

Untersuchungen zum Recycling der Glucosetransporter GLUT4, GLUT6 und GLUT8 in Adipocyten

Inaugural-D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

Vorgelegt von

Ivonne Lisinski

aus Langendorf

2003

Berichterstatter:

**Prof. Dr. H.W. Klein
Prof. Dr. R. Sterner**

Tag der mündlichen Prüfung:

03.07.2003

Meiner Familie, die ich sehr liebe

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2000 bis Juli 2003 am Institut für Biochemie an der Universität zu Köln unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. W. Klein angefertigt.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. H. W. Klein für die fachliche Betreuung, die ständige Hilfsbereitschaft, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die bereitgestellten finanziellen Mittel.

Bei Herrn Dr. Hadi Al-Hasani möchte ich mich ausdrücklich bedanken für die Überlassung des Themas, die hervorragende Zusammenarbeit, die vielen Stunden der wissenschaftlichen Diskussion, die freundliche und fachliche Unterstützung bei den Stipendienbewerbungen und für das freundschaftliche Verhältnis.

Herrn Prof. Dr. Samuel W. Cushman danke ich besonders herzlich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am *National Institute of Health*, für die fruchtbaren Stunden der wissenschaftlichen Diskussion und besonders für die unvergesslich schöne Zeit in den USA.

Bei Frau Dr. Kristin Baer möchte ich mich ausdrücklich für die hervorragende Zusammenarbeit, die ständige Hilfsbereitschaft, das Korrekturlesen meiner Arbeit und die wissenschaftliche Diskussion bedanken.

Herrn Magnus Manske möchte ich ganz herzlich für die fachliche Hilfe bei Software-Fragen danken.

Außerdem danke ich meinen Freunden und Kollegen für das freundschaftliche Verhältnis und das angenehme Arbeitsklima.

Abstract

1. Identification and characterisation of a Novel GLUT4-binding Protein (p49) :

Type-2 Diabetes mellitus is characterized by an inadequate glucose uptake and utilization in fat and muscle. The main contribution of insulin-dependent glucose uptake in insulin-sensitive cells is provided by GLUT4. Insulin leads to a rapid and reversible translocation of GLUT4 from an intracellular pool to the plasma membrane. To identify new regulatory components involved in the recycling of GLUT4, we have used the yeast-two-hybrid system to isolate GLUT4-binding proteins from a rat fat cell cDNA library. We have isolated and characterized a new coiled-coil-domain-containing 49 kDa protein (p49) that specifically interacts with GLUT4. Confocal immunofluorescence microscopy of myc-p49 transfected rat adipocytes showed colocalisation of p49 with GLUT4, and also with the ER-resident calnexin. Overexpression of p49 reduces the cell surface expression of GLUT4 but not of GLUT8. Similarly, cell surface expression of a 49-binding-deficient GLUT4 mutant (E11Q, D12N, ED/QN) is also reduced. Kinetic analysis of the HA-GLUT4 protein synthesis indicates a possible role of p49 in intracellular synthesis and/or processing of GLUT4. We postulate that p49 is involved in GLUT4 biosynthesis/sorting.

2. Recycling of GLUT6 and GLUT8 in rat adipose cells:

The subcellular recycling of the two mammalian glucose transporters, GLUT6 and GLUT8, was analysed by expression of haemagglutinin (HA)-epitope-tagged GLUTs in transiently transfected primary rat adipose cells. Similar to HA-GLUT4, both transporters, HA-GLUT6 and HA-GLUT8, were retained in intracellular compartments in non-stimulated cells. In contrast, mutation of the N-terminal dileucine motifs in both constructs led to constitutive expression of the proteins on the plasma membrane. Likewise, when endocytosis was blocked by co-expression of a dominant-negative mutant of the dynamin GTPase, wild-type HA-GLUT6 and HA-GLUT8 accumulated on the cell surface. However, in contrast with HA-GLUT4, no translocation of HA-GLUT6 and HA-GLUT8 to the plasma membrane was observed when the cells were stimulated with insulin, or other potential GLUT4 stimuli. Thus GLUT6 and GLUT8 appear to recycle in a dynamin-dependent manner between internal membranes and the plasma membrane in rat adipose cells, but are unresponsive to stimuli that induce translocation of GLUT4.

Inhaltsverzeichnis

KURZZUSAMMENFASSUNG	1
1. EINLEITUNG.....	2
1.1. Molekularer Mechanismus der GLUT4-Translokation als Modell für die GLUT6- und GLUT8-Translokation	2
1.1.1. Signalwege der insulinstimulierten GLUT4-Translokation.....	3
1.2. Die Transferrin-Rezeptor-(TfR)- und Mannose-6-Phosphat-Rezeptor-(MPR)-Translokation	5
1.3. GLUT4 – <i>null-(knockout)</i> Maus und die Glucosetransporter 6 und 8.....	6
1.4. Glucosetransporter der GLUT-Familie.....	7
1.4.1. Spezielle Merkmale der Glucosetransporter GLUT6 und GLUT8.....	9
1.4.2. Der radioaktive Zelloberflächen-Antikörper-Bindungsnachweis.....	10
1.4.3. Das (LL)-Motiv.....	11
1.4.4. Die Dynamamin-abhängige Endocytose	12
1.5. Mechanismus der GLUT4-Endocytose.....	13
1.5.1. Beteiligung spezifischer Sortieradapterproteine an der GLUT4-Endocytose	13
1.5.2. Mechanismus der GLUT4-Vesikelfusionierung mit der Plasmamembran.....	14
1.6. Das GLUT4-Speicherkompartiment.....	15
1.6.1. GLUT4-Translokation zwischen dem trans-Golgi-Netzwerk (TGN) und dem endosomalen/lysosomalen Kompartiment	16
1.6.2. GLUT4-Translokationssignale im N- und C-Terminus.....	17
1.7. Das Hefe-Two-Hybrid-System.....	18
1.8. Fragestellung meiner Doktorarbeit.....	20
2. ERGEBNISSE.....	21
2.1. Identifizierung und Charakterisierung eines neuartigen GLUT4-Bindeproteins. 21	
2.1.1. Identifizierung und Charakterisierung des neuartigen p49-Proteins im Hefe-Two-Hybrid-System	21
2.1.2. Das p49-Protein bindet an GLUT4 <i>in vitro</i>	24
2.1.3. GST-GLUT4-NT bindet p49 <i>in vitro</i>	25
2.1.4. p49-Expression in Hela-Zellen	27
2.1.5. p49-Lokalisation in primären Ratten-Adipocyten	30
2.1.6. p49 ist mit GLUT4 in primären Ratten-Adipocyten kolokalisiert.....	31
2.1.7. p49 ist in GLUT4- <i>null</i> CHO-Zellen mit Membranen assoziiert.....	33
2.1.8. Die Überexpression von p49 in primären Ratten-Adipocyten reduziert die Zelloberflächenexpression von GLUT4, jedoch nicht von GLUT8	34
2.1.9. p49 bindet ein 7-Aminosäuremotiv (QIGSEDG) der N-terminalen GLUT4-Sequenz	37
2.1.10. Konstruktion einer HA-GLUT4-(ED/QN)-Bindungsmotivmutante und Untersuchung der p49-Proteinbindung im Hefe-Two-Hybrid-System.....	38

2.1.11. Untersuchung der HA-GLUT4-(ED/QN)-Translokation in Adipocyten.....	40
2.1.12. Beteiligung von p49 an der Synthese oder der Sortierung von GLUT4.....	41
2.1.13 Einfluss von p49 auf die GLUT4-Synthese/Degradierung.....	42
2.1.14. p49 weist eine Kolokalisation mit dem endoplasmatischen Retikulum (ER) in primären Ratten-Adipocyten auf.....	45
2.1.15. Zusammenfassung der Ergebnisse (p49)	46
2.2 GLUT6 und GLUT8. Charakterisierung zweier neuartiger Glucosetransporter in Ratten-Adipocyten.	47
2.2.1. GLUT4- <i>null</i> -(<i>knockout</i>) Mäuse und neuartige Glucosetransporter	47
2.2.2. Konstruktion epitopmarkierter GLUTs.....	48
2.2.3. Zelloberflächenexpression von Wildtyp-(HA)-GLUT6 und Wildtyp-(HA)-GLUT8 in primären Adipocyten	50
2.2.4. Zelloberflächenexpression der (HA)-GLUT6/8-(LL/AA)-Mutanten in primären Adipocyten.....	51
2.2.5. Koexpression der HA-GLUTs mit der dominant-negativen Dynamin-(K44A)-Mutante (GTPase).....	53
2.2.6. Subzelluläre Verteilung von HA-GLUT8 in COS-7 Zellen	56
2.2.7. Stimulierung der HA-GLUT-Translokation in Ratten-Adipocyten.....	58
2.2.8. Zusammenfassung der Ergebnisse (GLUT6/8)	62
3. DISKUSSION	63
3.1. Charakterisierung des GLUT4-bindenden Proteins p49	63
3.1.1. Identifizierung des p49-Proteins im Hefe-Two-Hybrid-System.....	63
3.1.2. Interaktion von p49 und GLUT4 <i>in vitro</i>	65
3.1.4. p49 hat eine cytosolische Lokalisation in Hela-Zellen	66
3.1.5. p49 ist im perinukleären Bereich von primären Adipocyten lokalisiert.....	66
3.1.6. p49 assoziiert partiell mit Membranen.	67
3.1.7. In Adipocyten kolokalisiert p49 mit GLUT4.....	68
3.1.8. p49-N reduziert die GLUT4-Zelloberflächenexpression in primären Adipocyten.....	68
3.1.9. Mutation des p49-Bindemotivs führt zur Reduktion der HA-GLUT4-Expression	70
3.1.10. Einfluss von p49 auf die GLUT4-Synthese/Degradierung.....	71
3.1.11. Zusammenfassung der p49-Ergebnisse/Diskussion.....	73
3.2. Charakterisierung der neuartigen Glucosetransporter GLUT8 und GLUT6.....	74
3.2.1. Die GLUT4- <i>null</i> -(<i>knockout</i>) Maus	74
3.2.2. Expression epitopmarkierter GLUT8 und GLUT6 in primären Adipocyten.....	74
3.2.3. Die Mutation der N-terminalen Dileucinmotive in GLUT8 und GLUT6 erhöht die Plasmamembranexpression in Adipocyten	75
3.2.4. Koexpression von GLUT8 und GLUT6 mit der Dynamin-(K44A)-Mutante in Adipocyten.....	76
3.2.5 Stimulierung der GLUT8- und GLUT6-Translokation in primären Adipocyten	77
3.2.6. Die biologische Funktion von GLUT8 in Adipocyten	79
3.2.7. Zusammenfassung der GLUT8- und GLUT6-Ergebnisse/Diskussion	80
4. METHODEN	82
4.1. Molekularbiologische Methoden	82
4.1.1. Agarose-Gelelektrophorese.....	82

4.1.2. Extraktion der DNA mit dem „UltraClean 15, DNA-Purification Kit“	82
4.1.3. DNA-Fällung mit Ethanol.....	82
4.1.4. Plasmidpräparation (1-3ml Bakterienkultur)	83
4.1.5. Restriktionsendonukleolytische Spaltung.....	84
4.1.6. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	84
4.1.7. Bakterienkultur	84
4.1.8. Konstruktion von Haemagglutinin (HA)-GLUT6 und HA-GLUT8-Mutanten.....	84
4.1.9. Konstruktion des p19 DNA-Fragments	86
4.1.10. Klonierung und Konstruktion des Volllängen-p49-Proteins	86
4.1.11. Klonierung von p49-N-Terminus, p49-C-Terminus und p49 ohne C-terminale Prolin-reiche-Sequenz.....	87
4.1.12. Konstruktion des GST-(Glutathion-S-Transferase)-GLUT4-N-Terminus	88
4.2. Protein-Biochemische Methoden.....	89
4.2.1. Expression und Reinigung von GST-Fusionsproteinen aus <i>E. coli</i>	89
4.2.2. Reinigung der Fusionsproteine (GST-p19, GST-p49) durch Glutathion- Affinitätschromatographie	89
4.2.3. Transfer und immunologischer Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membran.....	90
4.3. Zellkultur	93
4.3.1. CHO- und COS-7-Zellen	93
4.3.2. Transfektion von Ratten-Adipocyten mit HA-GLUT8, HA-GLUT6 (Wildtyp, (LL/AA)-Mutanten) sowie p49, p49-N und p19.....	93
4.3.3. Zelloberflächen-Antikörper-Bindungsanalyse von transfizierten isolierten primären Adipocyten.....	93
4.3.4. Koexpression von HA-GLUTs mit Dynamin-(K44A)	94
4.3.5. Zelloberflächen-Expression von HA-GLUT4, HA-GLUT8 und HA-GLUT6.....	94
4.3.6. Immunocytochemische Detektion von überexprimiertem HA-GLUT8 in COS-7 Zellen	94
4.4. Hefe-Two-Hybrid-System	96
4.4.1. Hefekulturen	96
4.4.2. Identifizierung des p19-Proteinfragments.....	96
4.4.3. Kotransformation von Wildtyp-GLUT4-NT und drei überlappenden GLUT4-NT- Deletionsmutanten mit p49	97
4.4.4. Kotransformation mit Wildtyp-GLUT4-NT, GLUT4-NT-(ED/QN) und p49	97
4.4.5. β -Galaktosidase-Aktivitätsbestimmung mit CPRG als Substrat.....	97
5. MATERIAL	99
5.1. Zellen, Plasmide und cDNAs.....	99
5.2. Zellkultur-Medien.....	99
5.3. Medien für das Hefe-Two-Hybrid-System	100
5.4. Antikörper, Enzyme und Proteine	100
5.5 Chemikalien.....	101
5.7. Kit-Systeme.....	103

5.8. Sonstige Materialien	104
5.9. Filmmaterial	104
5.10. Laborausstattung	104
6. ANHANG	108
6.1. Plasmidkarten	108
6.2. Tabellen.....	112
LITERATURVERZEICHNIS	113

Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
Bp, kBp	Basenpaare, Kilobasenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
Ci	Curie
cpm	counts per minute
CT	C-Terminus
Da, kDa	Dalton, Kilodalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E-coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	(Ethylendinitrilo)tetraessigsäure
g	Erdbeschleunigung, 9,81 m/s ²
Glc	Glucose
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
IGF-1RK	Insulin-like growth factor-1-Rezeptor-Kinase
K/A	Lysin zu Alanin-Austausch
M	mol/l
min	Minute
max.	maximal
mg	Miligramm
ml	Mililiter
μCi	Mikrocurie
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
NT	N-Terminus
PBS	phosphate buffered saline
pH	potentium hydrogenii
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinyliden-Difluorid
pSer	Phosphoserin
pTyr	Phosphotyrosin
pThr	Phosphothreonin
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat

Verzeichnis der Abkürzungen

SDS-PAGE	SDS- Polyacrylamidgel-Elektrophorese
Ser	Serin
Sf9	<i>Spodoptera frugiperda</i> (Klon 9)
SH2	Src-Homologie 2
SH3	Src-Homologie 3
sog.	sogenannt
TBS	Tris Buffered Saline
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan
Triton-X-100	Octylphenolpoly(ethylenglycolether) _n
TFA	Trifluoressigsäure
Thr	Threonin
Tyr	Tyrosin
u.a.	unter anderem
ÜNK	Übernachtkultur
V	Volt
v/v	volume/volume
W	Watt
wt	Wildtyp
w/v	weight/volume
z.B.	zum Beispiel

Kurzzusammenfassung

1. Identifizierung und Charakterisierung eines neuartigen GLUT4-Bindeproteins (p49) :

Der Glucosetransporter 4 (GLUT4) wird in insulinempfindlichen Geweben, wie Fettzellen (Adipocyten) und Muskelzellen exprimiert und vermittelt dort den insulinstimulierten Glucosetransport. GLUT4 recycelt zwischen intrazellulären Kompartimenten und der Plasmamembran. Um neue regulatorisch wirkende Komponenten des GLUT4-Recyclings zu identifizieren, wurde das Hefe-Two-Hybrid-System verwendet. Dabei diente der GLUT4-N-Terminus als Köder (*bait*) und eine Adipocyten-cDNA-Bank als Beute (*prey*). Es konnte ein neuartiges 49 kDa Coiled-coil-Protein (p49) isoliert und partiell charakterisiert werden, das *in vitro* und *in vivo* an ein 7 Aminosäuren umfassendes Bindemotiv (QIGSEDG) im GLUT4-N-Terminus bindet. Das basische p49-Protein (pI 9.5) enthält vermutlich drei Coiled-coil-Domänen (Lupas-Algorithmus) im N-Terminus sowie eine Konsensussequenz für die Bindung von SH3-Proteinen (PxxP) im C-Terminus. Das p49-Protein findet sich in Säugern (Mensch, Maus, Ratte, Rind und Schaf) und die p49-mRNA konnte in insulinempfindlichen Geweben wie Muskelzellen und Fettzellen nachgewiesen werden. Durch die Überexpression von p49-Konstrukten, die eine GLUT4-bindende N-terminale Hälfte von p49 enthalten (Volllänge p49, p49-N (Aminosäuren 1-216, 25kDa) und p19 (Aminosäuren x-y, 19 kDa) in primären Ratten-Adipocyten, wird die GLUT4-Expression um ca. 50% gehemmt. Der gleiche Effekt, d.h. die Reduktion der GLUT4-Expression, wird erreicht, wenn das p49-Bindemotiv im GLUT4 ausgeschaltet wird. P49 ist mit GLUT4 in primären Ratten-Adipocyten kolokalisiert und zeigt zusätzlich eine Kolokalisation mit dem ER-(endoplasmatisches Retikulum)-Markerprotein Calnexin. Die biologische Funktion von p49 in Adipocyten ist unbekannt. Versuche zur Bestimmung des *turn-overs* von GLUT4 mit dem Proteinsyntheseinhibitor Cycloheximid implizieren jedoch eine Rolle von p49 bei der intrazellulären Sortierung von GLUT4.

2. Charakterisierung der beiden GLUT-Transporter, GLUT6 und GLUT8 :

Die subzelluläre Verteilung der beiden erst kürzlich klonierten Glucosetransporter GLUT6 und GLUT8 konnte durch die Expression von Hämagglutinin-(HA)-epitopmarkierten GLUTs in transfizierten Ratten-Adipocyten bestimmt werden. In unstimulierten Adipocyten waren HA-GLUT6 und HA-GLUT8, genau wie HA-GLUT4, in intrazellulären Kompartimenten lokalisiert. Im Gegensatz dazu führte die Mutation eines Dileucin-Motivs (LL-Motiv) in den N-Termini von HA-GLUT6/8 zu einer konstitutiven Zelloberflächenexpression beider Transporter. Durch Blockade der Endocytose durch Koexpression einer dominant-negativen Dynamin-(K44A)-Mutante konnte nachgewiesen werden, dass beide Transporter in Adipocyten einem kontinuierlichen Recycling unterliegen. Im Gegensatz zum HA-GLUT4 zeigten HA-GLUT6/8 jedoch keine Translokation zur Plasmamembran, wenn die Zellen mit Insulin oder anderen Stimuli (Phorbolestern, Hyperosmolarität, Vasopressin, Isoproterenol/Adenosindeaminase, GTPgammaS und Oxytocin) behandelt wurden.

