Aus der
Medizinischen Klinik I
im Berufsgenossenschaftlichen Universitätsklinikum Bergmannsheil
der Ruhr-Universität Bochum
Direktor: Prof. Dr. med. H. H. Klein

Untersuchungen zur möglichen Rolle des Prohibitin 1 bei der
Entstehung der Insulinresistenz

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
einer
Hohen Medizinischen Fakultät
der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
Benjamin Assad Jaghutriz
aus Herne
2013

Dekan: Prof. Dr. med. K. T. Überla

Referent: Prof. Dr. med. H. H. Klein

Koreferent: Prof. Dr. med. M. Enderle

Tag der mündlichen Prüfung: 03.07.2014

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	6
1.1 Bedeutung und mögliche Ursachen der Insulinresistenz	6
1.2 Potentielle Rolle von Prohibitin 1 bei der Entstehung der Insulinresistenz	10
2. HYPOTHESE UND ZIELSETZUNG	13
3. MATERIAL UND METHODEN	14
3.1 Materialien, Puffer und Lösungen	14
3.1.1 Chemikalien	14
3.1.2 Medien und Lösungen für die Zellkultur.....	15
3.1.3 Medien und Lösungen für die Bakterien- und Zellkultur.....	15
3.1.4 Materialien und Lösungen für molekularbiologische Experimente	17
3.1.5 Materialien und Lösungen für proteinbiochemische Experimente.....	18
3.1.6 Antikörper	21
3.1.7 Geräte.....	22
3.2 Molekularbiologische Methoden	23
3.2.1 Herstellung von PHB1 DNA	23
3.2.2 Ligation der PHB1 DNA mit dem Plasmid pIRES2_eGFP zum Vektor pIRES_PHB1	24
3.2.3 Bakterientransformation und Vervielfältigung des Vektors pIRES_PHB1	26
3.3 Zellbiologische Methoden	27
3.3.1 Transiente Transfektion von C2C12 Mausmyoblasten	27
3.3.2 Insulinstimulation und Lysieren der Zellen.....	29
3.4 Proteinbiochemische Methoden.....	29
3.4.1 Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	29
3.4.2 Western Blot	30
3.5 Statistische Auswertung.....	32

4. ERGEBNISSE	33
4.1 Überprüfung des Vektors pIRES_PHB1	33
4.2 Überexpression von PHB1 in C2C12 Mausmyoblasten.....	33
4.3 Effekte der PHB1 Überexpression auf die Phosphorylierung von PKB am Serin 473	35
4.4 Effekte der PH1 Überexpression auf die Expression mitochondrialer Proteine	37
5. DISKUSSION	39
6. ZUSAMMENFASSUNG.....	42
7. LITERATURVERZEICHNIS.....	44
DANKSAGUNG	
LEBENS LAUF	

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
AU	arbitrary units
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
bp	Basenpaare
DAG	Diacylglycerol
DCA	Dichloressigsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Dinukleotidtriphosphate
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	enhanced green fluorescent protein
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FCS	Fetales Kälberserum
Glc	Glukose
IGEPAL	Octylphenoxypolyethoxyethanol
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
LCCoA	long chain acyl coenzyme A
MCS	multiple cloning site
mtDNA	mitochondriale DNA
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NIH	National Institutes of Health
PBS	phosphate buffered saline
PBS-T	phosphate buffered saline with tween
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDK1	Phosphoinositid abhängige Proteinkinase 1
PDK	Pyruvatdehydrogenase Kinase

PDH	Pyruvatdehydrogenase
PHB1	Prohibitin 1
PHB2	Prohibitin 2
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP 4,5	Phosphoinositol 4,5 Bisphosphat
PIP-3,4,5	Phosphoinositol 3,4,5 Trisphosphat
PKB/Akt	Proteinkinase B
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSP	Phospho-Pyruvatdehydrogenase-Phosphatasen
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	Standard Fehler des Mittelwertes
Ser	Serin
TBS-T	tris buffered saline with tween
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tyr	Tyrosin
u	unit
WB	Western Blot

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Skizze des pIRES_PHB1 Vektors	26
Abbildung 2: Restriktionsverdau von dem Plasmid pIRES_PHB1	33
Abbildung 3: Überexpression von PHB1 in C2C12 Mausmyoblasten	34
Abbildung 4: Charakterisierung der transienten Überexpression von PHB1	35
Abbildung 5: Auswirkung der PHB1 Überexpression auf die Phosphorylierung von PKB an Ser473	36
Abbildung 6: Auswirkungen einer PHB1 Überexpression auf die Proteinexpression von PDH E1- α , Cytochrom c 1, ATP Synthase α und ATP Synthase β	38

1. Einleitung

1.1 Bedeutung und mögliche Ursachen der Insulinresistenz

Der Diabetes mellitus ist eine chronische Erkrankung mit einer Prävalenz von ca. 6-8 %. Mit einem Anteil von ca. 90% stellt der Typ 2 Diabetes die größte Untergruppe dar. Innerhalb der letzten Jahrzehnte war seine Prävalenz steigend und es wird davon ausgegangen dass sich dieser Trend in Zukunft fortsetzen wird [28, 72]. Wie die CODE-2 Studie gezeigt hat, entstehen auf Grund der Therapie des Typ 2 Diabetes und seiner Folgeerkrankungen volkswirtschaftlich relevante Kosten, welche wegen der zunehmenden Prävalenz in Zukunft ansteigen werden [32].

Bei der Pathophysiologie des Typ 2 Diabetes spielt die periphere Insulinresistenz eine wichtige Rolle [40, 42, 75]. Sie ist durch eine verminderte Wirkung von Insulin auf insbesondere Skelettmuskelzellen und damit durch eine Glukoseverwertungsstörung gekennzeichnet [76]. Da der Skelettmuskel für den Großteil der insulinabhängigen Glukoseaufnahme verantwortlich ist, hat seine Insulinresistenz Auswirkungen auf den Glukosemetabolismus des gesamten Körpers.

Zur Insulinresistenz tragen vermutlich mehrere Faktoren bei. So gibt es Hinweise, dass die Übertragung des Insulinsignals auf die Zelle gestört sein könnte [13, 20, 36, 45, 57]. Insulin bindet seinen Rezeptor, der eine an der Zellmembran lokalisierte Rezeptortyrosinkinase ist, und initiiert damit die Insulinsignalkaskade. Der Insulinrezeptor besteht aus zwei extrazellulären α - und zwei transmembranösen β -Untereinheiten. Bindet Insulin an die α -Untereinheit des Insulinrezeptors führt dies zur Aktivierung der intrinsischen Tyrosinkinaseaktivität und damit zu Autophosphorylierungen an Tyrosinresten [63]. An diese phosphorylierten Tyrosine können sich verschiedene Insulinrezeptorsubstrate (IRS) binden. Hierbei ist insbesondere IRS-1 von Bedeutung, welches seinerseits u.a. mit der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)

interagiert [51]. Die PI3K besteht aus einer regulierenden Untereinheit (p85) mit der sie IRS-1 bindet und einer katalytischen Untereinheit (p110), die Phosphoinositol 4,5 Bisphosphat (PIP 4,5) an Position 3 phosphoryliert [51]. Hierdurch entsteht der Signaltransmitter Phosphoinositol 3,4,5 Trisphosphat (PIP-3,4,5), welcher mit der Phosphoinositid abhängigen Proteinkinase 1 (PDK-1) interagiert und sie aktiviert. Die PDK-1 aktiviert ihrerseits durch Phosphorylierung die Proteinkinase PKB (Proteinkinase B) an Thr 308 und Ser 473 [1]. Die PKB ist ein wichtiger Bestandteil des Insulinsignalweges und beeinflusst u.a. die Glykogensynthese und die Proteinexpression [17, 53]. Neben diesem Signalweg gibt es weitere insulinvermittelte Signalwege wie den Ras/MAP-Kinase Signalweg oder den CAP/Cbl Signalweg über die sowohl das Zellwachstum als auch die Zellproliferation [15, 64] sowie der Glukosetransport reguliert werden [11, 16]. Letztendlich sind noch nicht alle Schritte, die zur Umsetzung des Insulinsignales führen, bekannt.

Die Frage, ob bei Patienten mit Typ 2 Diabetes Alterationen in den o.g. Schritten des Insulinsignalwegs vorliegen, wird kontrovers diskutiert. Es gibt Arbeiten, in denen eine verminderte Tyrosinkinaseaktivität des Insulinrezeptors bei Patienten mit Typ 2 Diabetes im Vergleich zu gesunden Probanden mit gleichen body mass index (BMI) beschrieben wird [4, 20, 41]. Ebenfalls wurde eine verminderte insulinabhängige IRS-1 Phosphorylierung und geringere Aktivitäten der PI-3 Kinase [12, 34] und der PKB bei Patienten mit Typ 2 Diabetes angenommen [37, 38]. Diese Veränderungen wurden allerdings in späteren Arbeiten, Arbeiten unserer Arbeitsgruppe inbegriffen, nicht bestätigt [36, 45].

Es ist daher unklar, ob die initialen Schritte des Insulinsignalweges an den beschriebenen Stellen gestört sind. Veränderungen im bekannten Teil der Kaskade erklären somit wahrscheinlich nicht oder nicht vollständig die Insulinresistenz. Es ist daher anzunehmen, dass Veränderungen im Bereich der noch nicht bekannten weiteren Insulinsignalkaskade oder im Bereich der Effektormechanismen wie z.B. dem Glukosetransport [22], der Aktivität von Stoffwechselenzymen [23] bzw. bei der mitochondrialen Substratutilisation vorliegen.

Störungen der mitochondrialen Funktion im Sinne einer veränderten mitochondrialen Substratutilisation bei Patienten mit Typ 2 Diabetes werden auf verschiedenen Ebenen angenommen. Eine Ebene stellt die mitochondriale Atmungskette und die ATP Synthase dar [49, 59].

Die Atmungskette dient dem Transfer von Elektronen entlang der inneren mitochondrialen Membran. Unter Verbrauch von Reduktionsäquivalenten, die in der β -Oxidation und dem Citratzyklus gewonnen wurden, wird hierüber ein elektrochemisches Potential aufgebaut [48]. Dieses kann im Weiteren für die oxidative Phosphorylierung genutzt werden, sodass der Energieträger ATP gebildet wird [48]. An dem Aufbau des elektrochemischen Potentials sind vier Komplexe der Atmungskette beteiligt:

Ubichinon-Oxidoreduktase	(Komplex I)
Succinat-Dehydrogenase	(Komplex II)
Cytochrom-bc1	(Komplex III)
Cytochrom-c-Oxidase	(Komplex IV)

Die Komplexe nehmen Elektronen von Trägern wie NADH und FADH_2 auf und übertragen diese auf Redox-Moleküle. Die Komplexe I, III und IV generieren den Protonengradienten, der für die Gewinnung von ATP durch die ATP Synthase im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung genutzt wird. Die ATP Synthase besteht aus zwei Untereinheiten, dem F_0 -Teil sowie dem F_1 -Teil, die wiederum aus mehreren Untereinheiten zusammengesetzt werden. Entlang des F_0 Teils, der die Funktion eines Protonenkanals hat, fließen Protonen aus dem Intermembranraum in die mitochondriale Matrix. Diesen Protonenfluss ausnutzend, kann an dem F_1 Teil das aus ADP und anorganischem Phosphat gebildete ATP freigesetzt werden [25].

