotuben als neues Zellmodell für Insulin Resistenz am Skelettmuskel	78
4.2 TNF/Insulin „Crosstalk“ in pmi28 Myotuben - Rolle von TNF bei der Insulin Resistenz der murinen Skelettmuskulatur	79
4.3 Palmitat/Insulin „Crosstalk“ in pmi28 Myotuben - Rolle der freien Fettsäuren bei der Insulin Resistenz der murinen Skelettmuskulatur	83
4.4 Modell der Insulin Resistenz in pmi28 Myotuben und Interpretation der wichtigsten Tiermodelle mit Hilfe dieser Daten	87
4.5 Potentielle Rolle des TNF/Insulin „Crosstalks“ bei der Hemmung proliferativer Signale	89
4.6 Selektive, JAK2 unabhängige Aktivierung von STAT5b durch Insulin	91
4.7 Entwicklung eines automatisierbaren Reporter gen Testsystems zur Bestimmung der Aktivität der Insulin Rezeptor Kinase	93
<b>Literatur</b>	95
<b>Anhang</b>	112



## Abkürzungen

AA	Aminosäure	β-Gal	β-Galaktosidase
Abb.	Abbildung	GLUT	Glucosetransporter
AP	Alkalische Phosphatase	JAK	Januskinase
ATP	Adenosintriphosphat	JNK	c-Jun N-terminale Kinase
BAT	braunes Fettgewebe	Kap.	Kapitel
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-Indolylphosphat	k/o	„knock out“
BMI	„body mass index“ $BMI=w/h^2$ (w=Gewicht [kg]; h=Höhe [m])	KV	Kristallviolett
BSA	Rinder Serumalbumin	LAR	„leukocyte common antigen-related“
cAMP	zyclisches Adenosinmonophosphat	luc	Luciferase
CAPK	Ceramid aktivierte Proteinkinase	MAPK	„mitogen-activated protein kinase“
CS	Kälberserum	Mio	Million(en)
DAG	Diacylglycerol	MSH	Melanozyten stimulierendes Hormon
DAPI	4,6-Diamino-2-Phenylindoldihydrochloridhydrazat	MTT	3-(4,5 Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-Bromid
DC	Dünnschichtchromatographie	mu	murin
DNA	Desoxyribonukleinsäure	NBT	p-Nitrotetrazoliumblauschwarz
DTT	Dithiothreitol	NF-κB	„nuclear factor kappa B“
E. coli	Escherichia coli	NGT	„normal glucose tolerance“
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetra Essigsäure	NIDDM	„non insulin-dependent diabetes mellitus“
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetra Essigsäure	NPP	p-Nitrophenylphosphat
ELISA	„enzyme linked immunosorbent assay“	NPY	Neuropeptid Y
EMSA	„electrophoretic mobility shift assay“	PAGE	Polyacrylamidgel Elektrophorese
Erk	„extracellular signal-regulated kinase“	PAME	Palmitoylethylester
F(ab') <sub>2</sub>	Antigen bindendes Fragment (Dimer)	PBS	„phosphate buffered saline“
FCS	Fötale Kälberserum	PFA	Paraformaldehyd
FFA/FFS	Freie Fettsäure	PI 3-kinase	Phosphatidylinositol 3-Kinase
g	Gravitationskonstante	PIG-PLC	Phosphatidylinositol(glycan) spezifische Phospholipase C

---

PIP	Phosphatidylinositol Phosphat
PKA	Protein Kinase A
PKB/Akt	Protein Kinase B/Akt
PKC	Protein Kinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPAR $\gamma$	„peroxisome proliferator activated protein $\gamma$ “
PS	Phosphoserin
PTB	Phosphotyrosin bindende Domäne
PTPase	Phosphotyrosin Phosphatase
PY	Phosphotyrosin
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH	„src homology“
STAT	„signal transducer and activator of transcription“
Tab.	Tabelle
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TR60/TNF R1	TNF Rezeptor Typ 1
TR80/TNF R2	TNF Rezeptor Typ 2
TRADD	„TNF R1 associated death domain protein“
TRAF	„TNF receptor associated factor“
Tris	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
UEH	Untereinheit
VLDL	„very low density“ Lipoproteine
v/v	Volumen pro Volumen
WAT	weißes Fettgewebe
w/v	Gewicht pro Volumen
Z-VAD-fmk	(Z-Val-Ala-DL-Asp-fluoromethylketone)