1. Einleitung

1.1. Molekularer Mechanismus der GLUT4-Translokation als Modell für die GLUT6- und GLUT8-Translokation

Die meisten Säugerzellen benutzen Glucose als primären Energielieferant. Da die Zuckermoleküle hydrophil sind und nicht selbstständig die Plasmamembran durchqueren können, werden spezifische Glucosetransporter benötigt. In Säugerzellen sind zwei unterschiedliche Typen von Glucosetransportern identifiziert worden. Der Na⁺-gekoppelte Glucosetransporter wird nur in Epithelzellen exprimiert und transportiert Glucose (und andere Hexosen) entgegen einen Konzentrationsgradienten. Im Gegensatz dazu wird die zweite Glucosetransportergruppe, die als GLUTs (Glucose-Transport-Proteine) bezeichnet wird, in allen Zellen exprimiert. Die GLUT-Transporter katalysieren die Diffusion von Glucosemolekülen und anderen Hexosemolekülen über die Plasmamembran (Mueckler et al., 1994).

Der Glucosetransporter 4 ist der einzige bekannte GLUT-Transporter, dessen Translokation in insulinempfindlichen Geweben wie Fett- und Muskelgewebe durch das Hormon Insulin stimuliert wird. Somit wird der insulinabhängige Glucosetransport in diesen Geweben ausschließlich durch GLUT4 durchgeführt. Die Regulation der Transportaktivität erfolgt über eine hormonstimulierte, reversible Umverteilung von Glucosetransportproteinen vom Zellinneren zur Plasmamembran durch gesteuerten Vesikeltransport (Holman und Cushman, 1994; Rea und James, 1997). Am besten untersucht ist die GLUT4-Translokation in Adipocyten. In unstimulierten Adipocyten befindet sich >90% des GLUT4 in einem mit dem *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) assoziierten intrazellulären Speicherkompartiment (GLUT4-Vesikel). Insulinstimulierung (in Muskelzellen zusätzlich auch Kontraktion) bewirken die Exocytose der GLUT4-Vesikel. Die Folge ist eine GLUT4-Translokation zur Plasmamembran und dadurch eine Erhöhung der Glucosepermeabilität. Die Entfernung von GLUT4 von der Plasmamembran erfolgt hormonunabhängig durch Endocytose. Der so internalisierte GLUT4 gelangt über ein endosomales Sortierkompartiment wieder zurück in das insulinstimulierbare Speicherkompartiment (Abb. 1.1).

Die GLUT4-Translokation lässt sich somit in 4 Teilprozesse aufteilen :

1. *Signaltransduktion*: Die Insulinbindung an den Insulinrezeptor führt über eine Kaskade von Proteinphosphorylierungen zur Aktivierung einer Lipidkinase, der Phosphatidylinositol-3'-Kinase (PI3K) (Rea und James, 1997). Die weiteren Schritte, die zur Exocytose der GLUT4-Vesikel führen, sind weitgehend unbekannt. Jedoch wird diskutiert, dass die Proteinkinase-B (Akt) und verschiedene Isoformen der Proteinkinase-C eine wesentliche Rolle bei der Signaltransduktion spielen.
2. *Exocytose*: Das Andocken der GLUT4-Vesikel mit der Plasmamembran besitzt Ähnlichkeit mit der synaptischen Freisetzung von Neurotransmittern und wird über die Interaktion von vesikulären „SNARE“-Proteinen (VAMP2) mit Syntaxin-4, einem Dockingprotein auf der Plasmamembran, vermittelt (Rea und James, 1997). An diesem Prozess sind außerdem Rab/trimere GTPasen beteiligt (Novick und Zerial, 1997).

3. *Endocytose*: Die Internalisierung von GLUT4 von der Plasmamembran verläuft über Clathrin-coated Vesikel unter Beteiligung von heterotetrameren Adapterproteinen (APs) und der GTPase Dynamin (Al-Hasani et al., 1998).
4. *Sortierung*: Der Mechanismus der Sortierung von internalisiertem GLUT4 in das Speicherkompartiment ist bisher weitgehend unverstanden. Es werden spezifische Adapterproteine postuliert, die mit GLUT4-spezifischen Determinanten interagieren und so den Transport von GLUT4 in die Speichervesikel ermöglichen.

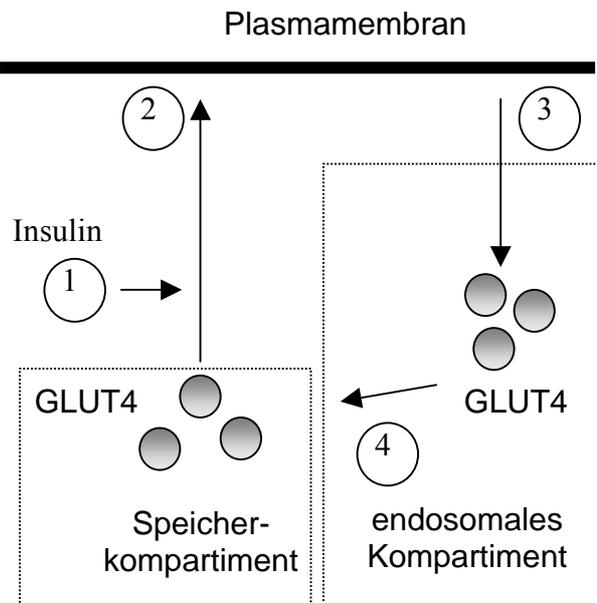


Abb. 1.1. Recyclingweg von GLUT4.

Im Gegensatz zu konstitutiv recycelnden Membranproteinen (z.B. Transferrin-Rezeptor) wird GLUT4 in ein Speicherkompartiment sortiert und gelangt erst nach Insulinstimulierung zur Plasmamembran. Durch Endocytose recycelt GLUT4 von der Plasmamembran über das endosomale Kompartiment zurück in das Speicherkompartiment. GLUT4, Glucosetransporter-4.

1.1.1. Signalwege der insulinstimulierten GLUT4-Translokation

Nach neueren Untersuchungen wird vermutet, dass die GLUT4-Translokation ausgehend vom Insulinrezeptor (IR) über zwei unabhängige Signalwege verläuft (Abb. 1.1.1.).

1. Signalweg: Nach Insulinstimulierung erfolgt die Insulinrezeptor (IR)-abhängige Tyrosinphosphorylierung vom Insulin-Rezeptor-Substrat-1 (IRS-1) und somit zur Aktivierung der Lipidkinase Phosphatidylinositol-3'-Kinase (PI3K) (White, 1997). Die PI3K führt durch einen nicht aufgeklärten Mechanismus über die Stimulierung der Phosphoinositol-abhängigen Kinase (PDK)-Aktivität zur Phosphorylierung der Serin/Threonin-Kinase Proteinkinase-B (PKB/Akt) (Troussard et al., 2003). Da gezeigt worden ist, dass konstitutiv aktive Akt-Kinase die insulinstimulierte GLUT4-Translokation stimuliert und inaktive Akt-Kinase die GLUT4-Translokation inhibiert, wird vermutet, dass die Akt-Kinase eine Schlüsselrolle bei der Signaltransduktion und GLUT4-Translokation hat (Pessin et al., 1999). Durch Untersuchung der Expression von konstitutiv aktiver Akt-Kinase in Adipocyten wurde beobachtet, dass die GLUT4-Translokation vollständig aktiviert worden ist (Kohn et al., 1996; Cong et al., 1997; Hajduch et al., 1998; Ueki et al.,

1998; Wang et al., 1999). Tavaré et al. haben demonstriert, dass die Expression der konstitutiv aktiven Akt-Mutante (Akt-DD) die GLUT4-Translokation in Adipocyten stimuliert, ohne die GLUT1- und Transferrin-Rezeptor-Translokation zu aktivieren. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass eine dominant-negative Akt-Mutante (Akt-AAA) die insulinstimulierte GLUT4-Translokation um 60% inhibieren kann (Wang et al., 1999). Durch die Mikroinjektion eines Akt-Substratpeptides oder Akt-Antikörpers, wurde die GLUT4-Translokation in 3T3-Zellen ebenfalls inhibiert (Hill et al., 1999). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Akt-Kinase die Rekrutierung von GLUT4 vom sog. Speicherkompartiment zur Plasmamembran stimuliert. Weitere Proteine, die in dem Signalweg vom Insulinrezeptor (IR) zu GLUT4-Vesikeln involviert sind, sind weitgehend unbekannt und die Akt-Kinase wird als letzte bekannte Komponente angesehen.

2. Signalweg: Es wird vermutet, dass die Phosphoinositol-3'-Kinase (PI3K)-Aktivität zwar notwendig, aber nicht hinreichend für die insulinstimulierte GLUT4-Translokation ist. In Adipocyten induzieren viele Wachstumsfaktorrezeptoren (z.B. PDGF) die PI3K-Aktivität, nicht aber die GLUT4-Translokation. In einer Studie wurde nachgewiesen, dass einige Patienten, die eine reduzierte Insulinstimulierung der PI3K aufwiesen, trotzdem eine normale Proteinkinase-B (Akt)-Aktivierung besaßen (Kim et al., 1999). Dies führte zu der Hypothese, dass nur eine schwache PI3K-Aktivierung notwendig ist, um die *downstream*-Proteine des Signaltransduktionsweges zu stimulieren, und dass der Signalweg vom Insulinrezeptor-Substrat (IRS) zur Akt-Kinase die Insulinresistenz mancher Typ-2 *Diabetes mellitus*-Patienten nicht erklärt (Kim et al., 1999). Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, dass es einen zweiten, PI3K-unabhängigen Signalweg ausgehend vom Insulinrezeptor (IR) zu den GLUT4-Vesikeln geben muss.

Seit einiger Zeit wird ein zweiter Signalweg diskutiert, der über die IR-abhängige Tyrosinphosphorylierung eines Adapterproteins, c-Cbl, läuft. Das phosphorylierte c-Cbl-Protein bindet an ein weiteres Adapterprotein, CAP, und bildet einen c-Cbl/CAP-Komplex (Chiang et al., 2001). Der c-Cbl/CAP-Komplex kann nun zu Cholesterin-reichen Mikrodomänen (Lipid-Rafts) in der Plasmamembran gelangen und andocken. Bei dem Docking-Prozess an die Lipid-Rafts bindet CAP an das Lipid-Raft-assoziierte Membranprotein Flotillin (Kimura et al., 2001). Durch die anschließende Rekrutierung des Guanylnukleotid-Austauschfaktors C3G wird die kleine 21 kDa GTPase, TC10 aktiviert (Chiang et al., 2001). Die genaue Funktion der GTPase TC10 in der GLUT4-Translokation ist unbekannt. Jedoch konnte demonstriert werden, dass die inaktive TC10-Mutante, T31N, eine inhibierende Wirkung auf die GLUT4-Translokation ausübt.

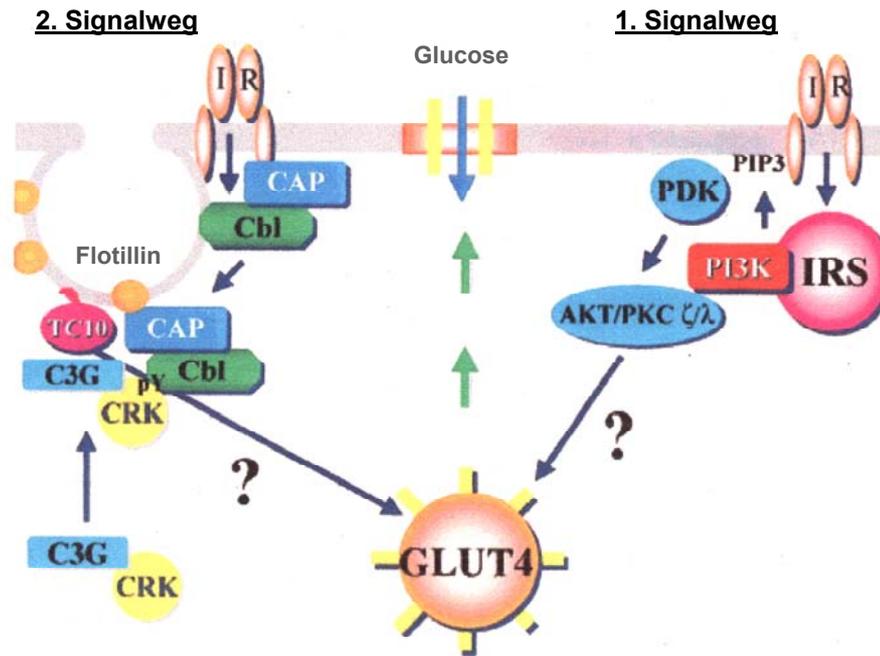


Abb. 1.1.1. Zwei unabhängige Signalwege vom Insulinrezeptor zu den GLUT4-Vesikeln (Baumann und Saltiel, 2001).

1. Signalweg: Insulin stimuliert die Phosphoinositid-3'-Kinaseaktivität (PI3K) durch Tyrosinphosphorylierung des Insulin-Rezeptor-Substrat (IRS)-Proteins. Dies führt zur Stimulierung der Phosphoinositid-abhängigen Kinase (PDK)-Aktivität, die wiederum die Proteinkinase-B (Akt) phosphoryliert und aktiviert. Die Akt-Kinase ist die letzte bekannte Komponente, die eine GLUT4-Translokation zur Plasmamembran stimuliert. **2. Signalweg:** Insulin stimuliert die Phosphorylierung des Adapterproteins c-Cbl, worauf hin der c-Cbl/CAP-Komplex an die Plasmamembran rekrutiert wird. Dort interagiert der c-Cbl/CAP-Komplex mit Flotillin und führt zur Interaktion mit dem Adapterprotein CRK sowie dem Guanylnukleotid-Austauschfaktor-3 (C3G). Durch C3G wird das G-Protein TC10 aktiviert, was zur GLUT4-Translokation führt (Baumann und Saltiel, 2001). IR, Insulinrezeptor; PIP3, Phosphoinositid-3-Phosphat.

1.2. Die Transferrin-Rezeptor-(TfR)- und Mannose-6-Phosphat-Rezeptor-(MPR)-Translokation

In Adipocyten wurde beobachtet, dass außer GLUT4 auch andere endosomale Proteine nach Insulinstimulierung zwischen intrazellulären Kompartimenten und der Plasmamembran recyceln können. Zu diesen Proteinen gehören der Transferrin-Rezeptor (TfR) und der Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (MPR). Die Translokation beider Proteine wird ebenfalls durch Insulin stimuliert, ist aber im Vergleich zum GLUT4 signifikant schwächer (Wardzala et al., 1984; Oka et al., 1984; Davis et al., 1986; Tanner und Lienhard, 1987). Die GLUT4-Vesikel sind biochemisch nicht mit dem endosomalen Recyclingnetzwerk verbunden, das den GLUT1 und den Transferrin-Rezeptor bzw. Mannose-6-Phosphat-Rezeptor enthält (Rea et al., 1997). Es wird angenommen, dass der GLUT4 einer separaten Kompartimentierung unterliegt.

Der Transferrin-Rezeptor ist ein Membranglykoprotein, mit einer kurzen cytoplasmatischen Domäne und einer einzigen Membrandomäne. Nach Bindung mit eisengebundenem Transferrin kann der Transferrin-Rezeptor internalisiert werden und gelangt zu den frühen

sauren Endosomen, wo er die gebundenen Eisenmoleküle entlässt. Danach recycelt der TfR zurück zur Plasmamembran und entlässt das Transferrin. Somit recycelt der TfR nach Ligandenbindung konstitutiv zwischen der Plasmamembran und den frühen sauren Endosomen (Ross et al., 2002).

Bis heute konnten zwei Mannose-6-Phosphat-Rezeptor-(MPR)-Isoformen identifiziert werden. Die erste MPR-Isoform hat ein Molekulargewicht von 300 kDa und wird auch als Kationen-unabhängiger MPR (CI-MPR) bezeichnet. Die zweite Isoform ist ein Kationen-abhängiger MPR (CD-MPR) und kommt als Dimer oder Tetramer vor, wobei die einzelnen Untereinheiten ein Molekulargewicht von 45 kDa aufweisen (Diaz und Pfeffer., 1998). Der Mannose-6-Phosphat-Rezeptor vermittelt den Transport von neu-synthetisierten lysosomalen Enzymen. Dabei werden die lysosomalen Enzyme ausgehend vom trans-Golgi-Netzwerk (TGN) in ein prälysosomales Kompartiment sortiert. Der MPR recycelt zwischen Endosomen und dem TGN und ebenfalls zwischen Endosomen und der Plasmamembran. Diaz und Pfeffer konnten ein 47 kDa-Protein (TIP47) identifizieren, das selektiv an den C-Terminus vom MPR bindet. Das TIP47-Protein ist sowohl mit Endosomen als auch im Cytoplasma lokalisiert und vermittelt den MPR-Transport vom endosomalen Kompartiment zum trans-Golgi-Netzwerk.

1.3. GLUT4 – null-(knockout) Maus und die Glucosetransporter 6 und 8

Diabetes mellitus ist eine weltweite Erkrankung und betrifft über 10% mancher ethnischer Gruppen bzw. Populationen. Typ-1 *Diabetes mellitus* resultiert aus einer Autoimmunzerstörung der Insulin-sekretorischen β -Zellen im Pankreas (Baumann und Saltiel, 2001). Typ-2 *Diabetes mellitus* oder *Non-insulin-dependent Diabetes mellitus* (NIDDM) ist zahlenmäßig (Inzidenz >5%) die bedeutendste metabolische Störung in den westlichen Industrienationen. Die Pathophysiologie des NIDDM beruht auf einer Insulinresistenz der Glucoseaufnahme und Glucoseverwertung im Muskel- und Fettgewebe (Kahn et al., 1995; Kahn et al., 1996). Die Ausbildung des Typ-2 *Diabetes mellitus* kann durch unterschiedliche Faktoren begünstigt bzw. ausgelöst werden. Die wichtigsten Faktoren sind Übergewicht, ungesunder Lebensstil, Altern und genetische Prädisposition (Saltiel, 2001). Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass bestimmte Defekte in der Signaltransduktion ebenfalls zu NIDDM führen können. Einige Modifikationen des Insulinrezeptors lösten NIDDM aus, und es wird spekuliert, dass bestimmte Cytokine wie z.B. $\text{TNF}\alpha$ die Insulinwirkung blockieren (Peraldi und Spiegelman, 1998). Mutationen bestimmter Hormone wie Glukagon und Amylin können NIDDM begünstigen (Shah et al., 2000).

Zusammengefasst können viele Faktoren, z.B. Steroid-induzierter Diabetes, fehlerhafte Transkription des Insulingens, fehlerhafte Entwicklung der β -Zellen, Degradierung von Insulin, Defekte in der Insulinsekretion, gestörte Regulation durch Leptin und des Lipidmetabolismus zur Ausbildung von NIDDM führen (Strack et al., 1995; Kjos und Buchanan, 1999; Ohneda et al., 2000; Schuldiner et al., 2000; Duckworth et al., 1998; Drucker 1999; Friedman, 2000; Ginsberg, 2000).