Bei Patienten mit Typ 2 Diabetes wird angenommen, dass die Aktivität der Atmungskette geringer ist [33, 49, 62]. Hierzu passt eine verminderte Expression der Komplexe I bis IV der Atmungskette [27, 33, 39], was allerdings nicht von allen Arbeitsgruppen für alle Komplexe gefunden wurde [39].

Neben einer Dysfunktion auf Ebene der Atmungskettenkomplexe wird auch eine gestörte Funktion der ATP Synthase bei Patienten mit Typ 2 Diabetes angenommen [10]. So wurde bei adipösen Patienten mit Typ 2 Diabetes gezeigt, dass bei ihnen die ATP-Syntheserate (ATPmax) verglichen mit schlanken bzw. adipösen Probanden verringert ist [10]. Des Weiteren wurde an Muskelbiopsien von Patienten mit Typ 2 Diabetes im Vergleich zu schlanken Probanden eine verminderte Expression und Phosphorylierung der β -Untereinheit der ATP Synthase gefunden, was zu einer verminderten ATP Bildung beitragen könnte [26, 27]. Um die genauen Konsequenzen dieser veränderten Phosphorylierung abzuschätzen bedarf es allerdings weiterer Untersuchungen.

Es wird angenommen, dass es durch eine gestörte Funktion der Atmungskette und der ATP Synthase zu einer Substratakkumulation im Bereich des Citratzyklus kommt, was letztendlich in einer Anhäufung von intrazellulären Lipiden mündet [59, 66]. Intrazelluläre Lipide wie Diacylglycerol oder LCCoA (long chain acyl coenzyme A) können den Insulinsignalweg stören und hierüber zur Insulinresistenz beitragen [18, 50, 74]. Außerdem kann eine Dysfunktion im Bereich der Atmungskette zu einer vermehrten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führen [30]. ROS können sowohl die mitochondriale DNA (mtDNA) und damit die kodierenden Gene für die Komplexe der Atmungskette schädigen, als auch direkte Schäden an der mitochondrialen Membran verursachen [19]. Über diese Wege und auch über eine direkte Störung des Insulinsignalweges können ROS zur Entstehung der Insulinresistenz beitragen [19].

Neben den o.g. Störungen auf den Ebenen der mitochondrialen Atmungskette und ATP Synthase wird auch auf der Ebene des mitochondrialen Proteinkomplex der Pyruvatdehydrogenase (PDH) [9, 31], welcher Glykolyse und Citratzyklus miteinander verbindet, bei insulinresistenten Patienten eine Störung angenommen. Die PDH katalysiert die Bildung von Acetyl-CoA aus Pyruvat und wird über eine reversible Phosphorylierung an der Untereinheit E1 α durch Pyruvatdehydrokinasen (PDK) deaktiviert [29]. Dephosphoryliert und aktiviert wird sie durch die Phosphopyruvatdehydrokinase Phosphatase (PSP)

[24]. In zwei Tiermodellen für Insulinresistenz und Typ 2 Diabetes wurde gezeigt, dass bei insulinresistenten Ratten zum einen eine verminderte PDH Aktivität und zum anderen eine reduzierte Glukoseoxidation vorlag [9, 65].

1.2 Potentielle Rolle von Prohibitin 1 bei der Entstehung der Insulinresistenz

Prohibitin 1 (PHB1) ist ein 32kDa messendes hochkonserviertes mitochondriales Protein, das auch im Zytosol lokalisiert ist [6, 46, 47]. Es gehört zu einer Gruppe von membranassoziierten Proteinen wie Flottilinen, Stomatinen und HflKC-Proteinen deren gemeinsames strukturelles Merkmal die PHB1 Domäne ist [52, 69]. Ursprünglich wurden dem Protein antiproliferative und auch antitumoröse Eigenschaften zugeschrieben. Untersuchungen aus der Tumorforschung zufolge interagiert PHB1 mit Transkriptionsfaktoren wie p53, Rb und E2F [21, 71]. Hierüber reguliert es die Transkription und somit auch die Expression von Proteinen [70].

Eine wichtige Funktion von PHB1 besteht in der Organisation der mitochondrialen Morphologie. Ein Fehlen von PHB1 führt zu einer gestörten Morphogenese der mitochondrialen Cristae [44, 58]. PHB1 bildet mit Prohibitin 2 (PHB2) an der inneren mitochondrialen Membran einen ca. 1MDa großen multimerischen Komplex [55, 56], der aus 12-16 zusammengesetzten Untereinheiten von PHB1 und PHB2 Molekülen besteht [8, 68]. Ein Ausschalten von PHB1 oder PHB2 führt zu einem Fehlen des Komplexes [7, 43]. Aufgabe des Komplexes ist es, die Faltung von Proteinen zu unterstützen und eine Degradation ungefalteter Proteine beispielsweise durch mAAA-Proteasen zu verhindern. Der Prohibitin Komplex bildet mit den mAAA-Proteasen einen Superkomplex und ein Fehlen von Prohibitinen fördert die Proteolyse von ungefalteten Proteinen [67].

Darüber hinaus bindet PHB1 zusammen mit PHB2 direkt Untereinheiten von Komplex IV der Atmungskette und stabilisiert dadurch vermutlich die Konformation des Komplex IV [55, 56]. Auch wurde eine Bindung von PHB1 mit

Untereinheiten vom Komplex I der Atmungskette beschrieben, die möglicherweise zur Stabilisierung des Komplexes dient [14]. Die Frage, ob eine PHB1 Expression zu einer Dysfunktion auf Ebene der Atmungskette führen kann, wie sie bei der Insulinresistenz beschrieben ist, und ob dies durch Beeinflussung der Proteinexpression erfolgt, ist bisher unklar.

Neben einer Beeinflussung der mitochondrialen Funktion könnte PHB1 auch den Insulinsignalweg beeinflussen, indem PHB1 mit Elementen des Insulinsignalweges interagiert. So wurde beschrieben, dass PHB1 in C2C12 Mausmuskelzellen insulinabhängig am Tyr114 phosphoryliert wird und hierüber mit der Phosphatase Shp1 interagiert [2]. Die Auswirkungen dieser insulinabhängigen Phosphorylierung auf den Metabolismus der C2C12 Mausmyoblasten sind allerdings unklar und daher auch die damit möglichen verbundenen Auswirkungen auf den Insulinsignalweg. Die gleiche Arbeitsgruppe fand, dass PHB1 auch mit PIP3 interagiert [3]. PIP3, an der Zellmembran lokalisiert, ist das Produkt der PI-3 Kinase und ein essentieller Bestandteil des Insulinsignalweges. PIP3 aktiviert die Proteinkinase PKB, die ihrerseits eine Schnittstelle im Insulinsignalweg ist und im aktivierten Zustand anabol wirkt. In Lipid-Protein Überlagerungsversuchen und sowie in 3T3-L1 Adipozyten wurde dargestellt, dass PHB1 in vitro an PIP3 binden kann [3]. Da auch PHB1 an zellulären Membranen lokalisiert ist, ist eine Interaktion von PHB1 mit PIP3 in humanem Skelettmuskel und damit eine Beeinflussung des Insulinsignalweges denkbar [5, 56]. Zusammenfassend geben diese Untersuchungen daher Hinweise darauf, dass PHB1 die Insulinsignalkaskade und damit die zelluläre Umsetzung des Insulinsignals beeinflussen könnte, zumal bereits gezeigt wurde, dass Prohibitin eine Rolle in anderen Signalwegen wie dem Ras-Raf Signalweg innehat [60, 61].

Schließlich hatte unsere Arbeitsgruppe Hinweise, dass PHB1 eine Rolle beim Typ 2 Diabetes und Adipositas spielen könnte. In Muskelbiopsien vom M. vastus lateralis war die Proteinexpression des PHB1 im Skelettmuskel von adipösen Probanden tendenziell niedriger als bei schlanken Probanden und bei Patienten mit Typ 2 Diabetes noch niedriger als bei adipösen Probanden [35]. Außerdem korrelierte die PHB1 Expression in humanen Skelettmuskelzellen

signifikant positiv mit der Glukoseverschwinderate und -oxidation nach Insulinstimulation. In der vorliegenden Arbeit sollte nun überprüft werden, ob eine veränderte PHB1 Expression tatsächlich zu einer unterschiedlichen Insulinwirksamkeit führt.

2. Hypothese und Zielsetzung

Die Hypothese war, dass eine PHB1 Überexpression

- a) zu einer gesteigerten Wirkung von Insulin auf Elemente des Insulinsignalweges führt und/oder
- b) eine veränderte Proteinexpression mitochondrialer Proteine bewirkt, die für die oxidative Phosphorylierung und Decarboxylierung verantwortlich sind.

Es sollte deshalb überprüft werden, welche Auswirkungen diese Überexpression auf:

- 1) die Insulinsignaltransduktion hat. Hierzu sollte stellvertretend die insulinabhängige Phosphorylierung von PKB gemessen werden.
- 2) die Expression mitochondrialer Proteine hat, die für die oxidative Phosphorylierung bedeutsam sind. Hier wurde die Abundanz von der Untereinheit c1 des Komplex III der Atmungskette und der Untereinheiten α und β des F1 Teils der ATP-Synthase untersucht.
- 3) die Expression und Phosphorylierung der E1 α Untereinheit der PDH hat, die eine Schnittstelle zwischen Glykolyse und Citratzyklus darstellt.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien, Puffer und Lösungen

3.1.1 Chemikalien

Aceton	(Roth; Karlsruhe, Deutschland)
Acrylamid	(Roth; Karlsruhe, Deutschland)
Agar	(AppliChem; Darmstadt, Deutschland)
Albumin (Fraktion V)	(AppliChem; Darmstadt, Deutschland)
Aprotinin	(AppliChem; Darmstadt, Deutschland)
CASY@ton	(Schärfe System; Reutlingen, Deutschland)
Dimethylsulfoxid	(AppliChem; Darmstadt, Deutschland)
DMEM	(PAA; Pasching, Österreich)
Essigsäure	(Sigma; München, Deutschland)
Ethidiumbromid Lösung	(Sigma; München, Deutschland)
Hefeextrakt	(AppliChem; Darmstadt, Deutschland)
Leupeptin	(AppliChem; Darmstadt, Deutschland)
Methanol	(Roth; Karlsruhe, Deutschland)
Milchpulver	(Roth; Karlsruhe, Deutschland)
Natriumchlorid	(AppliChem; Darmstadt, Deutschland)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	(AppliChem; Darmstadt, Deutschland)
PBS (1x)	(PAA; Pasching, Österreich)
Phenolrot	(AppliChem; Darmstadt, Deutschland)
Phenylmethylsulfonyl Fluorid	(Roche; Mannheim, Deutschland)
Tris	(AppliChem; Darmstadt, Deutschland)
Trypton	(AppliChem; Darmstadt, Deutschland)
Tween 20	(Roth; Karlsruhe, Deutschland)

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien waren von höchstem Reinheitsgrad und stammten von folgenden Firmen:

AppliChem (Darmstadt, Deutschland), Sigma (München, Deutschland) oder Roth (Karlsruhe, Deutschland).

Verbrauchsmaterialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Plastikwaren wie Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen und Zellkulturflaschen wurden von der Firma Peske (Aindling-Arnhofen, Deutschland) bezogen.

3.1.2 Medien und Lösungen für die Zellkultur

Antibiotika

Kanamycin (Sigma; München, Deutschland)

Stammlösung: 30 mg/ml

Gebrauchslösung: 50 µg/ml

Penicillin/Streptomycin (PAA; Pasching, Österreich)

Stammlösung: 100 x

Gebrauchslösung: 1x

Bakterien und Zelllinie

E.coli DH5α

C2C12 Mausmyoblasten (ATCC; Manassas, USA)

3.1.3 Medien und Lösungen für die Bakterien- und Zellkultur

E. coli LB (Luria-Broth)-Medium

1 % (w/v) Pepton

0,5 % (w/v) Hefeextrakt

1 % (w/v) NaCl

pH 7,5

LB Medium + Agar

1% (w/v)	Hefe Exktrakt
1% (w/v)	BactoPene (Trypton)
0,5% (w/v)	NaCl
2%	Agar
100µg/ml	Kanamycin

SOC Medium

2% (w/v)	Bacto Pepton
1% (w/v)	Hefe Extrakt
0,1% (w/v)	NaCl
20mM	Glukose

Wachstumsmedium

DMEM (4,5% Glucose, Glutamin, 0,2% Penicillin-Streptomycin, 10% FCS)

Hungermedium

DMEM (4,5% Glucose, Glutamin, 0,2% Penicillin-Streptomycin, 1% FCS)

Insulin

I-9378 (Sigma-Aldrich; Pasching, Österreich)

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Medien und Zellkulturzusätze wie DMEM, EDTA, FCS, L-Glutamin 200 mM (100x), Trypsin und PBS wurden von der Firma PAA (Pasching, Österreich) bezogen.

3.1.4 Materialien und Lösungen für molekularbiologische Experimente

Reverse Transkription und PCR

QIAamp RNA Blood Mini Kit	(Qiagen; Hilden, Deutschland)
mi-reverse Transcriptase Kit	(Metabion; Martinsried, Deutschland)
Pfu Polymerase	(Fermentas; St. Leon-Rot, Deutschland)
dNTP's	(Fermentas; St. Leon-Rot, Deutschland)
10x Puffer (mit MgS4)	(Fermentas; St. Leon-Rot, Deutschland)

Oligonukleotide

Die hier verwendeten Oligonukleotide (Primer) wurden selbst entworfen und von der Firma Metabion (Martinsried, Deutschland) hergestellt.

Primer forward EcoR1: 5'-aaa aga att cgc cac **cat ggc** tgc caa agt gtt tg-3'

Primer reverse BamH1: 5'-aaa agg atc **ctc act** ggg gca gct gga g-3'

Restriktionsenzyme

Fast Digest EcoR1	(Fermentas; St.Leon-Rot, Deutschland)
Fast Digest BamH1	(Fermentas; St.Leon-Rot, Deutschland)
Fast Digest Puffer	(Fermentas; St.Leon-Rot, Deutschland)

Ligation

T4 Ligase	(Fermentas; St.Leon-Rot, Deutschland)
10 x T4 Ligase Puffer	(Fermentas; St.Leon-Rot, Deutschland)
FAST Alkaline Phosphatase (FAP)	(Fermentas; St.Leon-Rot, Deutschland)

Agarosegelelektrophorese

Agarose	(SeaKam LE; Cambrex, USA)
6x MassRuler Loading Dye	(Fermentas; St.Leon-Rot, Deutschland)
Gene Ruler 1kb DNA Ladder Plus	(Fermentas; St.Leon-Rot, Deutschland)

TAE 50x

2M Tris

1M Acetat

0,5 M EDTA

1% Agarosegel

1g Agarose

100 ml 1x TAE

10µl Ethidiumbromid

Gelextraktion und DNA Aufreinigung

QIAquick Gelextraktion Kit (Qiagen; Hilden, Deutschland)

QIAquick DNA Purification Kit (Qiagen; Hilden, Deutschland)

Bakterienpräparation

QIAprep spin Miniprep Kit (Qiagen; Hilden, Deutschland)

Nucleobond AX (Machery-Nagel; Düren, Deutschland)

3.1.5 Materialien und Lösungen für proteinbiochemische Experimente**Transfektion**

Metafectene Pro (Biontex; Martinsried, Deutschland)

Lysepuffer für Zellyse (ad a. dest)

8mM EDTA

20mM Hepes

1% IGEPAL

160mM NaF

10mM Na₄P₂O₇

0,2mM NaVO₃

2mM DCA

100µg/ml Trasylol

30mM Benzamidin

2,5µg/ml Leupeptin
2,5µg/µl Pepstatin
5mM PMSF
pH bei 4°C auf 7,4 einstellen

Gel Puffer (ad 1l a. dest.)

3M Tris
10mM SDS
pH auf 8,4 einstellen

10% Tris-Tricin Trenngel

33%	a. dest.
33%	Gel Puffer
33%	Acrylamid (30%)
0,6%	10% APS
0,4%	Temed

4 % Sammelgel

61,5%	a. dest.
25%	Gel Puffer
12,5%	Acrylamid (30%)
0,5%	10% APS
0,5%	Temed

Proteinbestimmung

BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology; Rockford, USA)

semi-dry Western Blot

PVDF Membran	(Millipore; Massachusetts, USA)
Rotilabo Blottingpapier	(Roth; Karlsruhe, Deutschland)

semi-dry Transferpuffer (ad 2l a. dest)

48mM	Tris
39mM	Gylcin

20% Methanol
0,04% (m/v) Natriumdodecylsulfat

Proteinstandard

PageRuler SM1811

(Fermentas; St.Leon-Rot, Deutschland)

Anoden Puffer (ad 1l a.dest.)

200mM Tris

pH auf 8,9 mit HCl einstellen

Kathoden Puffer (ad 1l a.dest.)

100mM Tris

100mM Tricin

0,1% SDS

NTBPF (ad 1l a. dest.)

50mM Natriumchlorid,

50mM Tris

50mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$

100mM NaF

0,1% (m/v) Natrium-Methylhydroxybenzoat,

0,5% (m/v) BSA

0,05% (m/v) Triton-X 100

pH auf 7,4 einstellen

1x TBS-Tween (ad 1l a. dest.)

50mM Tris

150mM NaCl

0,05% Tween-20

mit a. dest. auf 1l auffüllen

pH auf 7,5 einstellen

Milch blocking Puffer

1x TBS-T

5% Milchpulver (blotting grade)

(Roth; Karlsruhe, Deutschland)

10x PBS (ad 1l a. dest.)

1,4M NaCl

27mM KCl

15mM KH₂PO₄

81mM Na₂HPO₄ x 2H₂O

1mM NaN₃

mit NaOH pH auf 7,4 einstellen

1x PBS-T 0,1 % (v) Tween 20 (ad 1l a. dest.)

100ml 10x PBS

0,1% Tween

3.1.6 Antikörper

Primäre Antikörper gegen

Aktin (Sigma Aldrich # A2066; Hamburg, Deutschland)

PKB/Akt 1 gesamt (2H10) (Cell Signaling # 2967; Boston, USA)

PKB/Akt 1 pSer 473 (Cell Signaling # 4058; Boston, USA)

ATP-Synthase (Invitrogen # 459240; Darmstadt, Deutschland)

Untereinheit α

ATP-Synthase (Invitrogen # A21351; Darmstadt, Deutschland)

Untereinheit β

Cytochrom bc1 subunit core 1 (Invitrogen # 459140; Darmstadt, Deutschland)

Pyruvatdehydrogenase (Mitosciences # MSP03; Eugene, USA)

Untereinheit E1 α

Prohibitin 1 (Cell Signaling # 2426; Boston, USA)

Sekundäre Antikörper

Goat anti-mouse IRDye 680	(Licor Biotechnology #926-68020; Bad Homburg, Deutschland)
Goat anti-rabbit IRDye 800CW	(Licor Biotechnology #926-32211; Bad Homburg, Deutschland)

3.1.7 Geräte

Biophotometer	(Eppendorf; Hamburg Deutschland)
CASY® Zellzähler	(Schärfe System; Reutlingen, Deutschland)
Gelelektrophoresekammer	(Owl Scientific; Woburn, USA)
Odyssey-Scanner	(Li-COR Biosciences; Bad Homburg, Deutschland)
Schüttelapparat/Inkubator 1000	(Heidolph; Schwabach, Deutschland)
Thermocycler	(Labtech, Ringmer, UK)
Thermocycler Mastercycler Gradient	(Eppendorf; Hamburg Deutschland)
Thermomixer comfort	(Eppendorf; Hamburg Deutschland)
Western-Blot-Apparatur Semi-Phor™	(Hoefer Scientific Instruments; Holliston, USA)
Western-Blot-Apparatur semi-dry	(CBS Scientific; San Diego, USA)
Zentrifugen:	
Biofuge	(Heraeus; Hanau, Deutschland)
Hettich 22r	(Hettich; Tuttlingen, Deutschland)
Mega Fuge 10 R	(Thermo Scientific; Langenselbold, Deutschland)
Speedvac Concentrator	(Savant; Buckinghamshire, UK)

Alle weiteren hier nicht aufgeführten Geräte entsprachen dem allgemeinen Laborstandard.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Herstellung von PHB1 DNA

Mit dem Ziel PHB1 DNA in C2C12 Mausmyoblasten zu überexprimieren musste zunächst PHB1 DNA hergestellt werden. Hierzu wurde RNA von aus humanem Vollblut gewonnenen Leukozyten mittels QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen) nach Protokoll des Herstellers isoliert. Anschließend wurde die RNA per Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Für die Experimente wurde das mi-reverse Transcriptase Kit (Metabion) verwendet, die Proben nach Angaben des Herstellers angesetzt und folgende Einstellungen im Thermocycler (Eppendorf) gewählt:

1. Schritt:	5 min	4°C
2. Schritt:	30min	35°C
3. Schritt:	1h30min	55°C
4. Schritt:	10min	70°C
5. Schritt:	Stopp	4°C

Die erhaltene cDNA wurde anschließend durch die Polymerase Kettenreaktion (PCR) in DNA umgeschrieben und exponentiell amplifiziert. Hierfür wurde zuerst zur Ermittlung von optimalen Bedingungen eine Gradienten PCR durchgeführt. So wurden Ansätze mit 5µl 10x Puffer MgSO₄ (Fermentas), 1µl dNTP Mix (je 2,5mM) (Fermentas), 5µl Primer EcoR1 (25,4nmol; 1:10 verdünnt) (Metabion), 5µl Primer BamH1 (25,3nmol; 1:10 verdünnt) (Metabion), 0,5µl cDNA (0,8µg/µl), 0,5µl Pfu-Polymerase (5u) (Fermentas), 33µl a.dest. (Roth) hergestellt und die Gradienten PCR im Thermocycler (Eppendorf) wie folgt durchgeführt:

1. Schritt:	2min.	94°C	initiale Denaturierung
2. Schritt:	15sec.	97°C	Denaturierung
3. Schritt:	30sec.	58,3°C G=16,3°C	Annealing
4. Schritt:	2min	72°C	Elongation

5. Schritt:	zurück zu 2.	35 Wiederholungen	
6. Schritt:	5min	72°C	finale Elongation
7. Schritt:	Stopp	4°C	

G= Temperaturgradient über insgesamt 16,3°C von 58,6°C bis 74,3°C

Es wurde eine optimale Annealing-Temperatur bei 73,1°C ermittelt und schließlich Ansätze mit 5µl 10x Puffer MgSO₄ (Fermentas), 1µl dNTP Mix (je 2,5 mM) (Fermentas), 5µl Primer EcoR1 (25,4nmol; 1:10 verdünnt) (Metabion), 5µl Primer BamH1 (25,3nmol; 1:10 verdünnt) (Metabion), 0,5µl cDNA (0,8µg/µl), 0,5µl Pfu Polymerase (5u) (Fermentas), 33µl a.dest. (Roth) hergestellt. Die PCR wurde sodann unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

1. Schritt:	2min.	95°C	initiale Denaturierung
2. Schritt:	15sec.	95°C	Denaturierung
3. Schritt:	30sec.	73,1°C	Annealing
4. Schritt:	2min	72°C	Elongation
5. Schritt:	Zurück zu 2.	35 Wiederholungen	
6. Schritt:	5 min	72°C	finale Elongation
7. Schritt:	Stopp	4°C	

Abschließend wurde die Konzentration und Reinheit der RNA/DNA-Proben durch das Messen ihrer Extinktion bei 230, 260, 280 und 320nm photometrisch bestimmt und die Proben auf RNA/DNA Gehalt (260nm), Proteingehalt (280nm) und Verunreinigungen mit z.B. Kohlenhydraten (bei 230nm) hin untersucht.

3.2.2 Ligation der PHB1 DNA mit dem Plasmid pIRES2_eGFP zum Vektor pIRES_PHB1

Das Plasmid pIRES2_eGFP (Clontech) diente als Vektor für die Transfektion von PHB1 DNA. Es enthielt eine multiple cloning site (MCS) in der die PHB1 DNA zwischen den Restriktionsschnittstellen von EcoR1 und BamH1 einkloniert werden sollte. Darüber hinaus kodierte das Plasmid für das enhanced green

fluorescent protein (eGFP), sodass eine Kontrolle einer Transfektion mittels Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht wurde.

Für die Ligation der PHB1 DNA mit dem Plasmid pIRES2_eGFP wurde zunächst eine Restriktion der PHB1 DNA an den bei der PCR eingefügten Restriktionsschnittstellen mit den Restriktionsendonukleasen EcoR1 und BamH1 (Fermentas), unter Bildung von überhängenden Enden, durchgeführt.

EcoR1: 5' G↓ AATTC 3'

BamH1: 5' G↓ GATCC 3'

Dazu wurden 0,2µg der PHB1 DNA mit jeweils 1unit (u) der entsprechenden Enzyme, in a. dest. und Reaktionspuffer (1/10 Volumen; Fermentas) gelöst, bei 37°C für 25 min verdaut. Anschließend wurde die PHB1 DNA mit dem PCR Purification Kit (Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt.

Parallel dazu wurde auch das Plasmid mit den Restriktionsendonukleasen verdaut, um im weiteren Verlauf mit der PHB1 DNA ligiert werden zu können. Hierfür wurden 0,2µg des Plasmids pIRES_2eGFP mit 1u EcoR1 bzw. BamH1 sowie alkalische Phosphatase (Fermentas), welche durch hydrolytische Dephosphorylierung des 5' Ende der Plasmid DNA Religationen des linearisierten Plasmids verhinderte, in einer Konzentration von 1u/µg Plasmid DNA in a. dest. gelöst und in Reaktionspuffer (1/10 Volumen; Fermentas) bei 37°C für 25 min verdaut. Im Anschluss wurde der Vektor pIRES_2eGFP gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit dem Qiaquick Gelextraction Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aus dem Gel gelöst und aufgereinigt.

Nach der Restriktion der PHB1 DNA und dem Plasmid wurde ein Ansatz aus 1µl T4 Ligase (1u/µl) (Fermentas), 1µl T4 Ligase 10x Puffer (Fermentas), 1µl pIRES geschnitten (1,2µg), 1µl PHB1 geschnitten (0,04µg/µl) und 6µl a. dest. hergestellt. Nun wurden jeweils die 5'-Phosphat- und 3'-OH-Enden der PHB1 DNA und des Plasmid pIRES2_eGFP über Nacht bei 4°C ligiert. Anschließend wurde, um die Ligase zu inaktivieren, die Probe für 10min auf 65°C erhitzt. Der erhaltene Vektor pIRES_PHB1 ist in Abb. 1 gezeigt

Abbildung 1: Skizze des pIRES_PHB1 Vektors

Zu sehen ist der hergestellte Vektor pIRES_PHB. Dargestellt sind die Schnittstellen für EcoR1 und BamH, sowie die genloci für die CMV Promotorsequenz sowie das PHB1 Gen, das eGFP-Gen und das Kanamycin/Neomycin Resistenzgen.

3.2.3 Bakterientransformation und Vervielfältigung des Vektors pIRES_PHB1

Hierfür wurden *E. coli DH5 α* Bakterien mit dem Plasmid pIRES_PHB1 für 20min auf Eis und danach für 30sec bei 42°C inkubiert. Durch diesen Hitzeschock wurde die Permeabilität der Bakterienwand erhöht, sodass Plasmid-DNA aufgenommen werden konnte. Anschließend wurden die Bakterien für 2min bei 4°C und nach Zugabe von 200µl SOC Medium für 1h bei 37°C und 220rpm inkubiert. 150µl der entstandenen Bakteriensuspension wurden ausplattiert und über Nacht unter Antibiotikaselektion (hier: Kanamycin) bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurden mehrere der unter Antibiotikaselektion entstandenen Bakterienklone gepickt und zur Vervielfältigung jeweils einzeln in Reaktionsgefäßen, gefüllt mit LB-Medium, suspendiert und über Nacht bei 37°C und 220rpm auf dem Schüttler unter Selektionsdruck mit Kanamycin inkubiert. Als Kontrollgruppe wurden untransformierte Bakterien gleichermaßen behandelt.

Die Bakterien wurden sodann zur Isolierung der pIRES_PHB1 DNA nach dem Prinzip der alkalischen Lyse mit NaOH mit dem Miniprep Kit (Qiagen) für kleine

Bakterienmengen sowie mit dem Nucleobond AX Kit (Macherey-Nagel) für große Bakterienmengen präpariert, wobei sich jeweils an das Protokoll des Herstellers gehalten wurde.

Anschließend sollte mittels Restriktion durch EcoR1 und BamH1 überprüft werden, ob die PHB1 DNA in das Plasmid pIRES_eGFP kloniert wurde. Hierfür wurden 1 µg der pIRES_PHB1 DNA mit den jeweiligen Restriktionsenzymen in a. dest. sowie Reaktionspuffer (1/10 Volumen; Fermentas) gelöst und in einem Verhältnis von 1u/1µg DNA bei 37°C für 25 min verdaut. So wurde das Plasmid pIRES_PHB1 jeweils einzeln mit EcoR1 und BamH1 sowie mit beiden Restriktionsenzymen gleichzeitig verdaut.

Die Kontrolle der Restriktion erfolgte per Agarosegelelektrophorese, bei der die DNA-Fragmente aufgrund der negativen Ladung in einem elektrischen Feld ihrer Größe nach aufgetrennt wurden. Das Agarosegel wurde wie unter 3.1.4 beschrieben hergestellt, die Proben im Verhältnis 1:6 (Ladepuffer:Probe) in die Geltaschen pipetiert und als Größenstandard der DNA Gene Ruler (Fermentas) verwendet. Nach Beendigung wurde das Agarosegel unter dem UV-Illuminator analysiert und mit einer Kamera Aufnahmen hergestellt.

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Transiente Transfektion von C2C12 Mausmyoblasten

Für die in vitro Versuche wurden C2C12 Mausmyoblasten verwendet [73]. Diese aus Mäusen gewonnenen immortalisierten Muskelzellen eigneten sich aufgrund ihrer Ähnlichkeit zum humanen Skelettmuskel als Zellmodell für in vitro Experimente, um die Effekte einer Überexpression von PHB1 am Skelettmuskel zu simulieren.

Die Zellen wurden alle 3-4 Tage, nach Erreichen einer Konfluenz von 70-90%, geerntet und passagiert. Dafür wurde das Medium aus den 75cm² Zellkulturflaschen abgesaugt, die Zellen mit auf Raumtemperatur (RT)

angewärmtem PBS gespült und für 3min mit 3ml EDTA/Trypsin bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 10ml Kulturmedium aufgenommen, bei 1300rpm für 3min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 10ml Kulturmedium resuspendiert und davon 1ml in eine neue mit 15ml Kulturmedium gefüllte 75cm² Zellkulturflasche überführt.

Für die Aussaat der Zellen wurden diese gleichermaßen behandelt, das Zellpellet jedoch in 10ml Kulturmedium suspendiert und die Zellzahl mit dem Casy Zellzähler (Schärfe-System) bestimmt. Für die Zellzählung wurde die Zellsuspension in CASY@ton 1:10000 verdünnt und nach der Messung je 10⁵ Zellen/Kavität, gelöst in 2ml Kulturmedium, in einer Mehrfachkulturplatte ausgesät. Nach 22h wurde das Kulturmedium abgenommen, die Zellen mit auf RT angewärmten PBS gespült und bei 37°C in Wachstumsmedium ohne Antibiotikazusatz inkubiert.

Bei der transienten Transfektion wurde der pIRES_PHB1 Vektor unter Bildung von Komplexen aus Liposomen und Nukleinsäuren, den Lipoplexen, per Endozytose in die C2C12 Mausmyoblasten aufgenommen. Die Transfektion der Zellen wurde 24h nach Aussaat der Zellen mit dem Transfektionsreagenz Metafectene Pro (Biontex) durchgeführt. 2h vor der Transfektion wurden die Zellen auf Wachstumsmedium ohne Antibiotikazusatz inkubiert. Die höchste Transfektionseffizienz ließ sich wie folgt erreichen:

Metafectene Pro und Plasmid DNA, jeweils gelöst in 100µl DMEM (4% Glc, ohne Antibiotika und ohne FCS), wurden in einem Verhältnis von 4:1 (12µl Transfektionsreagenz : 3µg Plasmid DNA) vermischt und für 15 min bei RT präinkubiert. Anschließend wurde der Ansatz auf die in der Mehrfachkulturplatte ausgesäten C2C12 Mausmyoblasten gegeben, diese leicht geschwenkt und für 19h bei 37°C inkubiert. Hierauf wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS (bei RT) gewaschen, diese anschließend 5h auf Hungermedium inkubiert. Nach Entfernen des Hungermediums wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, die Zellkulturplatten sofort auf Flüssigstickstoff gestellt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

3.3.2 Insulinstimulation und Lysieren der Zellen

Ein Teil der C2C12 Mausmyoblasten wurden 24h nach Transfektion mit 10^{-7} mol Insulin (Sigma) stimuliert. Das Insulin wurde tropfenweise auf die Mehrfachkulturplatte gegeben, dieses vorsichtig geschwenkt und bei 37°C für 30 min inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Mehrfachkulturplatte auf Eis gestellt, die Kavitäten mit eiskaltem PBS gespült, das PBS abgesaugt, die Mehrfachkulturplatte sofort in Flüssigstickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

Zur Lyse der Zellen wurden 100µl Lysepuffer in jede Kavität der Mehrfachkulturplatte, der auf Eis liegenden Mehrfachkulturplatte, pipetiert, die Zellen mittels Zellschaber rasch abgelöst und die jeweilige Probe in ein vorgekühltes Reagenzgefäß überführt. Die Proben wurden nun für 30min zur weiteren Lyse auf Eis inkubiert und danach bei 4°C für 30min bei 13000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verarbeitung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und gelagert. Zum Aufkonzentrieren der Proben wurden die Zelllysate auf Eis aufgetaut, in der Vakuumzentrifuge für 45min bei 17000rpm zentrifugiert und daraufhin wieder in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Um gleiche Proteinmengen zu analysieren wurde vor Beginn der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) die Proteinkonzentration der aufgereinigten und aufkonzentrierten Lysate von C2C12 Mausmyoblasten mittels BCA Test bestimmt. Hierbei wurde Cu^{2+} im alkalischen Milieu durch die Proteine zu Cu^{+} reduziert (Biuret Reaktion) und dann Bicinchoninsäure hinzugefügt, welche die entstandenen Cu^{+} Ionen band. Das BCA Kit (Pierce) wurde nach Anweisung des Herstellers verwendet, mit dem Unterschied, dass

die Ansätze bei 60°C für 20min im Thermocycler inkubiert wurden. Eine Standardreihe mit einem Gehalt von 0,125µg/ml – 10mg/ml Rinderserumalbumin erlaubte eine Einordnung der Proben im linearen Bereich der Standardkurve. Die Konzentrationen wurden photometrisch mit Hilfe des Kinetic Microplate Readers ermittelt und als Standard eine Konzentrationsreihe mit in Lysepuffer gelöstem Rinderserumalbumin benutzt. Anschließend wurde die gewünschte Proteinmenge (75µg), gelöst in Lyse- und Ladepuffer, in einem Reaktionsgefäß bei 99°C für 7,5min im Thermocycler denaturiert.

Im Folgenden wurden die denaturierten Proteine mit einer SDS-PAGE ihrem Molekulargewicht nach aufgetrennt. Hierbei wurden die Taschen des gegossenen Gels mit jeweils 75µg Proteinmenge der Zelllysate beladen, als Proteinstandard der Page Ruler (Fermentas) mitaufgetragen und eine Spannung von 65V für 15h angelegt.

Durch das in der Gelmatrix vorhandene Natriumdodecylsulfat (SDS) wurden die nicht-kovalenten Bindungen der Proteine aufgebrochen, indem die Proteineigenladung durch das anionische Detergens überdeckt wurde und die Proteine dann eine konstant negative Ladungsverteilung aufwiesen. Im niedrig prozentigen Sammelgel wurden die Proteine zuerst äquilibriert und konnten daraufhin im höher prozentigen Trenngel ihrem Molekulargewicht nach aufgetrennt werden.

3.4.2 Western Blot

Durch den Western Blot (WB) wurden die Proteine, nach Anlegen eines elektrischen Feldes, elektrophoretisch aus der Polyacrylamidgelmatrix gelöst und schließlich an einer PVDF Membran (Millipore) gebunden. Die Proteinbindung an die PVDF Membran folgte unter Ausbildung hydrophober Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen. Hierfür wurde die PVDF Membran luftblasenfrei in der SemiPhor® Apparatur (Hoefer) auf zwei Blottingpapiere (Roth) gelegt, das Polyacrylamidgel auf die PVDF Membran positioniert und schließlich mit weiteren zwei Blottingpapieren überdeckt. Vor

der Zusammensetzung des Systems wurden die Blottingpapiere und die PVDF Membran im Transferpuffer äquilibriert. Die benötigte Stromstärke für wurde anhand folgender Formel berechnet:

$$1,5\text{mA}/\text{Xcm}^2$$

Der WB wurde für 2,5h bei X Ampère (siehe o.g. Formel) und festgelegter Spannung durchgeführt. Nach dem Blotten wurde die PVDF Membran für 30min in NTBPF oder Milch inkubiert, um ein Auftreten unspezifischer Bindungen mit dem Antikörper zu vermeiden. Anschließend wurden die Blots mit den primären Antikörpern in der jeweils angegebenen Konzentration für 1h bei RT inkubiert. Danach wurden die Blots 4x für jeweils 5min mit PBS-T gewaschen und darauffolgend im sekundären Antikörper, welcher an ein Epitop des primären Antikörpers band, in angegebener Konzentration für 1h bei RT unter Lichtabschluss inkubiert. Der sekundäre Antikörper war mit einem Fluorophor markiert, das bei 680nm (rot) bzw. 800nm (grün) dargestellt werden konnte. Nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper wurde die PVDF-Membran 2x 8min in PBS-T und 2x 8min in PBS gewaschen und die Blots mit dem Odyssey Scanner (LI-COR) eingescannt.

Primäre Antikörper gegen:

Aktin	(Verdünnung 1:1000, Kaninchen, polyklonal)
PKB/Akt 1 gesamt	(Verdünnung 1:1000, Maus, monoklonal)
PKB/Akt pSer473	(Verdünnung 1:1000, Kaninchen, monoklonal)
ATP-Synthase Untereinheit α	(Verdünnung 1:500, Maus, monoklonal)
ATP-Synthase Untereinheit β	(Verdünnung 1:1000, Maus, monoklonal)
Cytochrom bc1 subunit core 1	(Verdünnung 1:1000, Maus, monoklonal)
Pyruvatdehydrogenase	(Verdünnung 1:500, Maus, monoklonal)
Untereinheit E1 α	
Prohibitin 1	(Verdünnung 1:1000, Kaninchen, polyklonal)

Sekundäre Antikörper:

Goat anti-mouse IRDye 680	(Verdünnung 1:10000, Ziege, polyklonal)
Goat anti- rabbit 800CW	(Verdünnung 1:10000, Ziege, polyklonal)

3.5 Statistische Auswertung

Zur Bestimmung der Expression einzelner Proteine wurden die Western Blots mit dem Odyssey (LI-COR) eingescannt und nachfolgend Lumineszenzintensitäten der Banden mit dem Programm Image J, unter Anwendung der rolling ball Methode, analysiert (entwickelt an den National Institutes of Health) [54].

Diese Lumineszenzintensitäten unterschieden sich zum Teil stark von Experiment zu Experiment. Um bei der nachfolgenden statistischen Auswertung alle Experimente gleichermaßen zu berücksichtigen, wurde daher die Lumineszenzaktivität der Einzelbande eines Experiments jeweils auf den Mittelwert aller 6 Einzelbanden des gleichen Experiments bezogen und dieser Wert als arbitrary units (AU) angegeben (in jedem Experiment wurden immer 6 verschiedene Bedingungen verglichen).

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm Sigma Stat 3.1 (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland). Der Vergleich nicht transfizierter, pIRES und pIRES_PHB1 transfizierter Zellen erfolgte mit einer one way ANOVA mit anschließender Holm Sidak post hoc Analyse. Insulineffekte wurden nach Überprüfung der Normalverteilung mit einem T-Test für gepaarte Stichproben analysiert. Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert von $<0,05$ angesehen.

4. Ergebnisse

4.1 Überprüfung des Vektors pIRES_PHB1

Nach Restriktion des Vektors pIRES_PHB1 mit den Enzymen EcoR1 und BamH1 konnte ein ca. 800bp großes DNA Fragment gelelektrophoretisch dargestellt werden. Die Sequenzanalyse (Genterprise Genomics, Mainz) bestätigte die korrekte PHB1 Sequenz, welche in das Plasmid pIRES_2eGFP einkloniert wurde.

Abbildung 2: Restriktionsverdau von dem Plasmid pIRES_PHB1

Das Plasmid wurde wie in 3.2 beschrieben mit EcoR1 und BamH1 für 25min verdaut. Die Proben wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Als Marker wurde der DNA Page Ruler (Fermentas) verwendet. Dargestellt sind die unter UV-Licht sichtbaren Banden von PHB1 DNA (A), pIRES_PHB1 (B), pIRES_PHB1 verdaut mit EcoR1 (C), pIRES_PHB1 verdaut mit BamH1 (D), pIRES_PHB1 verdaut mit EcoR1 und BamH1 (E).

4.2 Überexpression von PHB1 in C2C12 Mausmyoblasten

Die Transfektion der C2C12 Mausmyoblasten mit pIRES_PHB1 führte nach 24h zu einem etwa dreifachen Anstieg der PHB1 Menge verglichen mit den nicht transfizierten bzw. pIRES transfizierten Zellen (Abb. 3A). Zu beachten ist, dass der Antikörper anti-PHB1 sowohl menschliches als auch Maus PHB1 erkannte,

sodass davon auszugehen ist, dass durch die Transfektion, verglichen mit dem Maus PHB1, mehr als doppelt so viel menschliches PHB1 exprimiert wurde. Als Kontrolle der Proteinexpression diente der Aktin Gehalt aus den Zelllysaten (Abb. 3B).

Abbildung 3: Überexpression von PHB1 in C2C12 Mausmyoblasten

C2C12 Mausmyoblasten wurden entweder nicht transfiziert oder mit pIRES bzw. mit pIRES_PHB1 transfiziert. Nach 19h wurde das Wachstumsmedium durch Hungermedium ersetzt und die Zellen nach weiteren 5h ohne (offene Balken) oder mit 10^{-7} mol Insulin (gestreifte Balken) 30min bei 37°C inkubiert. Danach wurden sie solubilisiert und Zelllysate mit 75µg Proteingehalt per SDS-PAGE aufgetrennt. Gezeigt sind repräsentative Western Blots sowie Mittelwerte $\pm$ SEM der PHB1- (A) bzw. Aktin-Expression (B) aus n=10 Experimenten. *p<0.05

verglichen mit den jeweils gleichermaßen insulinbehandelten untransfizierten oder nur mit pIRES transfizierten Zellen (one way ANOVA und anschließender Holm-Sidak post hoc Analyse).

Der etwa dreifache Anstieg der PHB1 Expression in den mit pIRES_PHB1 transfizierten Zellen gegenüber mit pIRES transfizierten Zellen 24h nach der Transfektion war jedoch nach 48h bzw. 72h nicht mehr nachweisbar (Abb. 4). Als Kontrolle der aufgetragenen Zelllysate diente die Aktin Expression. In mehreren Ansätzen wurde darüber hinaus versucht mittels Antibiotikaselektion (Kanamycin) eine permanente PHB1 Überexpression in C2C12 Mausmyoblasten zu erreichen, was allerdings nicht gelang.