Die meisten Zelltypen enthalten mehr als einen Typ von Glucosetransportern. In Fett- und Muskelgewebe ist GLUT4 die dominante Form. Die GLUT4-vermittelte

Glucosetransportaktivität ist hauptverantwortlich für die Glucosehomöostase bei Säugern (Kahn, 1995). Überraschenderweise konnte nachgewiesen werden, dass in Muskelzellen von GLUT4-*null* Mäusen zwar Abnormalitäten im Glucose- und Lipidmetabolismus detektiert wurden, die Mäuse entgegen aller Erwartung jedoch nicht diabetisch waren (Katz et al., 1995). Die GLUT4-*null* Maus demonstrierte allerdings deutliche Merkmale einer Insulinresistenz. Die basale und insulinstimulierte Glucoseaufnahme von *Soleus*- und EDL-Muskelfasern *in vitro* konnte durch Cytochalasin B, einem kompetitiven Inhibitor der GLUT-Glucosetransporter, gehemmt werden. Interessanterweise war der insulinstimulierbare Glucosetransport in *Soleus*-Muskelfasern der GLUT4-*null* Mäuse sogar um das 2-fache erhöht.

Dieser Befund führt zu zwei Hypothesen der GLUT4-Kompensation in GLUT4-*null* Mäusen.

1. Expression von neuartigen (bisher unbekanntem bzw. erst seit kurzem bekannten) kompensatorisch wirkenden GLUT-Transportern (Ryder et al., 1999).
2. Die Skelettmuskeln von Mensch und Nagetier besitzen außer GLUT4 noch GLUT1, GLUT3 und GLUT5. Es besteht daher die Möglichkeit, dass diese GLUT-Transporter in GLUT4-*null* Mäusen stärker exprimiert werden und somit den GLUT4-Mangel kompensieren.

Durch Westernblot- und Northernblot-Analysen wurde nachgewiesen, dass keiner der bisher bekannten GLUTs bzw. Na⁺-gekoppelten Glucosetransporter in den untersuchten Muskelzellen heraufreguliert wurde (Katz et al., 1995; Stenbit et al., 1996). Somit ist vermutlich die erste Hypothese, dass in GLUT4-*null* Mäusen die Expression weiterer, unbekannter Glucosetransporter für die beobachtete Euglykämie der Tiere verantwortlich sind, richtig. Um dies zu untersuchen, habe ich im Rahmen meiner Doktorarbeit die Translokation der Glucosetransporter GLUT6 und GLUT8 in Ratten-Adipocyten untersucht. Es stellte sich die Frage, ob diese GLUT-Transporter den beobachteten Effekt in GLUT4-*null* Mäusen erklären können.

1.4. Glucosetransporter der GLUT-Familie

Die passive Hexoseaufnahme in Säugern wird durch Transportproteine aus der GLUT-Genfamilie katalysiert (Mueckler et al., 1994). Die Familie der „klassischen“ GLUTs wird nach der Reihenfolge ihrer Klonierung nummeriert und umfasst insgesamt 13 Transporter (Tabelle 1.2.).

Die gemeinsamen topologischen Strukturmerkmale der GLUT-Familie sind 12 Transmembrandomänen, 7 konservierte Glycinreste in den Helices, intrazelluläre N- und C-Termini, ein großer intrazellulärer Loop und ein großer, glykosylierter extrazellulärer Loop. Außerdem besitzen die GLUT-Transporter zwei konservierte Tryptophanreste und zwei konservierte Tyrosinreste. Durch Aminosäuresequenzvergleich der GLUT-Transporter können diese in drei Subfamilien aufgeteilt werden. Die erste Subfamilie (Klasse I) umfasst die GLUT-Transporter 1-4, die zweite (Klasse II) beinhaltet die Transporter GLUT5, GLUT7, GLUT9 und GLUT11, wobei GLUT5 ein Fruktosetransporter ist. Die dritte Subfamilie (Klasse III) enthält die Transporter GLUT6, GLUT8, GLUT10, GLUT12 und den Myo-Inositol-Transporter HMIT1 (Joost und Thorens, 2001).

Die Glucosetransporterfamilie weist eine gewebe- und differenzierungsspezifische Expression auf: GLUT1 ist der ubiquitär vorkommende Transporter und wird hauptsächlich in Erythrocyten und Gehirn exprimiert; GLUT2 wird unter anderem in pankreatischen beta-Zellen exprimiert und ist dort eine Komponente des „Glucosensensor“-Mechanismus. Zusätzlich wird GLUT2 verstärkt in der Leber exprimiert; GLUT3 kommt in neuronalen Zellen vor; GLUT4 wird in insulinsensitiven Geweben, Fett- und Muskelzellen exprimiert (Holman und Cushman, 1994). GLUT5 transportiert Fruktose mit hoher und Glucose mit niedriger Affinität und ist in Testis und in der Niere lokalisiert. GLUT6 (früher als GLUT9 bezeichnet) wird im Gehirn, Milz und in Leukocyten exprimiert und GLUT8 in Testis, Gehirn, Fettgewebe und anderen Geweben. Die Glucosetransporter der Klasse I besitzen einen konservierten Glutaminrest in Helix 5 und ein STSIF-Motiv im extrazellulären Loop 7 (Mueckler et al., 1994; Doege et al., 1998). Den Glucosetransportern der Klasse II fehlt ein konservierter Tryptophanrest in der Helix 10, der als wichtige Aminosäure bei der Ligandenbindung von Cytochalasin B und Forskolin beschrieben ist (Garcia et al., 1992; Schürmann et al., 1993).

Die von mir untersuchten Glucosetransporter GLUT6 und GLUT8 gehören zur Subfamilie III und sind charakterisiert durch einen kürzeren extrazellulären Loop1, der keine Glykosylierungsstelle enthält. Diese Glykosylierungsstelle befindet sich im größeren Loop9 (Abb. 2.14B).

Konservierte Aminosäuren der GLUT-Familie sind von besonderem Interesse, da durch sie die Funktion und Struktur der Transporter untersucht werden kann. Die konservierten Aminosäuren wurden ursprünglich durch Sequenzuntersuchungen bzw. Sequenzvergleich identifiziert, und es wurde nachgewiesen, dass viele von ihnen eine wichtige Funktion bei der Strukturausbildung der GLUTs und dem Glucosetransport besitzen (Schürmann et al., 1997). Auffällig ist, dass alle drei GLUT-Subfamilien zwei konservierte Tryptophanreste in Helix 6 und 11 sowie zwei konservierte Tyrosinreste in Helix 4 und 7 aufweisen. Die beiden konservierten Tryptophanreste haben eine wichtige Funktion bei der Transportaktivität und der Ligandenbindung (Garcia et al., 1992; Schürmann et al., 1993). Für die konservierten Tyrosinreste ist bestimmt worden, dass sie ebenfalls unerlässlich für die Transportaktivität von GLUT1 und GLUT4 sind (Mori et al., 1994; Wandel et al., 1994).

Isoformen	andere Benennung/ Klasse	Gewebelokalisation	Insulinsensitiv	Charakteristik (Transport)	Skelettmuskel-Lokalisation	Fettgewebe-Lokalisation	Referenzen
GLUT1	- / I	Erythrocyten, Gehirn, ubiquitäre Verteilung	Nein	Glucose	Ja	Ja	Mueckler et al., 1985; Gould et al., 1991
GLUT2	- / I	Leber, Pankreas, Niere	Nein	Glucose(schwache Affinität); Fruktose	Nein	Nein	Fukumoto et al., 1988; Gould et al., 1991
GLUT3	- / I	Gehirn	Nein	Glucose (hohe Affinität)	Nein	Ja (nur die mRNA)	Kayano et al., 1988; Gould et al., 1991
GLUT4	- / I	Herz, Muskel, Fettgewebe, Gehirn	Ja	Glucose (hohe Affinität)	Ja	Ja	Fukumoto et al., 1989; James et al., 1989
GLUT5	- / II	Testis, Niere	Nein	Fruktose; Glucose (sehr schwache Affinität)	Ja	Ja	Kayano et al., 1990; Davidson et al., 1992
GLUT6	GLUT9/ III	Gehirn, Milz, Leukocyten	Nein	Glucose	Nein	nicht untersucht	Doege et al., 2000; Lisinski et al., 2001
GLUT7	- / II	nicht untersucht	nicht untersucht	nicht untersucht	nicht untersucht	nicht untersucht	Joost und Thorens, 2001
GLUT8	GLUTX1/III	Testis, Gehirn, und andere Gewebe	Nein (Ja in Blastocysten)	Glucose	Ja (nur die mRNA)	Ja (nur die mRNA)	Carayannopoulos et al., 2000; Doege et al., 2000; Lisinski et al., 2001
GLUT9	GLUTX / II	Leber, Niere	nicht untersucht	nicht untersucht	Nein	nicht untersucht	Phay et al., 2000
GLUT10	- / III	Leber, Pankreas	Nein	Glucose	Ja (nur die mRNA)	nicht untersucht	Dawson et al., 2001; McVie-Wylie et al., 2001
GLUT11	GLUT10/II	Herz, Muskel	Nein	Glucose (schwache Affinität) / Fruktose	Ja (nur die mRNA)	Nein	Doege et al., 2001; Wu et al., 2002; Sasaki et al., 2001
GLUT12	GLUT8 / III	Herz, Prostata, Muskel	Ja	nicht untersucht	Ja	Ja	Roger et al., 2002
HMIT	- / III	Gehirn	nicht untersucht	H+-myo.-Inositol	Nein	Ja (nur die mRNA)	Uldry et al., 2001

Tab. 1.2. Die Glucosetransporter aus der GLUT-Familie (Wood und Trayhurn, 2003).

Die Tabelle zeigt die 13 bekannten Glucosetransporter, ihre Gewebeverteilung, Insulinstimulierung, funktionelle Charakteristika, Vorkommen in Skelettmuskel und Fettgewebe sowie die Literatur-Referenzen (Wood und Trayhurn, 2003). GLUT, Glucosetransporter; HMIT, Myo-Inositol-Transporter

1.4.1. Spezielle Merkmale der Glucosetransporter GLUT6 und GLUT8

Die im Rahmen meiner Doktorarbeit untersuchten Glucosetransporter 6 und 8 gehören zur GLUT-Subfamilie III und weisen einen verkürzten, nicht-glykosylierten Loop1 sowie einen verlängerten glykosylierten Loop9 auf. Die humane GLUT6-cDNA wurde durch PCR und RACE-PCR-Amplifikation kloniert, und GLUT8 ist durch Sequenzvergleich in der EST-Datenbank identifiziert worden (Doege et al., 2000).

Die Humane und Maus-cDNA von GLUT8 wurde gleichzeitig von zwei Arbeitsgruppen kloniert und identifiziert (Ibberson et al., 2000; Doege et al., 2000). Die Aminosäuresequenzen von GLUT6 und GLUT8 besitzen alle nötigen Elemente, die für eine Glucosetransportfunktion wichtig sind. Beide Transporter haben eine 12-Transmembranstruktur sowie die beschriebenen konservierten Aminosäuren, die für einen Glucosetransport unerlässlich sind (Schürmann et al., 1993 und 1997; Mori et al., 1994; Wandel et al., 1994; Mueckler et al., 1994 und Hashiramoto et al., 1992).

Humane GLUT6-mRNA ist überwiegend im Gehirn, Milz und in peripheralen Leukocyten lokalisiert (Doege et al., 2000), während die humane GLUT8-mRNA in Testis und auch in geringeren Mengen in Herz, Gehirn, Skelettmuskel und in Fettgewebe identifiziert wurde (Ibberson et al., 2000; Doege et al., 2000). Zusätzlich konnte GLUT8-mRNA und GLUT8-Protein in prä-implantierten Embryonen lokalisiert werden (Carayannopoulos et al., 2000). Die Glucosetransportaktivität von GLUT6 wurde in einem System aus rekonstituierten Membranen untersucht und teilweise charakterisiert (Doege et al., 2000). GLUT6 hat eine niedrige Affinität zu Glucose und weist erst eine Transportaktivität auf, wenn eine Substratkonzentration von 5 mM erreicht ist. Die Transportaktivität von GLUT8 wurde in zwei unterschiedlichen Zellsystemen untersucht. Es konnte demonstriert werden, dass die GLUT8-Expression in *Xenopus-Oozyten* eine hohe Glucosetransportaktivität zur Folge hat (K_m 2mM) (Ibberson et al., 2000). In transfizierten COS7-Zellen ist ebenfalls eine hohe Glucosetransportaktivität beobachtet worden (Doege et al., 2000). GLUT6 und GLUT8 besitzen ein Dileucinmotiv [(LL)-Motiv] im intrazellulären N-Terminus, welches für GLUT4 als Internalisierungssequenz beschrieben wurde.

1.4.2. Der radioaktive Zelloberflächen-Antikörper-Bindungsnachweis

Um die GLUT-Translokation in intakten primären Adipocyten (Fettzellen) quantitativ nachzuweisen, kann man sich eines radioaktiven Zelloberflächen-Antikörper-Bindungsnachweises bedienen. Da GLUT4 konstitutiv zwischen intrazellulären Kompartimenten und der Plasmamembran recycelt, ist es möglich durch eine Epitopmarkierung des extrazellulären Loops den Transporter auf der Plasmamembran durch einen spezifischen Antikörpernachweis zu detektieren (Abb.1.3).

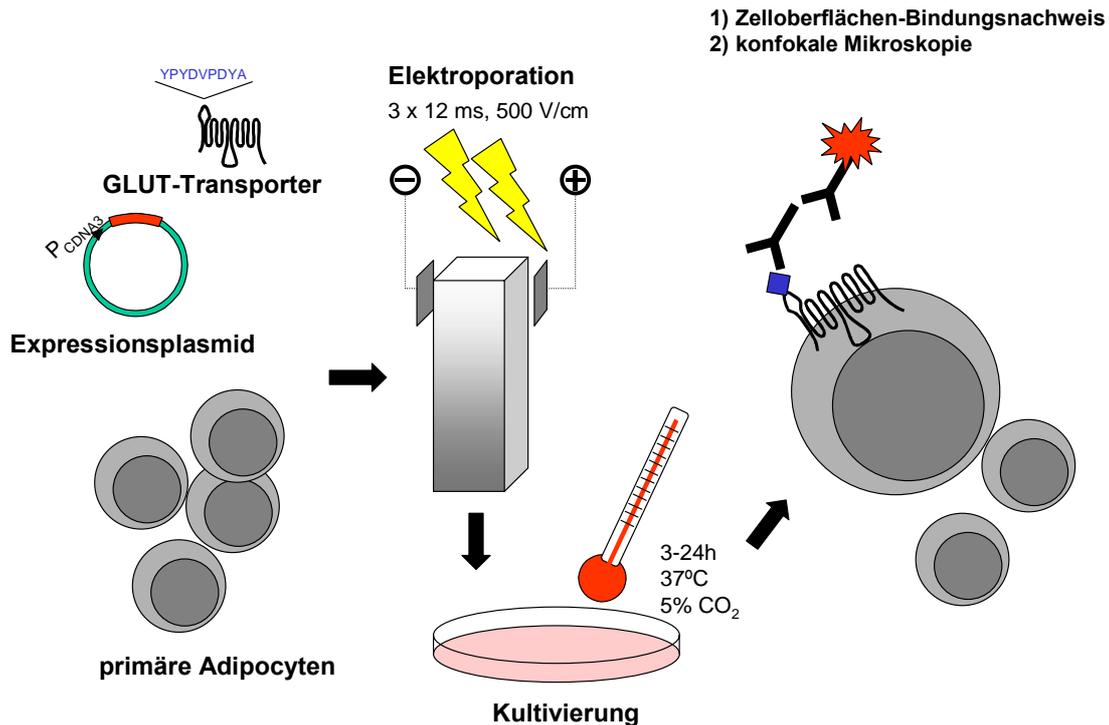


Abb. 1.3. Zelloberflächen-Bindungsanalyse von HA-GLUT-Transportern.

Die HA-GLUT-Transporter wurden in einen Expressionsvektor kloniert und zusammen mit intakten primären Ratten-Adipocyten [0,5µg DNA/Küvette; 200µl einer 40%igen Adipocytensuspension (~1x10⁶ Zellen)/Küvette] bei 500V/cm für 3x12msec elektroporiert. Nach Elektroporation erfolgte die Kultivierung für 3-24h bei 37°C, 5%CO₂. Der Zelloberflächen-Bindungsanalyse wurde mit den intakten geernteten Adipocyten durchgeführt. Die Adipocyten sind nach Zellernte für 30min ± 67nM Insulin stimuliert worden und danach erfolgte das Abstoppen des GLUT-Recyclings mit 2mM KCN. Zelloberflächenexponierte GLUT-Transporter konnten durch den (HA)-Epitopmarker mittels dem primären α-HA-Antikörper und dem sekundären radioaktiven ¹²⁵I-Antikörper (oder einem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper) detektiert werden. HA-Epitopmarker: YPYDVPDYA.

1.4.3. Das (LL)-Motiv

Dileucin-Motive werden als Internalisierungsmotive angesehen und sind in der Internalisierung und dem lysosomalen *Targeting* von mehreren Proteinen involviert (Heilker et al., 1999). Es ist nachgewiesen, dass der Wildtyp-GLUT8 in transfizierten *Xenopus-Oocyten*, HEK293T-Zellen und COS7-Zellen in intrazellulären Kompartimenten lokalisiert ist, und dass die Mutation des (LL)-Motivs zu Alanin (LL/AA) einen starken Anstieg der GLUT8-Zelloberflächenexpression zur Folge hatte (Ibberson et al., 2000). Al-Hasani et al konnten nachweisen, dass die Mutation des (LL)-Motivs im GLUT4-C-Terminus keinen signifikanten Einfluss auf die GLUT4-Translokation besaß.

Durch Mutation des (LL)-Motivs (LL/AA) im C-Terminus des Mannose-6-Phosphat-Rezeptors konnte demonstriert werden, dass das MPR-Recycling vom Plasmamembran/endosomalen-Kompartiment zum TGN gehemmt war. Nach weiteren Untersuchungen der (LL/AA)-MPR-Mutante wurde diskutiert, dass das (LL)-Motiv eine mögliche Funktion bei der Sortierung des MPR in die Endosomen besitzt (Tikkanen et al., 2000).

1.4.4. Die Dynamin-abhängige Endocytose

Dynamin ist eine 100kDa GTPase, die an der Endocytose einiger Membranproteine, wie z.B. Transferrin-Rezeptor, EGF-Rezeptor aber auch GLUT4 beteiligt ist (Vieira et al., 1996). Die Dynamin-Familie besteht aus neuronalem Dynamin-1, ubiquitärem Dynamin-2, Dynamin-3 und einer Anzahl von verwandten Proteinisoformen (Urratia et al., 1997).

Dynamin enthält eine aminoternale GTPase-Domäne, eine Pleckstrin-homologe Domäne, eine Coiled-coil-Region und eine C-terminale Prolin-reiche Sequenz (Warnock und Schmid, 1996). Es wird angenommen, dass Dynamin den letzten Schritt der Endocytose durch ein „Abschneiden“ der Clathrin-coated Vesikel sowie der Caveolin-Vesikel an der Plasmamembran katalysiert (Henley et al., 1999). Zusätzlich wird angenommen, dass Dynamin die Zielvesikel mittels der Prolin-reichen Sequenz bindet und durch Coiled-coil-Interaktion mit anderen Dynaminmolekülen eine sog. *Tube*-Helixstruktur an den Zielvesikeln ausbildet. Durch GTP-Hydrolyse bildet Dynamin nochmals eine weitere Windung um die *Tube*-Helixstruktur aus und kann somit die Vesikel von der Membran freisetzen (Sweitzer und Hinshaw, 1998).