Abbildung 4: Charakterisierung der transienten Überexpression von PHB1

C2C12 Mausmyoblasten wurden mit pIRES (°) bzw. mit pIRES_PHB1(*) transfiziert, nach 24h, 48h, 72h solubilisiert und Zelllysate mit einer Proteinmenge von 75µg durch SDS-PAGE aufgetrennt. Gezeigt ist die PHB1 Expression nach 24h, 48h, 72h in einem repräsentativen Western Blot. Zusätzlich ist die Expression von Aktin abgebildet.

4.3 Effekte der PHB1 Überexpression auf die Phosphorylierung von PKB am Serin 473

Zur Überprüfung möglicher Effekte der PHB1 Überexpression auf die Insulinsignaltransduktion wurde die Phosphorylierung der PKB an Ser473 analysiert, welche insulinabhängig die Enzymaktivität der PKB reguliert. Die Insulinstimulation der Zellen resultierte bei nicht transfizierten, mit pIRES bzw. pIRES_PHB1 transfizierten Zellen in deutlichen Anstiegen der PKB Ser473 Phosphorylierung. Es fanden sich keine Unterschiede bezüglich der PKB

Ser473 Phosphorylierung zwischen den Zellen mit PHB1 Überexpression und ohne Überexpression (5A). Der Gesamtgehalt von PKB in den Zelllysaten diente als Kontrolle und war wie gezeigt gleichbleibend (5B).

Abbildung 5: Auswirkung der PHB1 Überexpression auf die Phosphorylierung von PKB an Ser473

C2C12 Mausmyoblasten wurden entweder nicht transfiziert oder mit pIRES bzw. mit pIRES_PHB1 transfiziert. Nach 19h wurde das Wachstumsmedium entfernt, durch Hungermedium ersetzt und die Zellen nach weiteren 5h ohne (offene Balken) oder mit 10^{-7} mol Insulin (gestreifte Balken) 30min bei 37°C inkubiert. Danach wurden sie solubilisiert und Zelllysate mit 75µg Proteingehalt per SDS-PAGE aufgetrennt. Gezeigt sind repräsentative Western Blots sowie Mittelwerte $\pm$ SEM der Phosphorylierung von PKB an Ser 473 (A) bzw. der Akt Gesamtexpression (B) aus n=10 Experimenten. *p<0.05 verglichen mit den gleichermaßen behandelten, jedoch nicht mit Insulin stimulierten Zellen (gepaarter t-Test).

4.4 Effekte der PH1 Überexpression auf die Expression mitochondrialer Proteine

Ob eine PHB1 Überexpression die Expression anderer mitochondrialer Proteine beeinflusst, wurde durch Untersuchung der Proteinexpression von PDH E1 α , Cytochrom c 1, ATP Synthase α und ATP Synthase β überprüft (Abb. 6 A-D). Es fanden sich keine signifikanten Effekte der PHB1 Überexpression auf deren Proteinexpression. Es zeigte sich eine leichte Tendenz im Sinne einer Steigerung der ATP Synthase β Expression (Abb. 6 D), welche allerdings nicht signifikant war. Der Aktin-Blot diente als Kontrolle und zeigte, dass homogene Mengen von Zelllysaten aufgetragen wurden (Abb. 6 E).

Abbildung 6: Auswirkungen einer PHB1 Überexpression auf die Proteinexpression von PDH E1- α , Cytochrom c 1, ATP Synthase α und ATP Synthase β

C2C12 Mausmyoblasten wurden entweder nicht transfiziert oder mit pIRES bzw. mit pIRES_PHB1 transfiziert. Nach 19h wurde das Wachstumsmedium entfernt, durch Hungermedium ersetzt und die Zellen nach weiteren 5h ohne (offene Balken) oder mit 10^{-7} mol Insulin (gestreifte Balken) für 30min bei 37°C inkubiert. Danach wurden sie solubilisiert und Zelllysate mit 75 μ g Proteingehalt per SDS-PAGE aufgetrennt. Gezeigt sind repräsentative Western Blots sowie Mittelwerte $\pm$ SEM Expression von PDH E1 α (A), Cytochrom c1 (B), ATP Synthase α (C), ATP Synthase β (D) und Aktin (E) aus n=8 Experimenten.

5. Diskussion

Basierend auf Daten unserer Arbeitsgruppe, die auf eine verminderte Abundanz von PHB1 im Skelettmuskel von Probanden mit Insulinresistenz hinwiesen, sollte in der vorliegenden Arbeit überprüft werden, ob dem PHB1 eine kausale Rolle bei der Entstehung der Insulinresistenz zukommen könnte. Hierzu wurde humanes PHB1 über 24h in C2C12 Mausmyoblasten überexprimiert, was in einer Abundanz von 200% der PHB1 Menge (Maus PHB1 und zusätzlich humanes PHB1) resultierte.

Die erste zu überprüfende Hypothese war, dass die Abundanz von PHB1 die Insulinsignaltransduktion beeinflusst. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen gegen einen Einfluss der PHB1 Expression auf die initiale Insulinsignalkaskade, da eine PHB1 Überexpression die Phosphorylierung von Ser473 an der PKB nicht modulierte.

Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Ande et al., die im gleichen Zellmodell nach PHB1 Überexpression eine verminderte insulinabhängige PKB Phosphorylierung beschrieben haben [3]. Der Grund für diese Diskrepanz ist nicht klar. Es ist möglich, dass der Grad der Differenzierung oder die Dauer der Überexpression eine Rolle gespielt haben könnten. Allerdings fehlen in der Arbeit von Ande et al. Angaben zum Differenzierungsstatus und zur Dauer der Überexpression. Darüber hinaus ist anzumerken, dass die Anzahl der Versuche der vorliegenden Arbeit (n=10) deutlich höher war als in der o.g. Arbeit (n=3).

Die zweite zu überprüfende Hypothese war, dass eine PHB1 Überexpression die Expression von den an der oxidativen Phosphorylierung beteiligten mitochondrialen Proteinen Cytochrom c1 als Untereinheit des Komplex III der Atmungskette und/oder der ATP-Synthase Untereinheiten α bzw. β beeinflusst. In der vorliegenden Arbeit wurden keine Effekte einer PHB1 Überexpression auf die Proteinexpression dieser Proteine gefunden. Diese Ergebnisse sprechen somit gegen eine kausale Rolle des PHB1 bei der Beeinflussung der Abundanz

von den o.g. mitochondrialen Proteinen und gegen die Hypothese, dass die verminderte Expression des Komplex III der Atmungskette und der ATP Synthase bei Patienten mit Insulinresistenz [26, 27] durch eine verminderte Abundanz von PHB1 bedingt sein könnte. Einschränkend ist allerdings zu bemerken, dass die Versuche mit einer transienten Überexpression in C2C12 Mausmyoblasten nur beschränkt auf den humanen Skelettmuskel übertragbar sind. Zudem könnte eine alleinige Überexpression von PHB1 nicht ausreichend sein, da PHB1 möglicherweise nur durch Formation eines Komplexes mit PHB2 über eine Stabilisierung der Atmungskettenkomplexe die Funktion der Atmungskette beeinflussen könnte. So wurde beschrieben, dass PHB1 und PHB2 über diesen Komplex zur Stabilisierung der Atmungskettenkomplexe I und IV beitragen [14, 56].

Die dritte Hypothese war, dass eine PHB1 Überexpression die Proteinexpression und Phosphorylierung der regulierenden Untereinheit E1 α der PDH verändert. Eine 200%ige Abundanz von PHB1 während einer transienten Überexpression, hatte unter den gewählten Bedingungen keinen Einfluss auf die Expression der PDH. Aufgrund der vorliegenden Daten ergibt sich somit kein Hinweis, dass die PHB1 Expression die Abundanz der PDH beeinflussen könnte. Im Weiteren wurde versucht mit einem phosphospezifischen Antikörper gegen die Untereinheit E1 α , mögliche Effekte einer PHB1 Überexpression auf die Aktivität der PDH zu untersuchen, die in Tiermodellen des Typ 2 Diabetes reduziert ist [9, 65]. Trotz intensiver Versuche konnte mit diesem Antikörper kein Signal gemessen werden. Daher kann zu dieser Frage keine Stellung genommen werden.

Zusammenfassend ergaben die Ergebnisse dieser Arbeit keine Hinweise darauf, dass PHB1 die Phosphorylierung der PKB an Ser473 und/oder die Expression ausgewählter mitochondrialer Proteine (Cytochrom c1 und/oder ATP Synthase Untereinheiten α bzw. β) beeinflusst. Daher konnte nicht belegt werden, dass, die von unserer Arbeitsgruppe in Skelettmuskel von insulinresistenten Probanden gefundene reduzierte PHB1 Menge, kausal an der Entstehung der Insulinresistenz beteiligt ist.

Allerdings hat die vorliegende Arbeit auch Limitationen. Sie liegen u.a. darin, dass es sich um ein Zellmodell handelte, sodass die komplexen Mechanismen des menschlichen Skelettmuskels nicht vollständig widergespiegelt wurden. Darüber hinaus könnte die Zeitspanne der Überexpression des PHB1 mit etwa 24h zu kurz gewesen sein, um die zu untersuchenden Effekte auszulösen. Außerdem war das Spektrum der untersuchten Proteine limitiert, sodass die vorliegenden Daten nicht ausschließen, dass PHB1 an anderer Stelle und über andere Mechanismen Auswirkungen auf die Insulinsignaltransduktion und/oder die mitochondriale Funktion haben könnte.

6. Zusammenfassung

Ausgehend von dem Befund unserer Arbeitsgruppe, dass Prohibitin 1 (PHB1) im Skelettmuskel von Patienten mit Insulinresistenz weniger abundant ist, sollte die Hypothese überprüft werden, ob die Expression von PHB1 eine kausale Rolle bei der Entstehung der Insulinresistenz haben könnte. Unterstützend für diese Hypothese war, dass eine andere Arbeitsgruppe Effekte einer PHB1 Überexpression auf Elemente der Insulinsignaltransduktion beschrieben hatte und dass PHB1 möglicherweise über eine Beeinflussung der mitochondrialen Funktion die mitochondriale Substratutilisation verändern könnte.

Um diese Hypothesen zu bestätigen oder zu widerlegen, wurde in der vorliegenden Arbeit daher humanes PHB1 in C2C12 Mausmyoblasten transient überexprimiert. Nachfolgend wurden die Effekte dieser Überexpression auf die initiale Insulinsignaltransduktion (stellvertretend die insulinabhängige Phosphorylierung von PKB) sowie die Proteinexpression verschiedener mitochondrialer Proteine untersucht, die eine Rolle bei der mitochondrialen Substratutilisation spielen.

Es gelang 24h nach der Transfektion eine Überexpression von PHB1, sodass die Gesamt PHB1 Menge auf etwa das Doppelte anstieg. Insulinstimulation der Zellen führte zu einem etwa fünffachen Anstieg der PKB Phosphorylierung und dieser Effekt war bei Zellen mit und ohne PHB1 Überexpression identisch. Da die PKB distal von Insulinrezeptorkinase und PI3 Kinase liegt, weisen diese Daten darauf hin, dass zumindest in diesem Teil der initialen Insulinsignalkaskade keine Beeinflussung der Insulinsignaltransduktion erfolgt. Die Überexpression von PHB1 hatte auch keinen Einfluss auf die Expression der mitochondrialen Proteine Cytochrom c1, den Untereinheiten α und β der ATP-Synthase sowie der PDH Untereinheit E1 α .