Dynamin ist auch an dem synaptischen Vesikelrecycling und an der Vesikelformierung am trans-Golgi-Netzwerk beteiligt (Sweitzer und Hinshaw, 1998). Konfokale Mikroskopie-Untersuchungen mit GFP-(Green-Fluorescent-Protein)-Dynamin-2 haben eine signifikante Kolokalisation von GFP-Dynamin-2 mit dem TGN, γ -Adaptin und Clathrin nachgewiesen (Cao et al., 1998; Jones et al., 1998).

Die Überexpression von dominant-negativen Dynamin-Mutanten (z.B. Dynamin-1) kann effektiv die Endocytose in Säugerzellen blockieren (Van der Blik et al., 1993). Durch Untersuchungen einer temperatursensitiven *Drosophila melanogaster*-Mutante (*shibire ts*) konnte nachgewiesen werden, dass die restriktive Temperatur zu einer Lähmung der Fliege führt. Durch Untersuchungen dieser Mutation stellte sich heraus, dass die Lähmung auf ein vermindertes Recycling von synaptischen Vesikeln zurückzuführen war (Henley et al., 1999). Betrachtet man den molekularen Mechanismus des „gestörten“ Recyclings, dann ist demonstriert worden, dass Dynamin eine inaktivierende Mutation aufwies. Durch die Dynamin-Mutante konnte ein später Schritt in dem Clathrin-vermittelten Vesikel-*budding* nicht durchgeführt werden, so dass die Vesikel an der Plasmamembran verblieben.

Die GTPase Dynamin ist auch an der Endocytose von GLUT4 beteiligt. In mehreren Veröffentlichungen wurde beobachtet, dass die Koexpression einer dominant-negativen Dynamin-1 Mutante (K44A) die Internalisierung von GLUT4 inhibiert und zur Akkumulation des zellulären GLUT4-Vorrats auf der Plasmamembran führt (Obar et al., 1990; Urratia et al., 1997).

Die Dynamin-(K44A)-Mutante hemmt die Ausbildung nativer funktionsfähiger Dynamin-Helixstrukturen, und es kommt dadurch zu einer dominant-negativen Hemmung der GLUT-Endocytose an der Plasmamembran. Al-Hasani et al kotransfizierten HA-GLUT4 und Dynamin-(K44A) in primäre Adipocyten und bestimmten die HA-GLUT4-Zelloberflächenexpression. In basalen primären Adipocyten war die Plasmamembranexpression von HA-GLUT4 stark erhöht, wobei Insulinstimulierung keinen weiteren Effekt hatte (Al-Hasani et al., 1998).

Die Überexpression von Wildtyp-Dynamin beschleunigt die GLUT4-Endocytose, was vermuten lässt, dass die Dynamin-Aktivität der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der GLUT4-Endocytose in Adipocyten ist. Die GTPase-Aktivität von Dynamin wird durch verschiedene Stimuli reguliert, wie z.B. Phosphorylierung und Bindung an SH3- und PH-Domänen (Scaife und Margolis, 1997).

1.5. Mechanismus der GLUT4-Endocytose

Viele Plasmamembranproteine, z.B. in primären Adipocyten, werden durch Endocytose internalisiert. Die meisten dieser Proteine, wie auch GLUT4, besitzen eine lange Halbwertszeit und recyceln zwischen internen Kompartimenten und der Plasmamembran, was sie vor Proteindegradierung bewahrt (Mellman, 1996). Insulin stimuliert die GLUT4-Exocytose an der Plasmamembran, so dass GLUT4 mit der Plasmamembran fusionieren und Glucose transportieren kann. Um den Prozess des GLUT4-Recyclings zu verstehen, müssen die einzelnen Schritte der GLUT4-Exocytose und GLUT4-Endocytose untersucht werden. In eukarotischen Zellen benötigt die Formierung von Transportvesikeln die Interaktion von sog. *coat*-Proteinkomplexen mit speziellen Membranproteinen. Die *coat*-Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Selektion von Zielproteinen, sowie beim „Abschnüren“ (*budding*) von Plasmamembranvesikeln (Schmid, 1997). Zur Zeit sind vier verschiedene *coat*-Proteine (Clathrin, Caveolin, COP-1, COP-2) bekannt, die an unterschiedlichen Prozessen der Endocytose beteiligt sind. Caveolae stellen spezielle Plasmamembranbereiche in Adipocyten und Endothelzellen dar, die kein Clathrin enthalten (Peters et al., 1985; Anderson, 1993). In diesen speziellen Bereichen der Plasmamembran akkumuliert das interne Membranprotein Caveolin und bildet eine charakteristische Struktur aus (Peters et al., 1985; Rothberg et al., 1992). Es ist gezeigt, dass die Clathrin-coated Vesikel und die Caveolin-Vesikel an der Formierung von Plasmamembrantransportvesikeln mitwirken. Das COP-1-Protein ist an dem Vesikeltransport vom ER zum Golgi-Apparat und durch den Golgi-Membranstapel beteiligt (Whitney et al., 1995). Durch Ultrastrukturanalysen von Adipocyten konnte nachgewiesen werden, dass GLUT4 mit keinem der vier *coat*-Proteine lokalisiert ist (Simpson et al., 2001). Frühere Untersuchungen stellten jedoch die Hypothese auf, dass GLUT4 durch eine Clathrin-vermittelte Endocytose internalisiert wird. Somit ist der Mechanismus der GLUT4-Vesikelformation und Endocytose weitgehend unklar.

1.5.1. Beteiligung spezifischer Sortieradapterproteine an der GLUT4-Endocytose

Aus Untersuchungen des Membranprotein-Traffickings in Hefen, (polarisierten) Säugerzellen und dem rekonstituierten *in vitro*-Transport zwischen intrazellulären Kompartimenten, wurde ein Konzept zum Mechanismus des Vesikeltransports entwickelt. Danach interagieren Translokationssignale der zu transportierenden Proteine mit rezeptorähnlichen Erkennungsstrukturen der zellulären Sortiermaschinerie (Adapterproteine) (Habilitationssarbeit von Dr. Al-Hasani).

Die Translokationssignale bestehen aus kurzen Aminosäuresequenzen in den N- und/oder C-Termini der Membranproteine. Viele Membranproteine enthalten weiterhin multiple Signalsequenzen, deren Kombination und relative Anordnung bestimmend für den Transportweg der internalisierten Proteine sein kann (White et al., 1998). Das Phenylalanin-

5 (F5) im GLUT4-N-Terminus stellt eine Andockstelle für die Endocytose-Maschinerie dar. Al-Hasani et al konnten nachweisen, dass mehrere μ -Adaptin-Isoformen an das F5-Motiv im GLUT4-N-Terminus binden. Durch Mutation des F5 zu Alanin konnte die μ -Adaptinbindung aufgehoben werden. Im Gegensatz dazu ist die Bindung von μ 1 an den GLUT4-N-Terminus verstärkt worden, wenn F5 gegen Tyrosin ausgetauscht wurde (Al-Hasani et al., 2002).

Die 50 kDa μ -Adaptins sind Teil der ~300 kDa heterotetrameren Adapterproteine (APs). Diese sind involviert in der Transportvesikelformation. Zur Zeit sind vier Adapterproteinkomplexe identifiziert worden (AP-1 bis AP-4), die unterschiedliche Schritte des Zelltransportes vermitteln (Kirchhausen et al., 1997). Die cytoplasmatischen Membrandomänen mancher Membranrezeptorproteine enthalten eine Konsensussequenz YXX \emptyset ; (Y: Tyrosin; X: beliebige Aminosäure; \emptyset : großer hydrophober Rest), die als Bindungsstelle für μ 1, μ 2 und μ 3 von AP-1, AP-2 und AP-3 beschrieben wurde (Bonifacio und Dell'Angelica, 1999). Der N-Terminus von GLUT4 enthält das Motiv F5QQI, das *in vivo* mit μ -Adaptin von APs interagiert (Gillingham et al., 1999; Al-Hasani et al., 2002). Zusätzlich ist nachgewiesen worden, dass AP-1 und AP-2 auch an Clathrin binden können und somit ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Clathrin-vermittelten Transportprozess und der GLUT4-Translokation vermutet wurde.

Die von mir untersuchten neuartigen GLUT6- und GLUT8-Transporter enthalten im N-Terminus ein (LL)-Motiv, welches möglicherweise ein Targetingmotiv für μ -Adaptin-Untereinheiten darstellt.

Es konnte demonstriert werden, dass AP-1 und AP-2 auch an (LL)-Motive von Membranproteinen binden und somit an der Clathrin-vermittelten Endocytose aus dem trans-Golgi-Netzwerk (TGN) beteiligt sind (Kirchhausen et al., 1997). Der Transferrin-Rezeptor wird ebenfalls durch einen Clathrin-vermittelten Signalweg internalisiert. Dabei interagiert ein Tyrosin-Motiv (YTRF) des Transferrin-Rezeptors mit der μ 2-Adaptin-Untereinheit des AP-2-Proteins (Collawn et al., 1989 und 1993). Es wurde nachgewiesen, dass die Endocytose des Transferrin-Rezeptors inhibiert werden kann, wenn die Clathrin-vermittelte Endocytose gehemmt ist (Damke et al., 1994). Zusätzlich ist gezeigt, dass im Proteintransport zwischen dem TGN und dem ER spezifische *Targeting*-Signale (z.B. die ER-Konsensussequenz KKXX) durch das Coat-Protein COP-1 erkannt werden (Cosson und Letourneur, 1997).

1.5.2. Mechanismus der GLUT4-Vesikelfusionierung mit der Plasmamembran

Von zentraler Bedeutung für das Verständnis der hormonabhängigen Translokation von GLUT4 sind die molekularen Grundlagen der Proteinvesikeltranslokation, die nach Insulinstimulierung, analog zur Neurotransmittersekretion, mit der Plasmamembran fusionieren. Eine effektive Fusionierung der Plasmamembran mit den GLUT4-Vesikeln benötigt sog. SNARE-Proteine an den Donor- und Akzeptor-Membranen. Der insulinstimulierte Glucosetransport in Muskel- und Fettzellen beinhaltet die Translokation und Membranfusionierung von GLUT4-Vesikeln mit der Plasmamembran. Für die Membranfusionierung werden bestimmte Plasmamembranproteine, sog. tSNARE-Proteine (t = target) wie z.B. Syntaxin-4, SNAP-23 und spezielle Vesikelproteine (v-SNAREs, v = vesicle) wie z.B. VAMP2 benötigt (Bryant et al., 2002; Grusovin und Macaulay, 2003).

Mehrere Modelle postulieren, dass sich ein trans-SNARE-Komplex (t-SNARE/v-SNARE) zwischen zwei Membranen ausbilden muss, damit es zu einer Fusionierung der Membranen kommen kann. Die Formierung des SNARE-Komplexes kann möglicherweise zu einer strukturellen Änderung der Transmembranproteine führen, so dass sich die Membran krümmt (Chamberlain und Gould, 2002). In mehreren *in vitro*-Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass die Transmembrandomänen der SNARE-Proteine wichtig für die Membranfusion sind (McNew et al., 2000). Neuere Veröffentlichungen haben demonstriert, dass SNARE-Proteine wie z.B. Syntaxin-1A, SNAP-25 und VAMP2 mit speziellen, Cholesterol-reichen Membranregionen (Lipid-Rafts) assoziiert sind. Dabei führte die Abreicherung von Cholesterol in Membranen von z.B. PC12-Zellen zu einer verminderten regulierten Exocytoserate (Chamberlain et al., 2001; Lang et al., 2001).

1.6. Das GLUT4-Speicherkompartiment

Der post-Golgi-Proteintransport in das endosomale/lysosomale System kann im wesentlichen über drei Translokationswege erfolgen : 1. vom trans-Golgi-Netzwerk (TGN) zum intrazellulären Kompartiment (z.B. Lggs/Lamp) oder 2. indirekt über die Plasmamembran (Transferrin-Rezeptor) oder 3. durch beide Wege (Mannose-6-Phosphat-Rezeptor).

Für den GLUT4 wurde angenommen, dass die GLUT4-Vesikel direkt vom TGN in Speichervesikel sortiert bzw. transportiert werden. Diese Speichervesikel bilden vermutlich das GLUT4-Speicherkompartiment (Rea und James, 1997). Im Gegensatz dazu demonstrierten neuere Untersuchungen des GLUT4-Recyclings, dass neusynthetisierter GLUT4 nach dem TGN zuerst zur Plasmamembran transportiert wird. Von der Plasmamembran gelangt GLUT4 über das endosomale Kompartiment in die Speichervesikel. Das post-endosomale GLUT4-Speicherkompartiment wurde im wesentlichen über die Analyse von affinitätsgereinigten GLUT4-Vesikeln und immunohistochemische Untersuchungen in Adipocyten charakterisiert. Im Moment sind sieben Proteine bekannt, die mit den GLUT4-Vesikeln assoziiert sind (Rea und James 1997). Alle diese Proteine (außer IRAP, Insulin responsive aminopeptidase) sind ebenfalls in der sekretorischen Vesikeltranslokation von anderen Proteinen involviert. GLUT4 und IRAP sind die einzigen bekannten Proteinvesikel, die eine insulinstimulierbare Translokation zwischen der Plasmamembran und internen Kompartimenten durchführen. Die anderen Proteine sind nach Insulinstimulierung weiterhin mit internen Membranen assoziiert.

Die 165 kDa Aminopeptidase IRAP ist membranständig und das einzige bekannte Protein, das wie der GLUT4 eine insulinstimulierbare Translokation zwischen internen Kompartimenten und der Plasmamembran aufweist (Malide et al., 1997). Alle untersuchten Gewebe (außer Gehirn) exprimieren IRAP. IRAP besteht aus einer Transmembrandomäne und einem etwa 110 Aminosäuren langen cytoplasmatischen Anteil. Es wird angenommen, dass GLUT4 und IRAP gemeinsame Sortiersignale enthalten, die sie in das Speicherkompartiment leiten. Diese gemeinsamen Sortiersignale konnten jedoch noch nicht identifiziert werden, und Sequenzvergleiche der cytoplasmatischen Anteile beider Proteine ergaben, dass keine ausgeprägte Sequenzhomologie besteht.

1.6.1. GLUT4-Translokation zwischen dem trans-Golgi-Netzwerk (TGN) und dem endosomalen/lysosomalen Kompartiment

Der Proteintransport im sekretorischen und endocytotischen Weg von eukaryotischen Zellen wird durch vesikuläre Transportintermediate vermittelt. Das ist ein kontrollierter Prozess, in dem Transportproteine und Regulationsproteine mitwirken. Die molekulare Basis für die proteinspezifische Sortierung liegt ebenfalls in Sortierungssignalen (Aminosäuremotiven), die beim GLUT4 im C-terminalen und N-terminalen Bereich lokalisiert sind. Der Glucosetransporter 4 gelangt durch Endocytose in die Transportvesikel, die den GLUT4-Transporter über das endosomale Kompartiment zum Speicherkompartiment leiten.

Das endosomale System ist ein wesentlicher Schnittpunkt für die Proteinsortierung. Es setzt sich aus frühen und späten Endosomen zusammen, wobei im wesentlichen der pH-Wert im Lumen des Endosoms bestimmt, ob es sich um ein frühes oder spätes Endosom handelt. Frühe Endosomen werden als erste endosomale Vesikelformation nach der Endocytose (z.B. an der Plasmamembran) definiert (Marsh et al., 1983). Die primäre Aufgabe der frühen Endosomen ist, die Proteinsortierung im endocytotischen Signalweg durchzuführen. Frühe Endosomen werden zusätzlich als Ausgangsvesikel für die Formierung spezieller Recyclingendosomen angesehen. Durch Untersuchungen am Transferrin-Rezeptor wurde nachgewiesen, dass dieser zu 75% intrazellulär in perinuklearen Recyclingvesikeln lokalisiert ist (van der Sluijs et al., 1993). Einige dieser Recyclingendosomen können direkt mit der Plasmamembran fusionieren, während andere in die perinukleare Region wandern und dort mit dem Mikrotubuli-Organisationszentrum kolokalisieren (Hopkins et al., 1983; Yamashiro et al., 1984). Die frühen Endosomen werden zu späten Endosomen, und diese können zu Lysosomen umgewandelt werden. Späte Endosomen werden als Vesikelstrukturen definiert, die nach der Passage durch frühe Endosomen bestimmte Moleküle bzw. Proteine akkumulieren und konzentrieren. Zu diesen Proteinen gehört z.B. der Mannose-6-Phosphat-Rezeptor. Da späte Endosomen aktive hydrolytische lysosomale Enzyme enthalten, werden sie auch als pre-Lysosomen bezeichnet (Mellman, 1996). Lysosomen weisen einen sauren pH-Wert (pH~5) und eine Anreicherung von lysosomalen Enzymen (Proteinabbau-Enzyme) auf und dienen zum größten Teil dem Proteinabbau. Die lysosomalen Enzyme gelangen über Clathrin-vermittelten Vesikeltransport vom trans-Golgi-Netzwerk (TGN) durch Bindung an den Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (MPR) zu den Lysosomen (Mellman, 1996). Die GLUT4-Translokation vom endosomalen System zum Speicherkompartiment wird durch Protein-Protein-Interaktion bestimmt. Welche Proteine an dieser Translokation beteiligt sind, ist jedoch weitgehend unbekannt. Da GLUT4 eine wesentliche Rolle bei der Regulation der Glucoseaufnahme spielt und ein „Defekt“ in der GLUT4-Translokation zur Ausbildung von z.B. Typ-2 *Diabetes mellitus* führen kann, ist es wichtig, die GLUT4-interagierenden Proteine zu identifizieren. Im Rahmen meiner Doktorarbeit ist ein neuartiges 49 kDa-Protein (p49) isoliert worden, das an den GLUT4-N-Terminus bindet und einen Effekt auf die GLUT4-Zelloberflächenexpression von primären Adipocyten aufweist.

1.6.2. GLUT4-Translokationssignale im N- und C-Terminus

In Analogie zu den bekannten Sortiermechanismen von Membranproteinen wird angenommen, dass Adipocyten und Muskelzellen ein GLUT4-spezifisches Adapterprotein (Rezeptor) enthalten, das mit Determinanten (Translokationssignalen) von GLUT4 interagiert und die spezifische Translokation vermittelt. Bekannte Translokationssignale von Membranproteinen bestehen meist aus kurzen (2-5 Aminosäuren) Signalsequenzen in den cytoplasmatischen Anteilen der Proteine (White et al., 1998; Kirchhausen et al., 1997) (Tab. 1.4.).