Somit konnte mit der vorliegenden Methodik die Hypothese, dass PHB1 die Insulinsignaltransduktion und/oder die Expression mitochondrialer Proteine, die den mitochondrialen Substratfluss beeinflussen, moduliert, nicht bestätigt werden. Limitationen bei der Übertragung der im Modell der transient transfizierten Mausmyoblasten erhobenen Ergebnisse auf den Menschen bestehen u.a. darin, dass die Dauer der Überexpression des PHB1 auf ca. 24h begrenzt war. Trotz großer Anstrengung war eine permanente Überexpression des PHB1 in C2C12 Mausmyoblasten in dieser Arbeit nicht gelungen. Eine weitere Limitation der Arbeit ist, dass nur ein kleines Spektrum der am mitochondrialen Substratfluss beteiligten Proteine untersucht wurde. Eine Rolle des PHB1 bei der Entstehung der Insulinresistenz ist somit auch nicht sicher widerlegt.

7. Literaturverzeichnis

- [1] Alessi, D.R., James, S.R., Downes, C.P., Holmes, A.B., Gaffney, P.R., Reese, C.B., Cohen, P. (1997). Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Current Biology* **7**, 261-269.
- [2] Ande, S.R., Gu, Y., Nyomba, B.L., Mishra, S. (2009). Insulin induced phosphorylation of prohibitin at tyrosine 114 recruits Shp1. *Biochimica et Biophysica Acta* **1793**, 1372-1378.
- [3] Ande, S.R. Mishra, S. (2009). Prohibitin interacts with phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP3) and modulates insulin signaling. *Biochemical and biophysical research communications* **390**, 1023-1028.
- [4] Arner, P., Pollare, T., Lithell, H., Livingston, J.N. (1987). Defective insulin receptor tyrosine kinase in human skeletal muscle in obesity and type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* **30**, 437-440.
- [5] Artal-Sanz, M. Tavernarakis, N. (2009). Prohibitin and mitochondrial biology. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **20**, 394-401.
- [6] Artal-Sanz, M. Tavernarakis, N. (2010). Opposing function of mitochondrial prohibitin in aging. *Aging* **2**, 1004-1011.
- [7] Artal-Sanz, M., Tsang, W.Y., Willems, E.M., Grivell, L.A., Lemire, B.D., van der Spek, H., Nijtmans, L.G. (2003). The mitochondrial prohibitin complex is essential for embryonic viability and germline function in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 32091-32099.
- [8] Back, J.W., Sanz, M.A., De Jong, L., De Koning, L.J., Nijtmans, L.G., De Koster, C.G., Grivell, L.A., Van Der Spek, H., Muijsers, A.O. (2002). A structure for the yeast prohibitin complex: Structure prediction and

evidence from chemical crosslinking and mass spectrometry. *Protein Science* **11**, 2471-2478.

- [9] Bajotto, G., Murakami, T., Nagasaki, M., Tamura, T., Tamura, N., Harris, R.A., Shimomura, Y., Sato, Y. (2004). Downregulation of the skeletal muscle pyruvate dehydrogenase complex in the Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rat both before and after the onset of diabetes mellitus. *Life sciences* **75**, 2117-2130.
- [10] Bajpeyi, S., Pasarica, M., Moro, C., Conley, K., Jubrias, S., Sereda, O., Burk, D.H., Zhang, Z., Gupta, A., Kjems, L., Smith, S.R. (2011). Skeletal muscle mitochondrial capacity and insulin resistance in type 2 diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **96**, 1160-1168.
- [11] Baumann, C.A., Ribon, V., Kanzaki, M., Thurmond, D.C., Mora, S., Shigematsu, S., Bickel, P.E., Pessin, J.E., Saltiel, A.R. (2000). CAP defines a second signalling pathway required for insulin-stimulated glucose transport. *Nature* **407**, 202-207.
- [12] Bjornholm, M., Kawano, Y., Lehtihet, M., Zierath, J.R. (1997). Insulin receptor substrate-1 phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase activity in skeletal muscle from NIDDM subjects after in vivo insulin stimulation. *Diabetes* **46**, 524-527.
- [13] Bjornholm, M., Zierath, J.R. (2005). Insulin signal transduction in human skeletal muscle: identifying the defects in Type II diabetes. *Biochemical Society Transactions* **33**, 354-357.
- [14] Bourges, I., Ramus, C., Mousson de Camaret, B., Beugnot, R., Remacle, C., Cardol, P., Hofhaus, G., Issartel, J.P. (2004). Structural organization of mitochondrial human complex I: role of the ND4 and ND5 mitochondria-encoded subunits and interaction with prohibitin. *Biochemical Journal* **383**, 491-499.
- [15] Ceresa, B.P., Pessin, J.E. (1998). Insulin regulation of the Ras activation/inactivation cycle. *Molecular and Cellular Biochemistry* **182**, 23-29.

- [16] Chiang, S.H., Baumann, C.A., Kanzaki, M., Thurmond, D.C., Watson, R.T., Neudauer, C.L., Macara, I.G., Pessin, J.E., Saltiel, A.R. (2001). Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10. *Nature* **410**, 944-948.
- [17] Cross, D.A., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M., Hemmings, B.A. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* **378**, 785-789.
- [18] Dresner, A., Laurent, D., Marcucci, M., Griffin, M.E., Dufour, S., Cline, G.W., Slezak, L.A., Andersen, D.K., Hundal, R.S., Rothman, D.L., Petersen, K.F., Shulman, G.I. (1999). Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *The Journal of Clinical Investigation* **103**, 253-259.
- [19] Evans, J.L., Goldfine, I.D., Maddux, B.A., Grodsky, G.M. (2003). Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes* **52**, 1-8.
- [20] Freidenberg, G.R., Henry, R.R., Klein, H.H., Reichart, D.R., Olefsky, J.M. (1987). Decreased kinase activity of insulin receptors from adipocytes of non-insulin-dependent diabetic subjects. *The Journal of Clinical Investigation* **79**, 240-250.
- [21] Fusaro, G., Wang, S., Chellappan, S. (2002). Differential regulation of Rb family proteins and prohibitin during camptothecin-induced apoptosis. *Oncogene* **21**, 4539-4548.
- [22] Garvey, W.T., Maianu, L., Zhu, J.H., Brechtel-Hook, G., Wallace, P., Baron, A.D. (1998). Evidence for defects in the trafficking and translocation of GLUT4 glucose transporters in skeletal muscle as a cause of human insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation* **101**, 2377-2386.
- [23] Giebelstein, J., Poschmann, G., Hojlund, K., Schechinger, W., Dietrich, J.W., Levin, K., Beck-Nielsen, H., Podwojski, K., Stuhler, K., Meyer, H.E., Klein, H.H. (2012). The proteomic signature of insulin-resistant

human skeletal muscle reveals increased glycolytic and decreased mitochondrial enzymes. *Diabetologia* **55**, 1114-1127.

- [24] Harris, R.A., Bowker-Kinley, M.M., Huang, B., Wu, P. (2002). Regulation of the activity of the pyruvate dehydrogenase complex. *Advances in Enzyme Regulation* **42**, 249-259.
- [25] Hatefi, Y. (1985). The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annual Review of Biochemistry* **54**, 1015-1069.
- [26] Hojlund, K., Wrzesinski, K., Larsen, P.M., Fey, S.J., Roepstorff, P., Handberg, A., Dela, F., Vinten, J., McCormack, J.G., Reynet, C., Beck-Nielsen, H. (2003). Proteome analysis reveals phosphorylation of ATP synthase beta -subunit in human skeletal muscle and proteins with potential roles in type 2 diabetes. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 10436-10442.
- [27] Hojlund, K., Yi, Z., Lefort, N., Langlais, P., Bowen, B., Levin, K., Beck-Nielsen, H., Mandarino, L.J. (2010). Human ATP synthase beta is phosphorylated at multiple sites and shows abnormal phosphorylation at specific sites in insulin-resistant muscle. *Diabetologia* **53**, 541-551.
- [28] Holman, N., Forouhi, N.G., Goyder, E., Wild, S.H. (2011). The Association of Public Health Observatories (APHO) Diabetes Prevalence Model: estimates of total diabetes prevalence for England, 2010-2030. *Diabetic Medicine* **28**, 575-582.
- [29] Holness, M.J. Sugden, M.C. (2003). Regulation of pyruvate dehydrogenase complex activity by reversible phosphorylation. *Biochemical Society Transactions* **31**, 1143-1151.
- [30] Houstis, N., Rosen, E.D., Lander, E.S. (2006). Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* **440**, 944-948.
- [31] Huang, B., Wu, P., Bowker-Kinley, M.M., Harris, R.A. (2002). Regulation of pyruvate dehydrogenase kinase expression by peroxisome

proliferator-activated receptor- α ligands, glucocorticoids, and insulin. *Diabetes* **51**, 276-283.

- [32] Jonsson, B. (2002). Revealing the cost of Type II diabetes in Europe. *Diabetologia* **45**, S5-12.
- [33] Kelley, D.E., He, J., Menshikova, E.V., Ritov, V.B. (2002). Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes* **51**, 2944-2950.
- [34] Kim, Y.B., Nikoulina, S.E., Ciaraldi, T.P., Henry, R.R., Kahn, B.B. (1999). Normal insulin-dependent activation of Akt/protein kinase B, with diminished activation of phosphoinositide 3-kinase, in muscle in type 2 diabetes. *The Journal of Clinical Investigation* **104**, 733-741.
- [35] Klein, H.H., Giebelstein, J., Dietrich, J.W.D., Schechinger, W., Poschmann, K., Podwojski, K., Stühler, K., Meyer, H.E., Levin, K., Beck-Nielsen, H., Hojlund, K. (2009). Proteome analysis in muscle biopsies of lean, obese and obese type 2 diabetic patients. EASD-Kongress, Wien 2009, Oral Presentation: in vivo action of insulin- mechanisms .
- [36] Klein, H.H., Vestergaard, H., Kotzke, G., Pedersen, O. (1995). Elevation of serum insulin concentration during euglycemic hyperinsulinemic clamp studies leads to similar activation of insulin receptor kinase in skeletal muscle of subjects with and without NIDDM. *Diabetes* **44**, 1310-1317.
- [37] Krook, A., Bjornholm, M., Galuska, D., Jiang, X.J., Fahlman, R., Myers, M.G., Jr., Wallberg-Henriksson, H., Zierath, J.R. (2000). Characterization of signal transduction and glucose transport in skeletal muscle from type 2 diabetic patients. *Diabetes* **49**, 284-292.
- [38] Krook, A., Roth, R.A., Jiang, X.J., Zierath, J.R., Wallberg-Henriksson, H. (1998). Insulin-stimulated Akt kinase activity is reduced in skeletal muscle from NIDDM subjects. *Diabetes* **47**, 1281-1286.
- [39] Lefort, N., Glancy, B., Bowen, B., Willis, W.T., Bailowitz, Z., De Filippis, E.A., Brophy, C., Meyer, C., Hojlund, K., Yi, Z., Mandarino, L.J. (2010).