Eine Reihe von Arbeitsgruppen hat in der Vergangenheit Untersuchungen durchgeführt, die zum Ziel hatten, *Targeting*-Motive im GLUT4 zu identifizieren (Tab. 1.4.). Frühere Arbeiten zur Identifizierung von *Targeting*-Sequenzen im GLUT4 wurden mit GLUT1/GLUT4- oder GLUT4/Transferrinrezeptor-Chimären in heterologen Zellsystemen (NIH-3T3-Fibroblasten, *Xenopus laevis*-Oocyten, CHO- und COS-Zellen) durchgeführt (James et al., 1993). In diesen Zellen führt die Expression von GLUT4 (wie in Adipocyten) zur intrazellulären Retention des Proteins, während sich GLUT1 überwiegend auf der Plasmamembran befindet. Eine adäquate, insulinstimulierbare Translokation von GLUT4 zur Plasmamembran findet jedoch nicht statt. Deshalb, und aufgrund der z.T. widersprüchlichen Ergebnisse sind diese Arbeiten umstritten. Es gilt mittlerweile als akzeptiert, dass das GLUT4-*Trafficking* nur sinnvoll in insulinempfindlichen Zellen, d.h. Fett- und Muskelzellen studiert werden kann.

Zwei Arbeitsgruppen haben die Funktion von *Targeting*-Motiven des GLUT4 in kultivierten insulinempfindlichen 3T3-L1-Adipocyten untersucht. In einer Studie (Verhey et al., 1995) wurde die subzelluläre Verteilung von GLUT1/GLUT4-Chimären mittels immunhistochemischer Methoden untersucht. Die Autoren kamen zum Schluss, dass der N-Terminus des GLUT4 Sequenzen für die Internalisierung enthält während der C-Terminus für die Sortierung in das GLUT4-Speicherkompartiment verantwortlich ist. Das Dileucin-Motiv (LL^{489/90}) im C-Terminus sollte keine Rolle im GLUT4-Recycling spielen. In der anderen Studie (Marsh et al., 1995; Araki et al., 1996) wurde das Recycling von zwei GLUT4-Mutanten durch subzelluläre Fraktionierung untersucht. Demnach führt die Mutation des Phenylalanin-Motivs (F⁵QQI) im N-Terminus zur Akkumulation von GLUT4 auf der Plasmamembran (Mueckler et al., 1994). Der gleiche Effekt wurde auch für das Dileucin-Motiv im C-Terminus beschrieben, jedoch nur bei starker Überexpression des Proteins. Da beide GLUT4-Mutanten noch eine insulinstimulierbare Translokation zeigten wurde gefolgert, dass keines der beiden Motive am insulinabhängigen Recycling von GLUT4 beteiligt ist.

Zu einer ähnlichen Schlussfolgerung kamen Untersuchungen aus der eigenen Arbeitsgruppe. Die Mutation des C-terminalen Dileucin-Motivs im GLUT4 oder gar die Deletion des gesamten GLUT4-C-Terminus hatte keinen Effekt auf die insulinstimulierbare Translokation des GLUT4 in Ratten-Adipocyten (Al-Hasani et al., 2002). Wurde hingegen das N-terminale Phenylalanin-5-enthaltende Motiv mutiert, kam es zur Akkumulation des GLUT4 auf der Plasmamembran (Al-Hasani et al., 2002).

Manche Publikationen demonstrierten jedoch, dass sowohl die Mutation des Phenylalanins-5 (F5), als auch eine Mutation im (LL)-Motiv von GLUT4, die insulinstimulierbare

Translokation der GLUT4-Mutanten beeinflussten. Die Gründe für die z.T. widersprüchlichen Schlußfolgerungen aus den Studien sind wohl in den unterschiedlichen Proteinkonstrukten, Zellsystemen und den verwendeten Transfektionsmethoden (viral, transient *versus* permanent) zu suchen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die Sequenzen für das *Targeting* von GLUT4 in das intrazelluläre Speicherkompartiment unbekannt sind. Die eindeutige Identifizierung von *Targeting*-Sequenzen in GLUT4/IRAP sollte durch die Übertragung dieser Sequenzen in heterologe Proteine erfolgen. Diese modifizierten Reporterproteine sollten dann in das insulinsensitive Speicherkompartiment sortiert und nach Insulinstimulierung auf die Plasmamembran transloziert werden.

<i>Literatur</i>	<i>Zell-System</i>	<i>Mutanten</i>	<i>Motive</i>	<i>Funktion</i>
Czech 1993	COS7	G1/G4	CT	Retention
Birnbaum 1993	3T3-L1	G1/G4	CT	gerichtete Translokation
Birnbaum 1994	3T3-L1	G1/G4	CT (LL)	gerichtete Translokation
McGraw 1996	CHO	Tf/G4-CT	CT (LL)	Internalisierung
Mueckler 1995	L6	G1/G4	CT (LL)	gerichtete Translokation
Birnbaum 1995	3T3-L1- Adipocyten	G1/G4	NT, CT	NT:Retention, CT: gerichtete Translokation
Kasuga 1996	CHO	G4	NT, CT (FA, LL)	NT: Internalisierung CT: Retention
Ebina 1995	CHO, 3T3-L1	G1/G4	NT, Loop, CT	gerichtete Translokation
James 1995	3T3-L1- Adipocyten	G4	NT, CT (FA, LL)	gerichtete Translokation
Piper 1992	CHO	G4	NT (FA)	Retention
McGraw 1994	CHO	Tf/G4	NT	Internalisierung
Oka 1992	CHO	G1/G4	TM7-8	gerichtete Translokation
Jung 1997	Ratten-Adipocyten	G4-CT Peptide	CT	Retention
Al-Hasani et al. 2001	Ratten-Adipocyten	G4/G4-CT- Deletionsmutanten	CT (LL, Δ 28, Δ 37) NT (F5A)	gerichtete Translokation

Tab. 1.4. Translokationssignale im N- und C-Terminus von GLUT4 (bzw. GLUT1).

Die Tabelle weist auf die Literatur hin, in der die Translokationssignale im GLUT4-N- und C-Terminus untersucht wurden. Dargestellt sind die Literaturangaben, das untersuchte Zellsystem, die hergestellten Mutanten, die identifizierten Motive im N- und C-Terminus sowie die jeweilige Funktion. G1, GLUT1; G4, GLUT4; Tf, Transferrin-Rezeptor; CT, C-Terminus; NT, N-Terminus; COS7, Affen-Zelllinie; 3T3-L1, Adipocyten-Zelllinie; CHO, Chinesische Hamster Ovarien-Zelllinie; L6, Muskel-Zelllinie.

1.7. Das Hefe-Two-Hybrid-System

Als Methode zur Identifizierung möglicher GLUT4-bindender Proteine, wurde das Hefe-Two-Hybrid-System gewählt. Das Hefe-Two-Hybrid-System dient zur Identifizierung von Protein-Protein-Wechselwirkungen in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Es basiert darauf, dass der Hefe-Transkriptionsfaktor GAL4 in zwei autonome Domänen (modulartig, aus zwei funktionellen Untereinheiten) zerlegt werden kann: Die DNA-Bindungsdomäne (BD) und die Aktivierungsdomäne (AD) (Abb.1.5.). Die DNA-Bindungsdomäne bindet an den Promotor, während die Aktivierungsdomäne mit der RNA-Polymerase interagiert. Werden nun Fusionsproteine von (BD) und (AD) hergestellt, deren Fusionsanteile

aneinander binden, dann wird ein aktiver Transcriptionsfaktor rekonstituiert, der die Aktivierung von nachgeschalteten Hefe-Reportergenen (i.d.R. HIS3→Histidin-Auxotrophie; und LacZ→β-Galaktosidase-Aktivität) bewirkt (Abb.1.5.). Das Hefe-Two-Hybrid-System nutzt somit die Aktivierung der Expression spezifischer Reportergene, durch den rekonstituierten Transkriptionsfaktor, als Detektor für die Protein-Protein-Wechselwirkungen. (BD)-Fusionsproteine nennt man Köder (*bait*), AD-Fusionsproteine werden als Beute (*prey*) bezeichnet. Im Hefe-Two-Hybrid-System werden Hefen mit (BD)- (bekannte cDNA) und (AD)-Konstrukten kotransfiziert. Anschließend analysiert man die Aktivierung beider Reportergene, HIS3 und LacZ. Positive Klone (His⁺/LacZ⁺) wachsen auf His⁻-Medium und enthalten β-Galaktosidase-Aktivität, die sich durch diverse Farbreaktionen nachweisen lässt (s. Methoden/Abschnitt 4.4.). Um im Hefe-Two-Hybrid-System nach neuen regulatorischen GLUT4-NT-Bindeproteinen zu suchen wurde von Dr. Al-Hasani, ausgehend von poly-A⁺-RNA aus isolierten, epidymalen Ratten-Adipocyten eine cDNA-Bank hergestellt, amplifiziert (oligo(dT)+*random primed*) und charakterisiert. Die Bank basierte auf dem GAL4-AD-Vektor pGAD10 (Clontech) und enthielt 2.5x10⁶ unabhängige Klone. Die durchschnittliche Insertgröße betrug 1.5 kBp. Das untersuchte GAL4-BD-Plasmid war der pGBT9-GS-GLUT4-N-Terminus (GS-Linker + vollständiger GLUT4-N-Terminus; 24 Aminosäuren). Die Screens wurden von Dr. Al-Hasani mit dem Hefestamm *Saccharomyces cerevesiae* HF7c durchgeführt, wobei die Hefetransfektion sequentiell durch die PEG/Li-Acetat-Methode erfolgte. Es wurde eine Transfektionsrate von >10⁴ cfu (*colony forming units*)/μg DNA erreicht und es sind 2x10⁶ cfu screens durchgeführt worden, wobei unabhängig 2 positive His⁺/LacZ⁺-Klone (identisch, 500bp, p19-Proteinfragment) identifiziert und isoliert werden konnten.

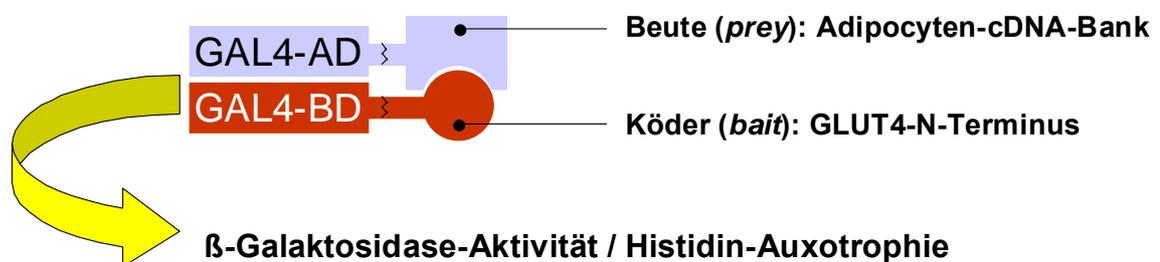


Abb. 1.5. Aktivierung der β-Galaktosidase-Aktivität durch die GAL4-Aktivierungsdomäne und die GAL4-Bindungsdomäne im Hefe-Two-Hybrid-System.

Durch Protein-Protein-Wechselwirkung können die GAL4-Aktivierungsdomäne und die GAL4-Bindungsdomäne miteinander interagieren und somit die nachgeschalteten Hefe-Reportergene (LacZ → β-Galaktosidase-Aktivität oder His3 → Histidin-Auxotrophie) aktivieren. GAL4, Hefe-Transcriptionsfaktor; AD, Aktivierungsdomäne; BD, Bindungsdomäne.

1.8. Fragestellung meiner Doktorarbeit

1. Die zentrale Fragestellung meiner Doktorarbeit war, dass HA-GLUT6/8-Recycling in primären Ratten-Adipocyten zu untersuchen. Folgende, bisher nicht geklärte Teilbereiche habe ich dabei vorrangig untersucht:

- Können GLUT6 und GLUT8 in primären Adipocyten recyceln?
- Welche Rolle spielen GLUT6 und GLUT8 beim insulinregulierten Glucosetransport im Hinblick auf die GLUT4-*null*-(*knockout*) Maus in Adipocyten? Kann GLUT8 den GLUT4-Effekt in GLUT4-*null* Mäusen kompensieren?
- Es sollte eine mögliche Insulinstimulierung bzw. Stimulierung durch unterschiedliche GLUT4-Stimuli, des vermuteten HA-GLUT6/8-Recyclings untersucht werden.

2. Um die Regulation des hormoninduzierten GLUT4-Recyclings zu untersuchen, konnte zusätzlich mit Hilfe des Hefe-Two-Hybrid-Systems ein neuartiges GLUT4-Bindeprotein (p49) isoliert und charakterisiert werden.

- Welche Funktion hat p49 beim GLUT4-Recycling in Adipocyten?

2. Ergebnisse

2.1. Identifizierung und Charakterisierung eines neuartigen GLUT4-Bindeproteins

2.1.1. Identifizierung und Charakterisierung des neuartigen p49-Proteins im Hefe-Two-Hybrid-System

Die GLUT4-Isoform unterliegt einem hormonregulierten Recycling zwischen internen Membran-Kompartimenten und der Plasmamembran. Es gilt als gesichert, dass im Verlauf des Recyclings spezifische *Targeting*-Signale im GLUT4 mit rezeptorähnlichen Erkennungsstrukturen der zellulären Sortiermaschinerie (Adapterproteine) interagieren. Die bisher bekannten *Targeting*-Signale bestehen aus kurzen Aminosäuresequenzen (2-7 Aminosäuren), die in den cytoplasmatischen Anteilen von Membranproteinen lokalisiert sind. Viele Membranproteine enthalten weiterhin multiple Signalsequenzen, deren Kombination und relative Anordnung bestimmend für den Transportweg der internalisierten Proteine sein kann (White et al., 1998). Al-Hasani et al. wiesen 2001 nach, dass der GLUT4-N-Terminus (GLUT4-NT) ein wichtiges *Targeting*-Signal enthält. Es wurde demonstriert, dass das N-terminale Phenylalanin-5-enthaltende „FQQI“-Motiv an der GLUT4-Internalisierung von der Plasmamembran beteiligt ist. Im Gegensatz dazu konnte in der Studie keine wesentliche Rolle des GLUT4-C-Terminus beim GLUT4-Recycling in primären Ratten-Adipocyten nachgewiesen werden. In diesen Versuchen hatten weder ein C-terminales (LL)-Motiv (LL489/90-Motiv) noch zwei C-terminale Deletionen ($\Delta 37$ und $\Delta 28$) einen signifikanten Einfluss auf die GLUT4-Translokation in Adipocyten (Al-Hasani et al., 2001). Im Projekt ist untersucht worden, ob der GLUT4-NT zusätzlich zum FQQI-Motiv weitere *Targeting*-Motive enthält, die mit regulatorisch wirkenden Proteinen interagieren. Um regulatorische Proteine zu identifizieren, die mit dem GLUT4-N-Terminus interagieren, wurden in Hefe-Two-Hybrid *screens* eine Adipocyten-cDNA-Bank mit dem GLUT4-NT als Köder (*bait*) nach GLUT4-bindenden Proteinen durchsucht.

Im Hefe-Two-Hybrid-System können Protein-Protein-Wechselwirkungen untersucht werden. Es basiert darauf, dass der Hefe-Transskriptionsfaktor GAL4 in zwei autonome Domänen zerlegt werden kann: Die DNA-Bindungsdomäne (BD) bindet an den Promotor, die Aktivierungsdomäne (AD) bindet die RNA-Polymerase. Werden nun Fusionsproteine von BD und AD hergestellt, deren Fusionsanteile aneinander binden, dann wird ein aktiver Transskriptionsfaktor rekonstituiert, der die Aktivierung von nachgeschalteten Hefe-Reportergenen (z.B. HIS3→Histidin-Auxotrophie und LacZ→ β -Galaktosidase-Aktivität) bewirkt. BD-Fusionsproteine nennt man Köder (*bait*), AD-Fusionsproteine werden als Beute (*prey*) bezeichnet.

Durch die Untersuchungen im Hefe-Two-Hybrid-System konnten in Zusammenarbeit mit Dr. Al-Hasani mehrere GLUT4-NT-bindende Klone aus der Adipocyten-cDNA-Bank isoliert und partiell charakterisiert werden. Die Sequenzierung eines interagierenden Klons ergab, dass es sich um ein 500bp cDNA-Fragment eines bisher unbekanntes Gens handelt (Abb. 2.1A). Die cDNA kodiert für ein 19 kDa Proteinfsegment (p19), das als GAL4-Fusionsprotein in Hefen spezifisch an den GLUT4-N-Terminus bindet.

Mit Hilfe von Sequenzvergleichen in Genbank konnte anschließend die Volllängen-Sequenz der entsprechenden cDNA rekonstruiert werden. Die entsprechende RNA kodiert für ein 49 kDa Protein (p49) mit unbekannter Funktion. Das aus den Two-Hybrid-*screens* isolierte Fragment, p19, umfasst den größten Teil der N-terminalen Hälfte von p49 (Abb. 2.1A).

Die Volllängen-cDNA von p49 wurde schließlich aus einer Mausgehirn-cDNA-Präparation mit Hilfe der PCR-Technik kloniert. Für die PCR-Amplifikation wurde die PCR-Polymerase (Pfu) von Stratagene benutzt und es wurden 30 Amplifikationszyklen gewählt. Danach konnte p49 aus einem 1%igen Agarosegel mit dem *QIAquick-PCR-Purification-Kit* gereinigt werden.

Die DNA- und Proteinsequenz von p49 ist in Abb. 2.1C dargestellt.

p49 kommt nach dem derzeitigen Stand der Datenbank nur in Säugern (im Mensch, Ratte, Maus, Rind und Schaf) vor. Die cDNA-Sequenz besitzt jedoch keine signifikante Homologie zu Säugergenen mit bekannter Funktion. Auffällige Sequenzmerkmale von p49 sind 1) hoher isoelektrischer Punkt ($pI = 9.5$), 2) eine Spezies-konservierte Prolin-reiche Region im C-Terminus (mögliche Bindestellen für SH3-Domänen) und 3) drei vorhergesagte (Lupas-Algorithmus) Coiled-coil-Regionen in der N-Terminalen Hälfte des Proteins (Abb. 2.1A).

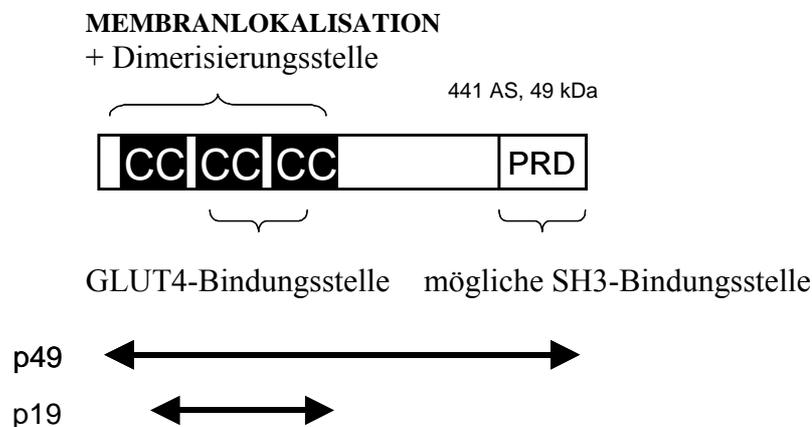


Abb. 2.1A. Organisation der Domänen im p49-Protein.

Das p19-Proteinfragment wurde aus dem Hefe-Two-Hybrid-System isoliert. Das Volllängen-p49-Protein wurde aus einer Mausgehirn-cDNA-Bank kloniert und gereinigt. PRD, Prolin-reiche Region (PxxP); CC, Coiled-coil-Regionen; AS, Aminosäuren.

Die höchste Sequenzhomologie (73%) zu Maus-p49 wies ein Protein (Protein Gi-Acc.-Nr.: 16554014) aus *H. sapiens* auf. Zusätzlich sind Sequenzhomologien des p49-Proteins mit Proteinen aus *Saccharomyces cerevisiae* (*Uso1p*; 39%), *Caenorhabditis elegans* (F18C12.3p; 40%) und *Drosophila melanogaster* (*Rbl1p*; 38%) gefunden worden (Tab. 2.1B).

Spezies	Protein gGi-Acc.- Nr.	Name	Länge (AS)	Identität	Homologie	Lücken (Gaps)
<i>H. sapiens</i>	16554014	-	427	66 % (282/426)	73 % (314/426)	0 % (2/426)
<i>D.melanogaster</i>	17137102	Rbl1	463	21 % (95/438)	38% (171/438)	10 % (45/438)
<i>C.elegans</i>	17506701	F18C12.3	545	22 % (100/451)	40 % (183/451)	10 % (48/451)
<i>S. cerevisiae</i>	6320145	Uso1	1790	17 % (75/426)	39 % (169/426)	10 % (43/426)

Tab.2.1B. p49-Sequenzhomologe Proteine in *Human*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster*.

Die Tabelle demonstriert Proteine, die eine Protein-Sequenzhomologie mit dem p49-Protein aufweisen. Es sind die Protein-Nr., die Proteinnamen, die Proteinlänge in Aminosäuren (AS), die Identität, die Homologie und die Lücken (*Gaps*) in Prozent (%) dargestellt. In Klammern sind die jeweiligen (p49/Protein)-Aminosäurebereiche abgebildet, die miteinander verglichen wurden.

Vollängen-p49-Sequenz

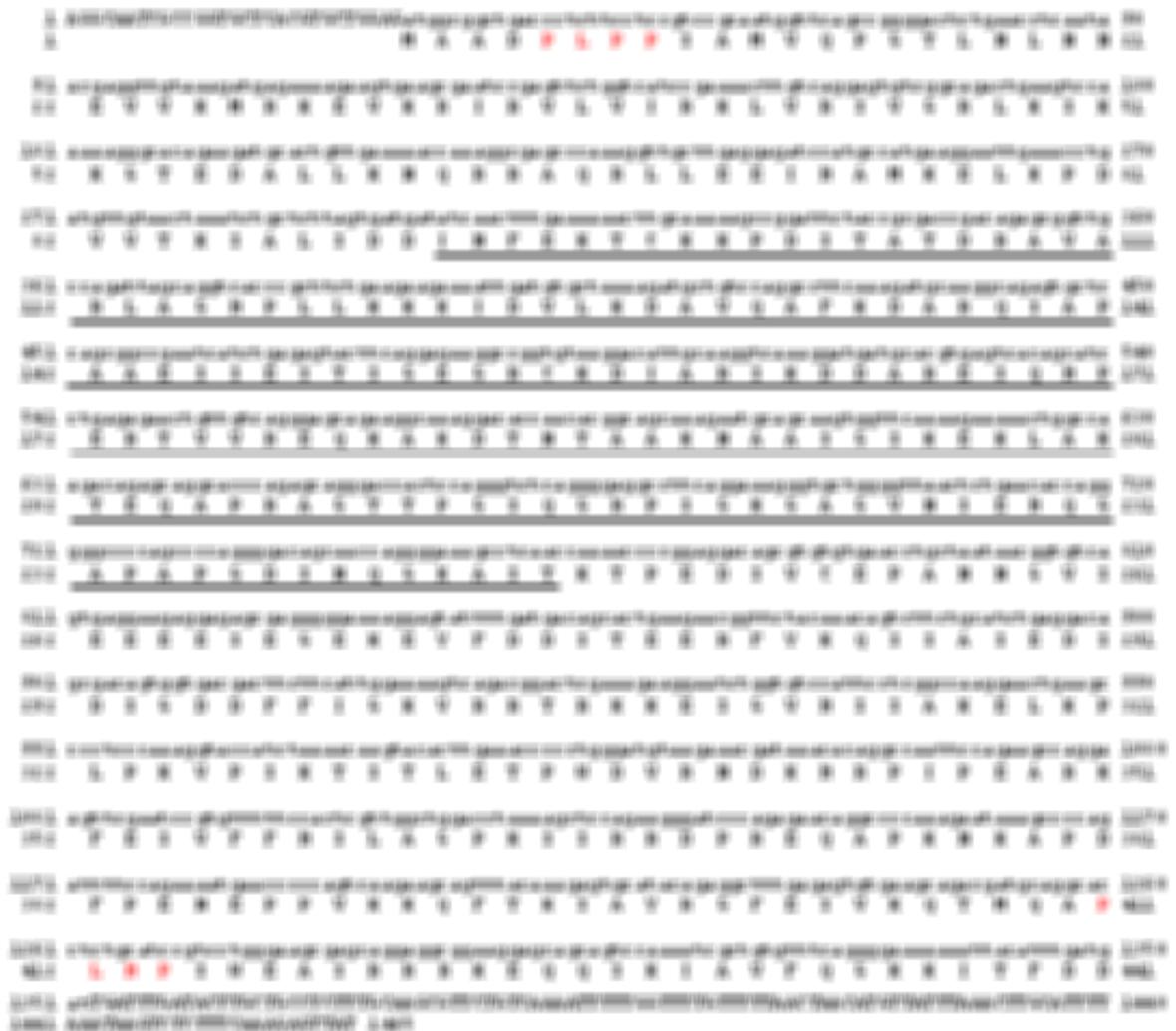


Abb. 2.1C. Sequenz von p49.

Es ist die Aminosäure- und Basen-Sequenz dargestellt. Die im Hefe-Two-Hybrid-System identifizierte p19-Sequenz ist unterstrichen. Die Prolin-reiche Sequenz ist durch „rote“ Aminosäuren markiert (PXXP).

In Zusammenarbeit mit Frau Prof. Schürmann (RWTH Aachen) wurden p49-mRNA-Signale im Gehirn, Testis, Skelettmuskel und Fettgewebe von Mäusen detektiert (Daten nicht gezeigt).

2.1.2. Das p49-Protein bindet an GLUT4 *in vitro*

Um zu untersuchen, ob p49 und p19 auch *in vitro* an den GLUT4 binden können, wurden zunächst GST-(Glutathion-S-Transferase)-Fusionsproteine für p19 und p49 kloniert, in *E.coli* exprimiert und anschließend durch Affinitätschromatographie an immobilisiertem Glutathion gereinigt. Die isolierten GST-Fusionsproteine wurden anschließend an Glutathion-Sepharose™4B-Matrix immobilisiert und für mehrere Stunden mit GLUT4-haltigen, Detergenz-solubilisierten Ratten-Fettzellen (1% Thesit) inkubiert. Nach mehrfachem waschen der Matrix mit PBS-Puffer konnten die gebundenen Proteine durch

Zugabe von 5xSDS-Probenpuffer eluiert und in der SDS-Elektrophorese aufgetrennt werden. Der Nachweis von gebundenem GLUT4 erfolgte im Westernblot (ECL-Westernblot-Analyse) mit einem polyklonalen α -GLUT4-Antikörper (Abb. 2.2).

Sowohl p49 als auch p19 präzipitierten als GST-Fusionsprotein nativen GLUT4 aus Fettzellen (Abb. 2.2). Die Abbildung demonstriert weiterhin, dass die Bindung des Volllängen-p49-Proteins an GLUT4 stärker ist als die des p19-Proteinfragmentes. Entsprechend den Ergebnissen aus den Two-Hybrid-Experimenten konnte somit demonstriert werden, dass p49 und p19 als GST-Fusionsproteine ebenfalls an GLUT4 binden.

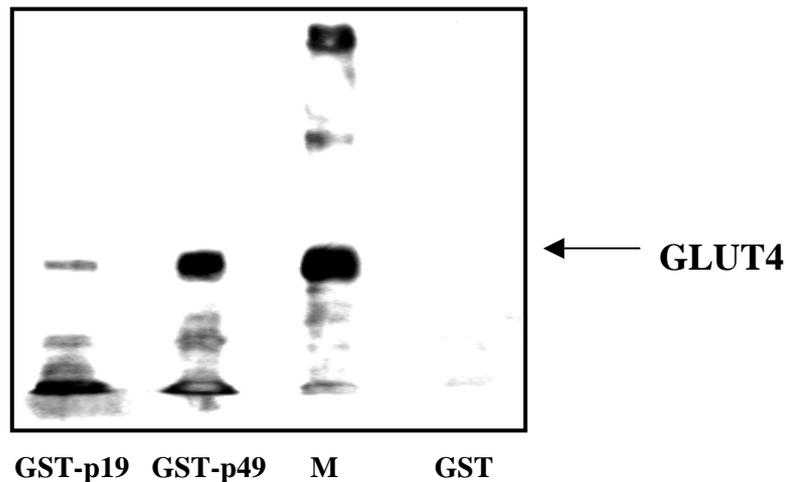


Abb. 2.2. Bindung von p19 und p49 an GLUT4.

Gezeigt ist der Westernblot eines GST-*pull-down* Experiments. GST-p19 und GST-p49 wurden an GSH-Sepharose immobilisiert und mit solubilisierten Ratten-Adipocyten-Membranen inkubiert. Nach SDS-PAGE der gewaschenen Komplexe wurde gebundenes GLUT4 mittels Westernblot identifiziert. Als Antikörper diente α -GLUT4-Antikörper. M, Adipocyten-Kontrollmembranen (10%); GST, Glutathion-S-Transferase.

2.1.3. GST-GLUT4-NT bindet p49 *in vitro*

P49 bindet als GST-Fusionsprotein an den nativen GLUT4 aus Fettzellen. Um nun zu untersuchen, ob p49 mit dem GLUT4-NT *in vitro* interagiert, wurde ein GST-GLUT4-N-terminales Fusionsprotein hergestellt. Dabei wurde der GLUT4-N-Terminus in den pGEX-3X-Vektor kloniert und in *E.coli DH5 α* exprimiert. Nach Proteinexpression erfolgte die Reinigung mittels Affinitätschromatographie und einer Glutathion-SepharoseTM4B-Matrix. Die Aminosäuresequenz des GST-GLUT4-NT-Konstrukts ist :

GST-GLUT4-NT: GST-MPSGFQQIGSEDPQQRVTGTL

Der gereinigte GST-GLUT4-N-Terminus wurde anschließend kovalent an Affigel-10 gekoppelt und danach mit ansteigender p49-Proteinkonzentration inkubiert. Affigel-10 (BioRad), enthält N-Hydroxysuccinimid (NHS)-aktivierte *Spacer*-Gruppen, die kovalent und irreversibel an freie Aminogruppen in Proteinen addieren. Der GLUT4-N-Terminus

enthält jedoch keine freie Aminogruppe, so dass nur der GST-Anteil des Fusionsproteins an das Affigel-10 binden sollte. Damit wäre gewährleistet, dass der GLUT4-N-Terminus nicht mit dem Affigel-10 interagieren kann und daher die Interaktion mit p49 stattfindet.

Vor Proteinkopplung wurde Affigel-10 mit Kopplungspuffer (50mM Hepes, pH 7.5, 200mM KCl) gewaschen und in Eppendorfgefäße überführt. Danach erfolgte eine 30-minütige GST-GLUT4-NT-Kopplung (Konzentration 3 mg/ml) und die Absättigung noch vorhandener Affigel-10-Reaktionsgruppen mit 50mM Ethanolamin. Um die Kopplungsreaktion zu überprüfen, wurde die GST-GLUT4-NT-Proteinkonzentration im Überstand mit der Bradford-Reaktion bestimmt. Demnach betrug die Koppelungsrate nach 30 min bereits > 85 Prozent.

Durch dieses Verfahren konnte GST-GLUT4-NT spezifisch immobilisiert und mit ansteigender p49-Proteinkonzentration inkubiert werden. Die konzentrationsabhängige Bindung des p49-Proteins an immobilisierten GST-GLUT4-N-Terminus wurde durch die ECL-Westernblotanalyse (ECL-Westernblot-Analysesystem von *Amersham Bioscience*) nachgewiesen. Als primärer Antikörper diente α -GST-Antikörper und der sekundäre Antikörper war ein Peroxidase-gekoppelter polyklonaler α -Kaninchen-Antikörper.

Abbildung 2.3 demonstriert eine sigmoidale p49/GST-GLUT4-NT-Sättigungskurve, wobei die p49-Bindung an den GST-GLUT4-N-Terminus bei einer p49-Konzentration von $\geq 0,5$ nmol/pro Ansatz beginnt und bei einer p49-Konzentration von $\geq 2,5$ nmol/pro Ansatz in die Sättigung gelangt (Abb. 2.3). Vermutlich interagiert das p49-Protein als Dimer oder als Multimer mit dem GLUT4-NT, was sich in der beobachteten sigmoidalen Sättigungskurve widerspiegelt.

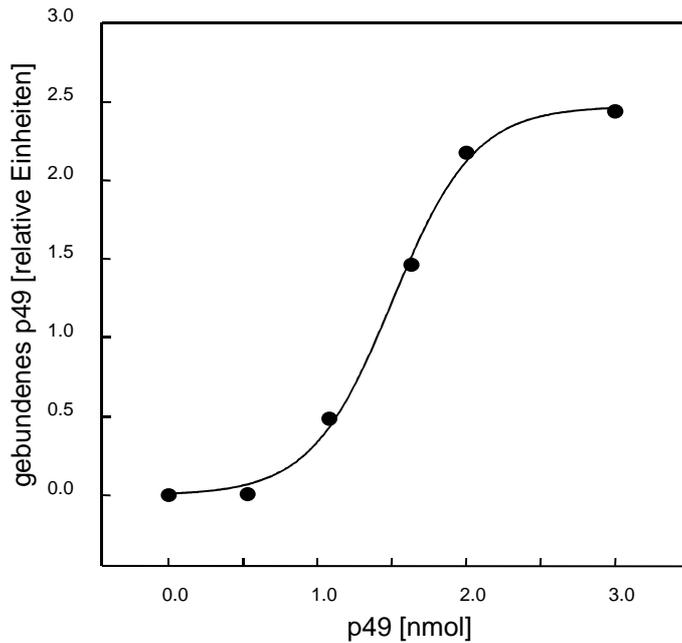


Abb. 2.3. Konzentrationsabhängige Bindung von GST-p49 an den immobilisierten GLUT4-N-Terminus.

Der 24 Aminosäuren lange GLUT4-N-Terminus wurde an Affigel-10 immobilisiert. Die Bindung von rekombinantem GST-p49 wurde durch Westernblot mit einem α -GST-Antikörper untersucht. GLUT4-NT, GLUT4-N-Terminus.

Nachdem demonstriert werden konnte, dass p49 spezifisch, d.h. sättigbar an den GLUT4-N-Terminus bindet, wurde die p49-Lokalisation in transfizierten Hela-Zellen untersucht.

2.1.4. p49-Expression in Hela-Zellen

Der stark basische pI (9.5) von p49 könnte als Hinweis auf eine nukleäre Lokalisation gewertet werden. Eine wichtige Voraussetzung für eine mögliche biologische Funktion der p49/GLUT4-Interaktion ist jedoch das Vorkommen beider Proteine im gleichen Kompartiment der Zelle. Im Versuch sollte deshalb zunächst bestimmt werden, ob p49 im Cytosol, assoziiert mit Membranen oder im Kern exprimiert wird. Die Lokalisation von p49 wurde durch konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie zunächst in transfizierten Hela-Zellen untersucht, da diese besonders leicht zu transfizieren sind. Die Arbeiten fanden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Matsumoto (Arbeitsgruppe S. Cushman, *National Institute of Health*, Bethesda, USA) statt. Um p49 und p19 in Hela-Zellen durch einen Antikörpernachweis zu detektieren, sind beide Proteine in den pCMV-*myc*-Expressionsvektor kloniert worden. Dabei wurden p49 und p19 nach Restriktionsverdau mit der Restriktionsendonuklease BglIII in den mit BglIII geschnittenen pCMV-*myc*-Expressionsvektor ligiert. Die *myc*-Konstrukte sind mittels Restriktionsverdau mit der Restriktionsendonuklease BglIII verifiziert worden. Der *myc*-Epitopmarker ist im N-Terminus beider Proteine lokalisiert.

Durch Anwendung der konfokalen Immunfluoreszenzmikroskopie wurden die *myc*-epitopmarkierten *myc*-p19- und *myc*-p49-Proteinlokalisationen in transfizierten Hela-Zellen

untersucht. Die transfizierten Zellen wurden für ca. 16h bei 37°C, 5%CO₂ kultiviert und danach fixiert. Der *myc*-Epitopmarker konnte mit dem primären monoklonalen α -*myc*-Maus-Antikörper und dem sekundären polyklonalen Texas-rot-konjugierten Affen- α -Maus-Antikörper detektiert werden. Abbildung 2.4 zeigt 25 übereinandergelegte (verschiedene Tiefen-Ebenen der Zelle) Fluoreszenzbilder (25 Z-Ebenen; ganze Hela-Zellen).

Es konnte nachgewiesen werden, dass *myc*-p19 und das *myc*-Volllängenprotein außerhalb des Nukleus, im Cytoplasma, lokalisiert sind (Abb. 2.4.). Somit ist aufgrund der Kompartimentierung p49 zumindest theoretisch in der Lage *in vivo* mit endogenem GLUT4 zu interagieren.

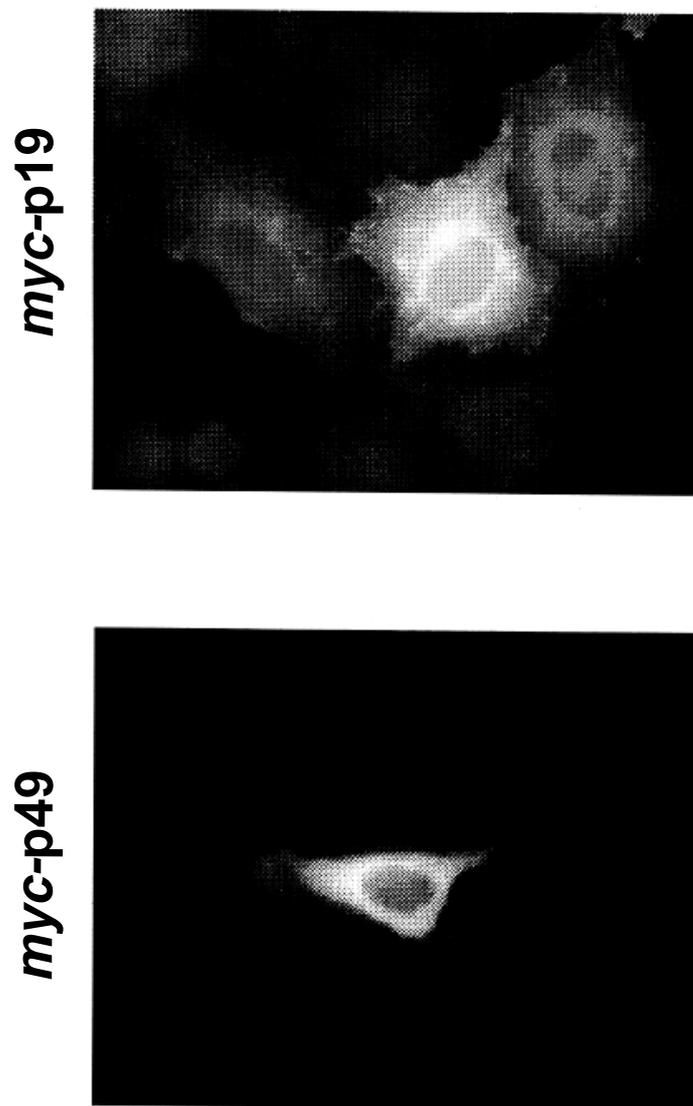


Abb. 2.4. Subzelluläre *myc*-p19- und *myc*-p49-Verteilung in HeLa-Zellen.