Increased reactive oxygen species production and lower abundance of complex I subunits and carnitine palmitoyltransferase 1B protein despite normal mitochondrial respiration in insulin-resistant human skeletal muscle. *Diabetes* **59**, 2444-2452.

- [40] Lillioja, S., Mott, D.M., Spraul, M., Ferraro, R., Foley, J.E., Ravussin, E., Knowler, W.C., Bennett, P.H., Bogardus, C. (1993). Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin-dependent diabetes mellitus. Prospective studies of Pima Indians. *The New England Journal of Medicine* **329**, 1988-1992.
- [41] Maegawa, H., Shigeta, Y., Egawa, K., Kobayashi, M. (1991). Impaired autophosphorylation of insulin receptors from abdominal skeletal muscles in nonobese subjects with NIDDM. *Diabetes* **40**, 815-819.
- [42] Martin, B.C., Warram, J.H., Krolewski, A.S., Bergman, R.N., Soeldner, J.S., Kahn, C.R. (1992). Role of glucose and insulin resistance in development of type 2 diabetes mellitus: results of a 25-year follow-up study. *Lancet* **340**, 925-929.
- [43] Merkwirth, C., Dargazanli, S., Tatsuta, T., Geimer, S., Lower, B., Wunderlich, F.T., von Kleist-Retzow, J.C., Waisman, A., Westermann, B., Langer, T. (2008). Prohibitins control cell proliferation and apoptosis by regulating OPA1-dependent cristae morphogenesis in mitochondria. *Genes and Development* **22**, 476-488.
- [44] Merkwirth, C., Langer, T. (2009). Prohibitin function within mitochondria: essential roles for cell proliferation and cristae morphogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta* **1793**, 27-32.
- [45] Meyer, M.M., Levin, K., Grimmsmann, T., Beck-Nielsen, H., Klein, H.H. (2002). Insulin signalling in skeletal muscle of subjects with or without Type II-diabetes and first degree relatives of patients with the disease. *Diabetologia* **45**, 813-822.
- [46] Mishra, S., Ande, S.R., Nyomba, B.L. (2010). The role of prohibitin in cell signaling. *FEBS Journal*

- [47] Mishra, S., Murphy, L.C., Murphy, L.J. (2006). The Prohibitins: emerging roles in diverse functions. *Journal of Clinical and Molecular Medicine* **10**, 353-363.
- [48] Mitchell, P. (1966). Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* **41**, 445-502.
- [49] Mogensen, M., Sahlin, K., Fernstrom, M., Glintborg, D., Vind, B.F., Beck-Nielsen, H., Hojlund, K. (2007). Mitochondrial respiration is decreased in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes. *Diabetes* **56**, 1592-1599.
- [50] Morino, K., Petersen, K.F., Shulman, G.I. (2006). Molecular mechanisms of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction. *Diabetes* **55 Suppl 2**, S9-S15.
- [51] Myers, M.G., Jr., Backer, J.M., Sun, X.J., Shoelson, S., Hu, P., Schlessinger, J., Yoakim, M., Schaffhausen, B., White, M.F. (1992). IRS-1 activates phosphatidylinositol 3'-kinase by associating with src homology 2 domains of p85. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 10350-10354.
- [52] Nadimpalli, R., Yalpani, N., Johal, G.S., Simmons, C.R. (2000). Prohibitins, stomatins, and plant disease response genes compose a protein superfamily that controls cell proliferation, ion channel regulation, and death. *The Journal of Biological Chemistry* **275**, 29579-29586.
- [53] 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**, 15982-15985.
- [54] National Institutes of Health (2010). (Zugriff vom 12.10.2010). <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, Version 1.44i.
- [55] Nijtmans, L.G., Artal, S.M., Grivell, L.A., Coates, P.J. (2002). The mitochondrial PHB complex: roles in mitochondrial respiratory complex

assembly, ageing and degenerative disease. Cellular and Molecular Life Sciences **59**, 143-155.

- [56] Nijtmans, L.G., de Jong, L., Artal Sanz, M., Coates, P.J., Berden, J.A., Back, J.W., Muijsers, A.O., van der Spek, H.,Grivell, L.A. (2000). Prohibitins act as a membrane-bound chaperone for the stabilization of mitochondrial proteins. The EMBO Journal **19**, 2444-2451.
- [57] Nolan, J.J., Freidenberg, G., Henry, R., Reichart, D.,Olefsky, J.M. (1994). Role of human skeletal muscle insulin receptor kinase in the in vivo insulin resistance of noninsulin-dependent diabetes mellitus and obesity. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism **78**, 471-477.
- [58] Osman, C., Merkwirth, C.,Langer, T. (2009). Prohibitins and the functional compartmentalization of mitochondrial membranes. Journal of Cell Science **122**, 3823-3830.
- [59] Petersen, K.F. Shulman, G.I. (2006). Etiology of insulin resistance. The American journal of medicine **119**, S10-16.
- [60] Rajalingam, K. Rudel, T. (2005). Ras-Raf signaling needs prohibitin. Cell Cycle **4**, 1503-1505.
- [61] Rajalingam, K., Wunder, C., Brinkmann, V., Churin, Y., Hekman, M., Sievers, C., Rapp, U.R.,Rudel, T. (2005). Prohibitin is required for Ras-induced Raf-MEK-ERK activation and epithelial cell migration. Nature Cell Biology **7**, 837-843.
- [62] Ritov, V.B., Menshikova, E.V., He, J., Ferrell, R.E., Goodpaster, B.H.,Kelley, D.E. (2005). Deficiency of subsarcolemmal mitochondria in obesity and type 2 diabetes. Diabetes **54**, 8-14.
- [63] Saltiel, A.R. Kahn, C.R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. Nature **414**, 799-806.
- [64] Sasaoka, T., Rose, D.W., Jhun, B.H., Saltiel, A.R., Draznin, B.,Olefsky, J.M. (1994). Evidence for a functional role of Shc proteins in mitogenic

signaling induced by insulin, insulin-like growth factor-1, and epidermal growth factor. *The Journal of Biological Chemistry* **269**, 13689-13694.

- [65] Schummer, C.M., Werner, U., Tennagels, N., Schmoll, D., Haschke, G., Juretschke, H.P., Patel, M.S., Gerl, M., Kramer, W., Herling, A.W. (2008). Dysregulated pyruvate dehydrogenase complex in Zucker diabetic fatty rats. *American journal of physiology - Endocrinology and Metabolism* **294**, E88-96.
- [66] Shulman, G.I. (2000). Cellular mechanisms of insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation* **106**, 171-176.
- [67] Steglich, G., Neupert, W., Langer, T. (1999). Prohibitins regulate membrane protein degradation by the m-AAA protease in mitochondria. *Molecular and Cellular Biology* **19**, 3435-3442.
- [68] Tatsuta, T., Model, K., Langer, T. (2005). Formation of membrane-bound ring complexes by prohibitins in mitochondria. *Molecular Biology of the Cell* **16**, 248-259.
- [69] Tavernarakis, N., Driscoll, M., Kyriakides, N.C. (1999). The SPFH domain: implicated in regulating targeted protein turnover in stomatins and other membrane-associated proteins. *Trends in Biochemical Sciences* **24**, 425-427.
- [70] Wang, S., Fusaro, G., Padmanabhan, J., Chellappan, S.P. (2002). Prohibitin co-localizes with Rb in the nucleus and recruits N-CoR and HDAC1 for transcriptional repression. *Oncogene* **21**, 8388-8396.
- [71] Wang, S., Nath, N., Fusaro, G., Chellappan, S. (1999). Rb and prohibitin target distinct regions of E2F1 for repression and respond to different upstream signals. *Molecular and Cellular Biology* **19**, 7447-7460.
- [72] Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., King, H. (2004). Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* **27**, 1047-1053.

- [73] Yaffe, D. Saxel, O. (1977). Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature* **270**, 725-727.
- [74] Yu, C., Chen, Y., Cline, G.W., Zhang, D., Zong, H., Wang, Y., Bergeron, R., Kim, J.K., Cushman, S.W., Cooney, G.J., Atcheson, B., White, M.F., Kraegen, E.W., Shulman, G.I. (2002). Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 50230-50236.
- [75] Zhang, Y., Wat, N., Stratton, I.M., Warren-Perry, M.G., Orho, M., Groop, L., Turner, R.C. (1996). UKPDS 19: heterogeneity in NIDDM: separate contributions of IRS-1 and beta 3-adrenergic-receptor mutations to insulin resistance and obesity respectively with no evidence for glycogen synthase gene mutations. UK Prospective Diabetes Study. *Diabetologia* **39**, 1505-1511.
- [76] Zierath, J.R., Krook, A., Wallberg-Henriksson, H. (2000). Insulin action and insulin resistance in human skeletal muscle. *Diabetologia* **43**, 821-835.

Danksagung

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. H.H. Klein für die freundliche Überlassung des interessanten Themas, die Bereitstellung der Infrastruktur im Labor und die fachliche Unterstützung danken. In vielen Sitzungen haben wir zusammen experimentelle Techniken und Ergebnisse ausführlich diskutiert. Dafür mein ganz persönlicher Dank.

Darüber hinaus möchte ich mich für die Unterstützung bei Dipl. biol. Jan Giebelstein bedanken, mit dem ich viele Stunden im Labor geforscht habe und der immer ein offenes Ohr hatte, um über komplizierte Sachverhalte zu diskutieren.

Desweiteren möchte ich Frau Christine Fischer-Lahdo für die Einführung in die experimentellen Fertigkeiten und professionelle Hilfe bei technischen Problemen danken.

Zu guter Letzt möchte ich von ganzem Herzen meiner lieben Familie für die Unterstützung und die Motivation danken.

Lebenslauf

Name: Jaghutriz, Benjamin Assad
Geburtsdatum/-ort: 27.12.1986 in Herne, Deutschland
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: ledig

Persönlicher und beruflicher Werdegang:

08/1993 – 07/1997	Vels-Heide Grundschule in Bochum
08/1997 – 07/2005	Gymnasium am Ostring in Bochum; Überspringen der Klassen 10.2 und 11.1; Abitur mit der Note 1,0
10/2005	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Ruhr-Universität Bochum
09/2007	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung mit der Note gut (2,5)
09/2007 – 06/2008	Stipendium der deutsch-französischen Hochschule und Auslandsjahr an der Université Louis Pasteur in Strasbourg (Frankreich)
11/2011	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung mit der Note sehr gut (1,5); unter Berücksichtigung des ersten und zweiten Abschnittes der ärztlichen Prüfung wurde die ärztliche Prüfung mit der Gesamtnote gut (1,83) abgeschlossen
11/2011	Erlangung der Approbation
Seit 12/2011	Assistenzarzt der Medizinischen Klinik I des Berufsgenossenschaftlichen Universitätsklinikums Bergmannsheil Bochum unter der Leitung von Prof. Dr. H. H. Klein