HeLa-Zellen wurden mit *myc*-markiertem p19 und p49 (5µg/Küvette) transfiziert und für 16h bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Nach der Zellernte wurden die HeLa-Zellen fixiert und 1h mit einem primären monoklonalen α -*myc*-Maus-Antikörper sowie 30min mit einem sekundären polyklonalen Texas-rot-konjugierten (AffiniPure) Affen- α -Maus-IgG-Antikörper inkubiert. Abgebildet sind 25 übereinandergelegte Fluoreszenzbilder (25 Z-Ebenen; ganze HeLa-Zelle). Das *myc*-p49-Expressionsmuster wurde mittels Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht und demonstriert eine cytosolische *myc*-p19- und *myc*-p49-Proteinlokalisierung. Verwendetes Mikroskop : Nikon Eclipse E800-Fluoreszenzmikroskop.

2.1.5. p49-Lokalisation in primären Ratten-Adipocyten

Um nachzuweisen, dass die cytosolische Lokalisation von p49 nicht auf Hela-Zellen beschränkt ist, wurden primäre Ratten-Adipocyten mit *myc*-p49 transfiziert und die Lokalisation des Proteins durch konfokale Immunofluoreszenzmikroskopie bestimmt.

Dazu wurde epididymales Fettgewebe aus Ratten entnommen und 1-2 h mit Collagenase inkubiert. Die aus dem Zellverband gelösten Adipocyten wurden schließlich mehrmals in KRBH-Puffer/BSA gewaschen (s. Methodenteil 4.3.2. und 4.3.3./ s. Einleitung 1.4.2.). Anschließend erfolgte die Transfektion der Zellen mit dem Expressionplasmid durch Elektroporation (500V/cm für 3x12msec). Nach Elektroporation wurden die Adipocyten für ca. 16h bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Danach erfolgte die Zellernte und die Zellfixierung unter basalen (unstimulierten) Bedingungen. Die Immuninkubation wurde mit dem primären α -*myc*-Antikörper und dem sekundären polyklonalen FITC-fluoreszenzmarkierten Antikörper durchgeführt. Abbildung 2.5 weist 20 übereinandergelegte Fluoreszenzbilder (20 Z-Ebenen; ganze Adipocytenzelle) einschließlich der nukleären/perinukleären Zellbereiche auf. Als Immunofluoreszenzmikroskop wurde ein Nikon Optiphot-2-Gerät genutzt.

Das p49-Färbemuster demonstriert eine überwiegend granuläre Verteilung innerhalb der Zelle (Abb. 2.5.). Dies deutet darauf hin, dass sich p49 im Cytosol oder auch assoziiert mit cytosolischen Vesikeln, nicht jedoch im Zellkern befindet. Die bei weitem stärkste Färbung für *myc*-p49 findet sich im perinukleären (d.h. den Kern umgebenden) Bereich, dem Kompartiment, in dem in Adipocyten auch der größte Anteil von GLUT4 zu finden ist.

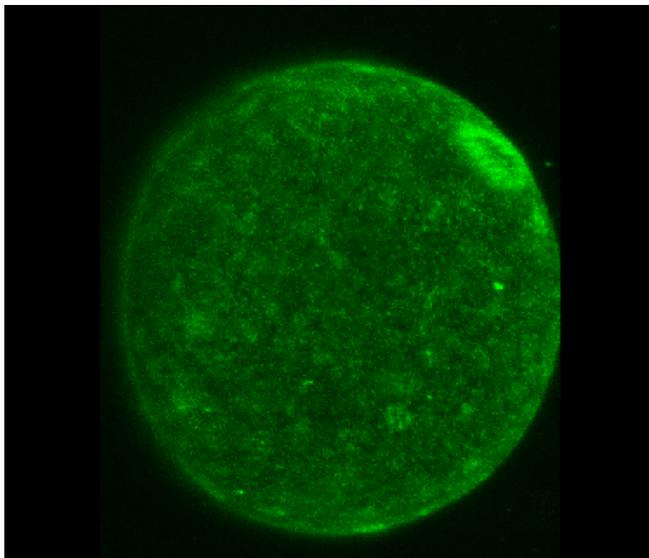


Abb. 2.5. Subzelluläre Lokalisation von p49 in primären Ratten-Adipocyten.

Die Zellen wurden mit *myc*-markiertem p49 (10 μ g/Küvette) transfiziert und für 16h bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Nach der Zellernte wurden die Adipocyten fixiert und 1h mit einem primären α -*myc*-Antikörper sowie 30min mit einem sekundären polyklonalen FITC-fluoreszenzmarkierten Antikörper inkubiert. Anschließend erfolgte die Detektion der FITC-Fluoreszenz durch konfokale Immunofluoreszenzmikroskopie. Abgebildet sind 20 übereinandergelegte Fluoreszenzbilder (20 Z-Ebenen; ganze Adipocytenzelle). Verwendetes Mikroskop: Nikon Optiphot-2-Fluoreszenzmikroskop.

Das Ergebnis zeigt, dass p49 sowohl in HeLa-Zellen als auch in Adipocytten nicht in den Zellkern gelangt.

2.1.6. p49 ist mit GLUT4 in primären Ratten-Adipocytten kolokalisiert

Nachdem der größte Anteil von *myc*-p49 im perinukleären Bereich von primären Adipocytten detektiert werden konnte, wurde ebenfalls in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Matsumoto untersucht, ob *myc*-p49 mit GLUT4 kolokalisiert ist, d.h. im insulinsensitiven GLUT4-Speicherkompartiment zu finden ist. Dazu wurden eine Doppelfärbung von *myc*-p49 und endogenem GLUT4 mittels zwei verschiedener Antikörper-Paare durchgeführt.

Primäre Adipocytten wurden mit *myc*-p49-Plasmid transfiziert (5µg/Küvette) und 16h bei 37°C und 5%CO₂ kultiviert. Nach Zellernte erfolgte eine Zellfixierung und *myc*-p49-Immunodetektion mit dem primären monoklonalen α -*myc*-Antikörper und dem sekundären polyklonalen FITC-fluoreszenzmarkierten Antikörper (Abb. 2.6., grüne Fluoreszenz). Der endogene GLUT4 ist mit dem primären polyklonalen α -GLUT4-Antikörper aus Kaninchen und dem sekundären polyklonalen Rhodamin-rot-X-Antikörper fluoreszenzmikroskopisch detektiert worden (Abb. 2.6., rote Fluoreszenz).

Abbildung 2.6 demonstriert insgesamt 20 Z-Ebenen, wobei die Z-Ebene 9 (mittlerer Schnitt durch die Zelle) auf der oberen Seite vergrößert dargestellt ist. Die *myc*-p49/GLUT4-Kolokalisation zeigt sich in Form eines gelben Fluoreszenzsignals (Überlagerung der grünen FITC- und der roten Rhodamin-Fluoreszenz) und ist im perinukleären Zellbereich lokalisiert. Die beobachtete partielle Überlappung der FITC- und Rhodamin-Fluoreszenz spricht somit für eine ausgedehnte Kolokalisation von *myc*-p49 und GLUT4 in Adipocytten.

Neben der intensiven Anfärbung des perinukleären Bereichs durch den *myc*-Antikörper findet sich ein diffuses, „wolkiges“ Fluoreszenzsignal für *myc*-p49 in anderen Bereichen der Zelle (besonders ausgeprägt in den Z-Ebenen 4 und 5 in Abb. 2.6). Dieses Kompartiment konnte in diesem Versuch jedoch nicht identifiziert werden. Das Ergebnis deutet jedoch darauf hin, dass sich nur ein Teil von p49 im GLUT4-Kompartiment befindet.

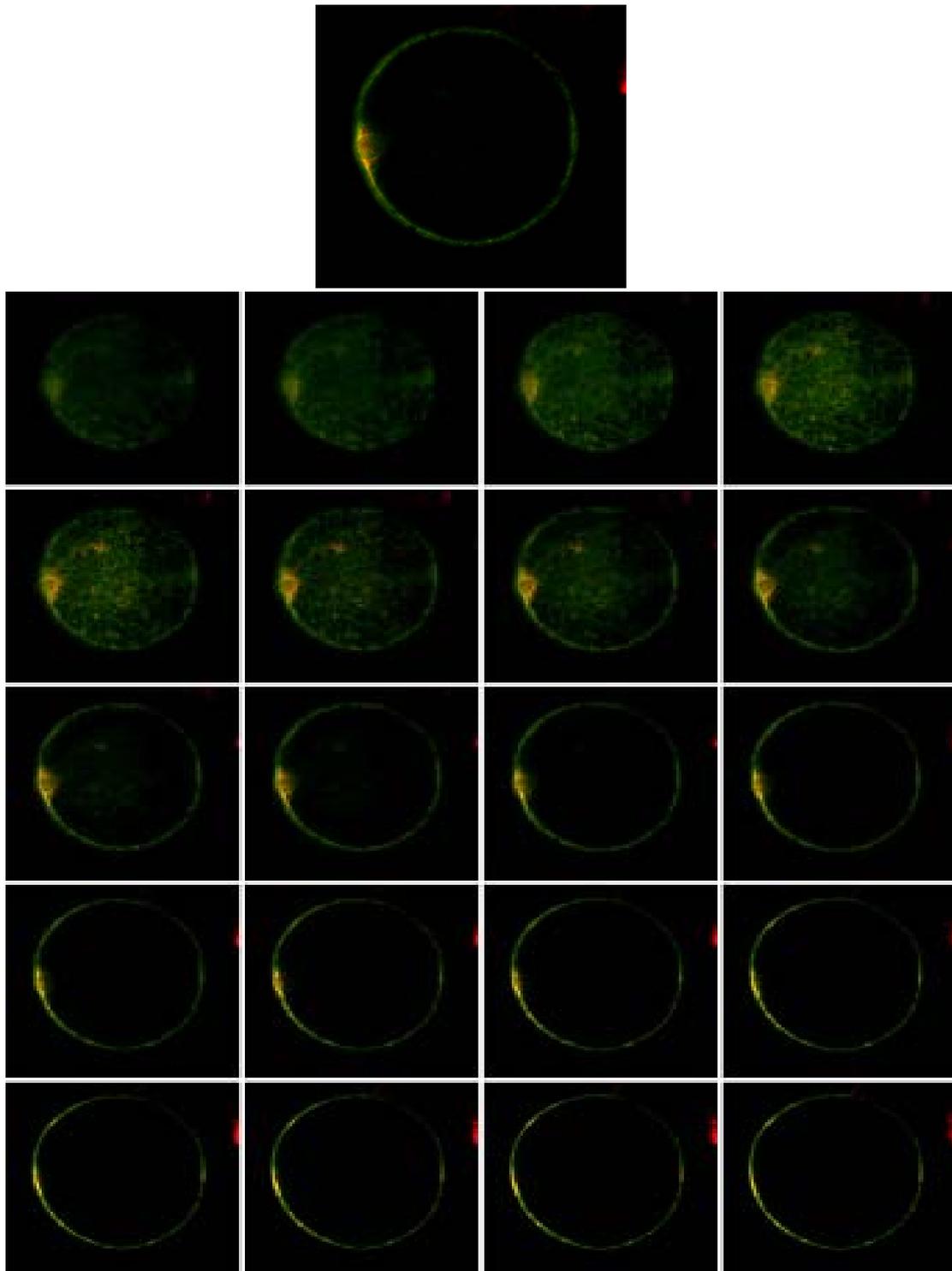


Abb. 2.6. Kolokalisation von p49 mit GLUT4 in primären Ratten-Adipocyten.

Die Zellen wurden mit *myc*-markiertem p49 ($5\mu\text{g}/\text{Küvette}$) transfiziert und für 16h bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert. Nach der Zellernte wurden die Adipocyten fixiert und *myc*-p49 mit einem primären α -*myc*-Antikörper sowie einem sekundären polyklonalen FITC-fluoreszenzmarkierten Antikörper nachgewiesen. Der endogene GLUT4 ist mit einem polyklonalen α -GLUT4-Antikörper und einem sekundären polyklonalen Rhodamin-Rot-X-Antikörper fluoreszenzmikroskopisch detektiert worden. Die Kolokalisation von *myc*-p49 mit dem endogenen GLUT4 wurde durch konfokale Immunofluoreszenzmikroskopie untersucht. Die gelbe Fluoreszenz markiert *myc*-p49/GLUT4-Kolokalisationsbereiche. Dargestellt sind alle 20 Z-Ebenen (von oben links nach unten rechts), wobei die 9te Z-Ebene auf der oberen Seite vergrößert dargestellt ist. Mikroskop : Nikon Optiphot-2-Fluoreszenzmikroskop.

Die Kolokalisation von *myc*-p49 mit GLUT4 in primären Adipocyten lässt vermuten, dass eine Protein-Protein-Interaktion zwischen p49 und GLUT4 *in vivo* besteht. Es stellt sich nun die Frage nach der biologischen Funktion dieser Interaktion.

2.1.7. p49 ist in GLUT4-null CHO-Zellen mit Membranen assoziiert

Nachdem demonstriert wurde, dass p49 mit GLUT4 in primären Adipocyten kolokalisiert, stellte sich die Frage, ob das p49-Protein durch die Bindung an GLUT4 befähigt wird mit Membranen zu interagieren oder ob p49 auch ohne GLUT4-Interaktion an Membranen binden kann.

Um die Fragestellung experimentell zu untersuchen, wurden CHO-Zellen, die keinen GLUT4 enthielten mit *myc*-p49 (0,5 µg *myc*-p49/6-*well* Platte) transfiziert.

Die Transfektion erfolgte mittels der Lipofectamin-Methode. Dabei wurden 1,75 µl Lipofectamin mit 0,5 µg *myc*-p49-Plasmid für 4 h inkubiert und danach mit 0,25 ml Serumfreiem Medium (DMEM-Medium mit 2mM L-Glutamin, 20mM HEPES und 50 µg/ml Gentamicin) gewaschen. Danach sind die CHO-Zellen mit 0,5 ml Kulturmedium (DMEM + 10% fetales Kälberserum) versetzt und für 48 h bei 37°C, 5%CO₂ kultiviert worden. Nach der Kultivierung wurden die Zellen für 2 min mit 1% Trypsin versetzt um die am Untergrund haftende Zellschicht abzulösen. Danach erfolgte der Zellaufschluß unter Zugabe von 0,5 ml Homogenisationspuffer pH 7.5 durch pottern auf Eis. Durch eine kurze (30 sec) Zentrifugation bei 12.000g sind die Zellkerne entfernt worden. Es folgte eine Ultrazentrifugation bei 100.000g für 30min und 4°C. Durch die Ultrazentrifugation kann die Membranfraktion von der löslichen Proteinfraction separiert werden. Abschließend sind die Membranfraktionen mit 5xSDS-Probenpuffer versetzt worden. Die löslichen Proteinfractionen wurden zuerst durch die Chloroform/Methanol-Methode gefällt und danach ebenfalls in 5xSDS-Probenpuffer gelöst. Die Auswertung erfolgte im Westernblot mittels der ECL-Methode. Für den Antikörpernachweis wurde der primäre α -*myc*-Antikörper (1:5000) und ein sekundärer Peroxidase-gekoppelter α -Maus-Antikörper (1:50.000) verwendet.

Abbildung 2.7 demonstriert, dass p49 vollständig in der Membranfraktion von GLUT4-null CHO-Zellen lokalisiert war. Damit ist nachgewiesen, dass p49 auch ohne GLUT4-Interaktion befähigt ist an Membranen zu binden.

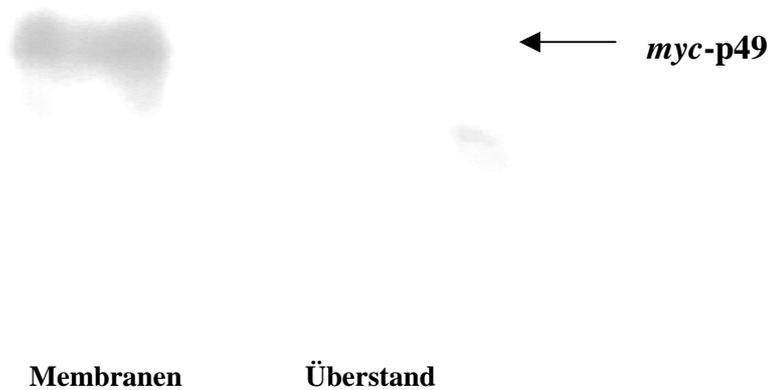


Abb. 2.7. p49-Lokalisation in CHO-Zellen ohne GLUT4.

Die Transfektion erfolgte mittels der Lipofectamin-Methode. Dabei wurden 1,75 μ l Lipofectamin mit 0,5 μ g *myc*-p49-Plasmid für 4 h inkubiert und danach mit 0,25 ml Serum-freiem Medium (DMEM-Medium mit 2mM L-Glutamin, 20mM HEPES und 50 μ g/ml Gentamicin) gewaschen. Danach sind die CHO-Zellen mit 0,5 ml Kulturmedium (DMEM + 10% fetales Kälberserum) versetzt und für 48 h bei 37°C, 5%CO₂ kultiviert worden. Dargestellt ist der Westernblot (ECL-Methode). Für den Antikörpernachweis wurde der primäre α -*myc*-Antikörper (1:5000) und ein sekundärer Peroxidase-gekoppelte α -Maus-Antikörper (1:50.000) verwendet.

2.1.8. Die Überexpression von p49 in primären Ratten-Adipocyten reduziert die Zelloberflächenexpression von GLUT4, jedoch nicht von GLUT8

Damit der Einfluss des p49-Proteins auf die GLUT4-Translokation untersucht werden konnte, wurden intakte primäre Adipocyten mit der GLUT4-bindenden Domäne von p49, *myc*-p49-N (Aminosäuren 1-216, 25kDa; nur die N-terminale Hälfte des Vollängen-p49) und Hämagglutinin-(HA)-epitopmarkiertem GLUT4 kotransfiziert. Die Technik der transienten Expression epitopmarkierter GLUTs wurde von Dr. Michael Quon und Dr. Hadi Al-Hasani an den *National Institutes of Health* entwickelt und ermöglicht die quantitative Detektion der GLUTs auf der Plasmamembran intakter Adipocyten.

Es wurden frische Ratten-Adipocyten (weißes Fettgewebe, WAC) entnommen und für 1-2 h mit Collagenase inkubiert, um den Zellverband zu lösen und einzelne intakte Zellen zu erhalten. Danach wurden die Adipocyten 3x mit PBS-Puffer gewaschen, in die Elektroporationsküvetten gefüllt (ca. 10⁶ Zellen/Küvette) und anschließend elektroporiert. Um die Kotransfektion zu gewährleisten wurden die Expressionsplasmide für *myc*-p49-N und HA-GLUT4 im Verhältnis von > 3:1 eingesetzt. Zusätzlich zu den Expressionsplasmiden enthielten die Elektroporationsküvetten fragmentierte Lachssperma-DNA (*Carrier-DNA*) um die eingebrachten Plasmide kompetitiv vor dem Abbau durch zelluläre Nucleasen zu schützen. Die Elektroporation wurde bei 200V und 3 aufeinanderfolgenden Pulsen für 12 msec durchgeführt. Danach wurden die kotransfizierten

Adipocyten für 16h bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Nach Kultivierung wurden die Zellen geerntet und in Eppendorfgefäße aufgeteilt. Es folgte eine 30-minütige Zellinkubation ± Insulin und eine 3-minütige Zyanid-Inkubation, um das GLUT4-Recycling abzustoppen ohne die Adipocyten zu zerstören. Das zugegebene Zyanid entkoppelt die Atmungskette der Zellen und führt so zum vollständigen Verbrauch des zellulären ATP. Da Vesikeltransportvorgänge ATP-abhängig sind kommt das Recycling der Proteine so zum Erliegen.

Schließlich wurde die Zellexpression der HA-Epitopmarkierung durch einen Antikörperbindungsnachweis quantifiziert. Dazu wurden die Zellen zuerst mit einem monoklonalen α -HA-Antikörper (1:1000) für 1 h inkubiert. Nach einem Waschschrift, der überschüssige Antikörper entfernt, wurden die Zellen mit einem zweiten Antikörper, ¹²⁵I-markiertem Schaf-Anti-Maus (¹²⁵I-Sham, 0.1 μ Ci/Probe) für 1h inkubiert. Der überschüssige sekundäre Antikörper konnte schließlich durch Zentrifugation der Zellen durch Dinonylphtalat-Öl entfernt werden. Die Bestimmung der Zelloberflächen-assoziierten Radioaktivität (proportional zur Menge des HA-Epitops) erfolgte durch Messung der Zellen im γ -Counter. Als negativ-Kontrolle wurde der leere Expressionsvektor eingesetzt und die mit dieser Probe erhaltene Hintergrundstrahlung (ca. 300 cpm/Probe, ca. 5% des maximalen Signals) von allen anderen Werten abgezogen (spezifische Bindung). Parallel zum Antikörperbindungsnachweis ist die Expression des rekombinanten HA-GLUT4-Proteins durch Westernblot-Analysen quantifiziert worden. Als primärer Antikörper für den Westernblot diente der gleiche monoklonale α -HA-Antikörper wie für den Bindungsversuch. Als sekundäres Reagenz wurde ¹²⁵I-markiertes Protein-A verwendet. Die Auswertung der Blots erfolgte durch Verwendung eines Phosphor-Imagers.

Abbildung 2.8(A) demonstriert das Ergebnis der Versuche. Die Insulinstimulierung der mit HA-GLUT4 transfizierten Ratten-Adipocyten bewirkt eine ca. 4-fache Erhöhung der Menge an HA-GLUT4 an der Zelloberfläche (Translokation). In HA-GLUT4/*myc*-p49-N-kotransfizierten Zellen ist ebenfalls eine GLUT4-Translokation nach Stimulierung mit Insulin beobachtet worden. Die Überexpression von *myc*-p49-N bewirkte jedoch eine 50%ige Reduktion der Zelloberflächenexpression von HA-GLUT4, sowohl im basalen als auch im insulinstimulierten Zustand.

Als Kontrolle wurde daher eine weitere HA-epitopmarkierte GLUT-Isoform (GLUT8) eingesetzt, die in einer mutierten Form (LL/AA) in Adipocyten konstitutiv auf der Plasmamembran exprimiert wird. Wie in einem späteren Abschnitt dargelegt, unterliegt HA-GLUT8-(LL/AA) keinem Recycling zwischen der Plasmamembran und internen Kompartimenten.

Wie in Abb. 2.8(A) demonstriert, hat die Insulinstimulierung keinen Effekt auf die Zelloberflächenexpression von GLUT8-(LL/AA). Die Koexpression von *myc*-p49-N hat, ganz im Gegensatz zu GLUT4, ebenfalls keinen Effekt auf die Zelloberflächenexpression des GLUT8-Reporters. Dieses Ergebnis belegt, dass die *myc*-p49-N-abhängige Reduktion der Zelloberflächenexpression spezifisch für die GLUT4-Isoform ist.

Die parallel zum Zelloberflächennachweis durchgeführte Western-Blot-Analyse der transfizierten Zellen ist in Abbildung 2.8(B) dargestellt. Die Analyse demonstriert, dass die Expression von *myc*-p49-N zu einer reduzierten Expression (ca. 50%) von HA-GLUT4

führt. Folglich ist die verminderte Zelloberflächenexpression von HA-GLUT4 (Abb. 2.8(A)) schlicht auf eine geringere Expression des Reportermoleküls zurückzuführen. Ähnliche Ergebnisse ergaben Versuche, bei denen Vollängen *myc-p49* oder *myc-p19* zusammen mit HA-GLUT4 transfiziert wurden (Daten nicht gezeigt).

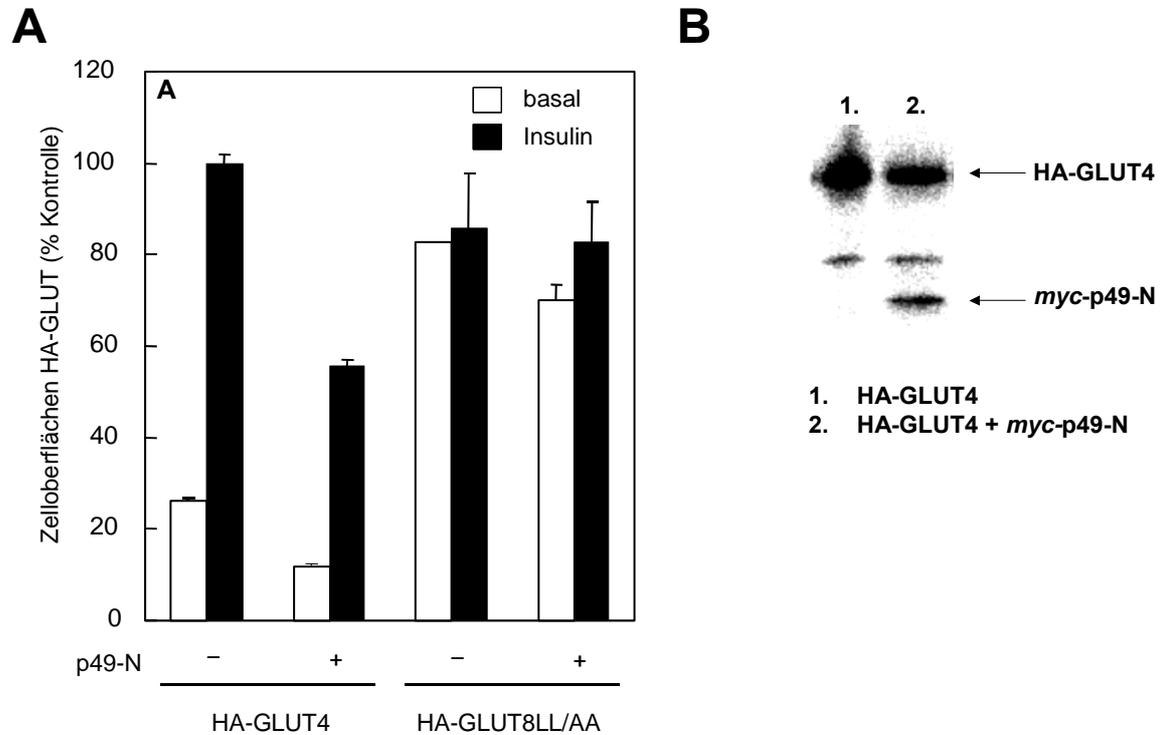


Abb. 2.8. Expression der HA-GLUTs in primären Ratten-Adipocyten.

(A) Isolierte Zellen wurden mit HA-GLUT4 oder HA-GLUT8(LL/AA) und *myc-p49-N* kotransfiziert. Nach 16-stündiger Kultivierung bei 37°C, 5%CO₂, wurden die Zellen ± (67nM) Insulin für 30min inkubiert und das GLUT4-Recycling mit Zyanid abgestoppt. Die HA-GLUT-Zelloberflächenexpression ist mittels eines radioaktiven Antikörperbindungsassays bestimmt worden. (B) Western-Blot-Analyse der transfizierten Adipocyten. HA-GLUT4 und HA-GLUT4/*myc-p49-N* kotransfizierte Zellen wurden in SDS-Puffer lysiert und die Proteine in der SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Elektrotransfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran wurde diese durchgeschnitten. Mit der oberen Hälfte wurde ein Western-Blot für das HA-Epitop, mit der unteren Hälfte für das *myc*-Epitop durchgeführt. Als primäre Antikörper dienten monoklonale α -HA- und α -*myc*-Antikörper, als sekundärer Antikörper diente ¹²⁵I-gekoppelter Schafs- α -Maus-Antikörper. Gezeigt ist die Autoradiographie der gesamten Membran.

Die Ergebnisse der Versuche zeigen, dass die Überexpression von p49-N (bzw. Vollängen-p49 → Daten nicht gezeigt) vermutlich keinen Einfluss auf die insulinstimulierte GLUT4-Translokation in Adipocyten hat. Somit ist unwahrscheinlich, dass p49 eine Funktion innerhalb des Translokationsmechanismus von GLUT4 hat. Auf der anderen Seite führte die Expression der p49-Konstrukte zu einer spezifischen Reduktion der GLUT4-Expression, nicht aber der Expression des Kontrollproteins [HA-GLUT8-(LL/AA)]. Um weiterhin die mögliche biologische Funktion von p49 im Zusammenhang mit dem GLUT4-Recycling zu untersuchen, sollte im Folgenden das p49-Bindemotiv im GLUT4 genau lokalisiert werden, um es anschließend durch gerichtete Mutagenese ausschalten zu können.

2.1.9. p49 bindet ein 7-Aminosäuremotiv (QIGSEDG) der N-terminalen GLUT4-Sequenz

Um die Aminosäuren des p49-Bindungsmotivs im GLUT4-N-Terminus zu lokalisieren, wurden drei überlappende Deletionsmutanten des GLUT4-N-Terminus hergestellt und deren Bindung an das p49-Protein im Hefe-Two-Hybrid-System ermittelt. Dazu mussten sowohl p49 als auch die GLUT4-Konstrukte zunächst in Hefevektoren kloniert werden, um entsprechende GAL4-Fusionsproteine [GAL4-DNA *activation domain* (AD) bzw. GAL4-DNA *binding domain* (BD)] zu erhalten. Die DNA-Fragmente des GLUT4-NT wurden dazu in einen modifizierten Hefe-GAL4-BD-Expressionsvektor „pAS2.1-GS“ kloniert, der vor der *Multi-cloning-site* die Sequenz für einen Glycin-Serin-reichen Linker enthält (Al-Hasani et al., 2002). Gleichzeitig wurde die cDNA des Volllängen-p49 verwendet, um im Vektor pGAD424 ein GAL4-AD-Fusionskonstrukt herzustellen.

Im Experiment wurden Hefen mit jeweils einem der drei GAL4-GLUT4-NT-Deletionsmutanten („A“, „B“ und „C“/ s. Abb. 2.9.) bzw. dem Wildtyp-GLUT4-NT und GAL-p49 kotransfiziert. Anschließend wurde die Aktivierung des Reportergens LacZ analysiert. Eine Protein-Protein-Interaktion im hier verwendeten *S. cerevisiae*-Reporterstamm *SFY526* zwischen BD- und AD-Konstrukt bewirkt die Expression der β -Galaktosidase (LacZ⁺). Die β -Galaktosidaseaktivität wurde durch einen photometrischen Nachweis (bei 576 nm) mit Hilfe des Substrats CPRG (Chlorophenol-rot- β -D-Galaktopyranosid) bestimmt. Dazu wurden die Zellen geerntet, durch mehrfaches einfrieren und auftauen lysiert und der lösliche Anteil der Zellen in die Farbreaktion eingesetzt. Die Anzahl der in den Test eingesetzten Hefezellen wurde ebenfalls photometrisch bei 600 nm bestimmt.

Das Ergebnis der Versuche ist in Abbildung 2.9 dargestellt. Die Protein-Protein-Interaktion der GLUT4/p49-Konstrukte ist als normalisierte β -Galaktosidaseaktivität, $OD_{576}/OD_{600}/\text{min}$, ausgedrückt worden. Die Abbildung demonstriert, eine vergleichbare Interaktion von p49 mit dem Wildtyp-GLUT4-NT und den beiden GLUT4-NT-Deletionsmutanten „A“ und „B“. Die GLUT4-NT-Deletionsmutante „C“, die der C-terminalen Hälfte des GLUT4-NT entspricht, und die negativ-Kontrolle (Lamin C; LAM), weisen hingegen keine Interaktion mit p49 auf. Korreliert man die β -Galaktosidaseaktivität mit der Aminosäuresequenz der drei überlappenden GLUT4-NT-Deletionsmutanten, ergibt sich das p49-Bindungsmotiv in diesem Versuch als „**QIGSEDG**“ im GLUT4-N-Terminus.

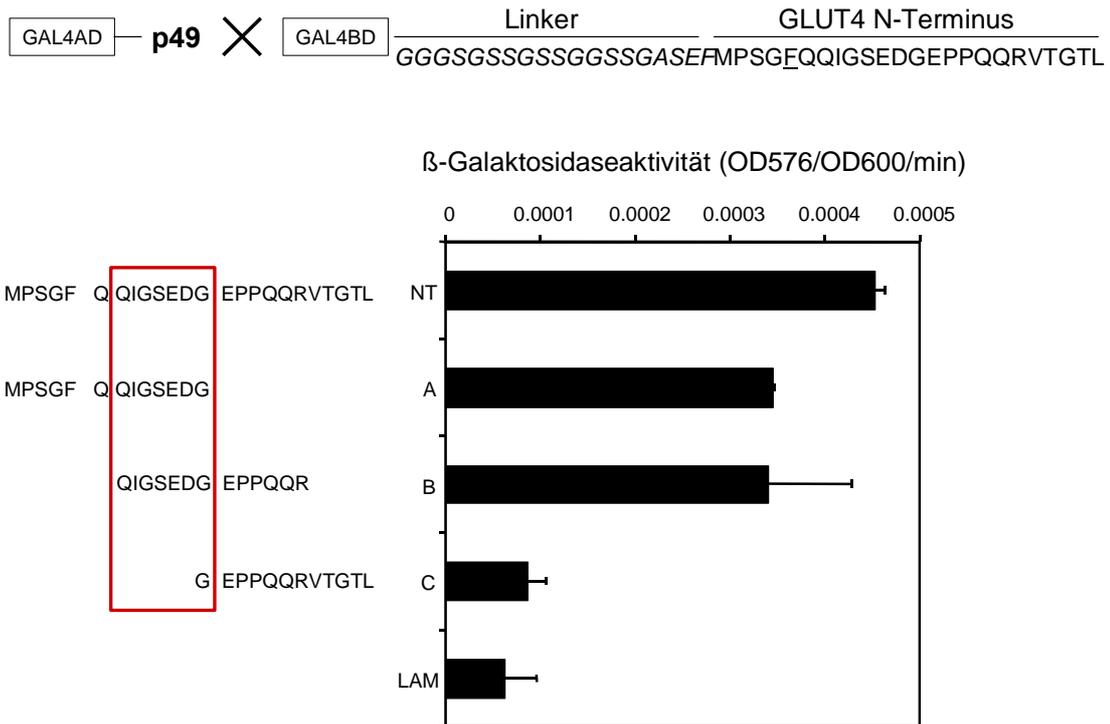


Abb. 2.9. Hefe-two-Hybrid-Analyse der p49/GLUT4-NT-Interaktion.

Die Bindung von p49 an den GLUT4-N-Terminus (GLUT4-NT) und an die drei überlappenden Deletionsmutanten A, B und C wurde durch Messung der β -Galaktosidaseaktivität quantifiziert. Als Substrat wurde CPRG benutzt. AD, Aktivierungsdomäne; BD, DNA-Bindungsdomäne; LAM, Lamin C (negativ Kontrolle).

2.1.10. Konstruktion einer HA-GLUT4-(ED/QN)-Bindungsmotivmutante und Untersuchung der p49-Proteinbindung im Hefe-Two-Hybrid-System

Nachdem das p49-Bindemotiv im GLUT4-NT auf 7-Aminosäuren (QIGSEDG) eingegrenzt werden konnte, sollte nun eine p49-bindedefiziente Mutante von GLUT4 hergestellt werden. Eine Deletion des ganzen Bereichs im GLUT4 wäre jedoch höchstwahrscheinlich schädlich für die Faltung bzw. Membraninsertion des Proteins. Deshalb sollte der p49-bindende Bereich weiter eingegrenzt werden.

Die beiden Glycine im Bindemotiv (QIGSEDG) gehen sicherlich keine direkte Interaktionen mit anderen Aminosäuren ein. Das Serin (QIGSEDG) kann allenfalls nur eine Wasserstoffbrückenbindung ausbilden. Das Glutamin und das Isoleucin im Bindemotiv (QIGSEDG) durften nicht mutiert werden, da sie Teil des FQIQI-Motivs sind, mit den μ -Adaptinen der heterotetrameren Adapterproteine wechselwirken und an der Endocytose von GLUT4 beteiligt sind. Durch Mutation des Phenylalanins-5 im FQIQI-Motiv zu Alanin wurde die μ -Adaptinbindung und somit die GLUT4-Endocytose gehemmt (Al-Hasani et al., 2002).

Als erfolgsversprechendste Kandidaten für die geplante Mutation im GLUT4 blieben somit nur die beiden sauren Reste, die Glutaminsäure und die Asparaginsäure im Bindemotiv übrig (QIGSEDG).

Ausgehend vom bereits beschriebenen GAL4-BD-Konstrukt für den gesamten GLUT4-N-Terminus (GLUT4-NT) wurde durch gerichtete PCR-Mutagenese eine Doppelmutante

hergestellt, bei der die Glutaminsäure gegen Glutamin (E→Q) und die Asparaginsäure gegen Asparagin (D→N) ausgetauscht wurde (GLUT4-NT-(ED/QN)). Die p49-Interaktion ist mit diesem mutierten GLUT4-N-Terminus im Hefe-Two-Hybrid-System analysiert worden. Die (ED/QN)-Mutante bzw. der Wildtyp-GLUT4-NT wurden zusammen mit p49 in Hefezellen exprimiert. Danach erfolgte die Auswertung der β -Galaktosidaseaktivität ($OD_{576}/OD_{600}/\text{min}$) als Maß für die Protein-Protein-Interaktion.

In Abbildung 2.10 ist dargestellt, dass die Interaktion von p49 und der (ED/QN)-Mutante um den Faktor 6 schwächer ist als die Interaktion von p49 und dem Wildtyp GLUT4-NT. Die Glutaminsäure und die Asparaginsäure im HA-GLUT4-NT-Bindungsmotiv sind somit offenbar wesentlich an der p49-Bindung (zumindest im Hefe-Two-Hybrid-System) beteiligt.

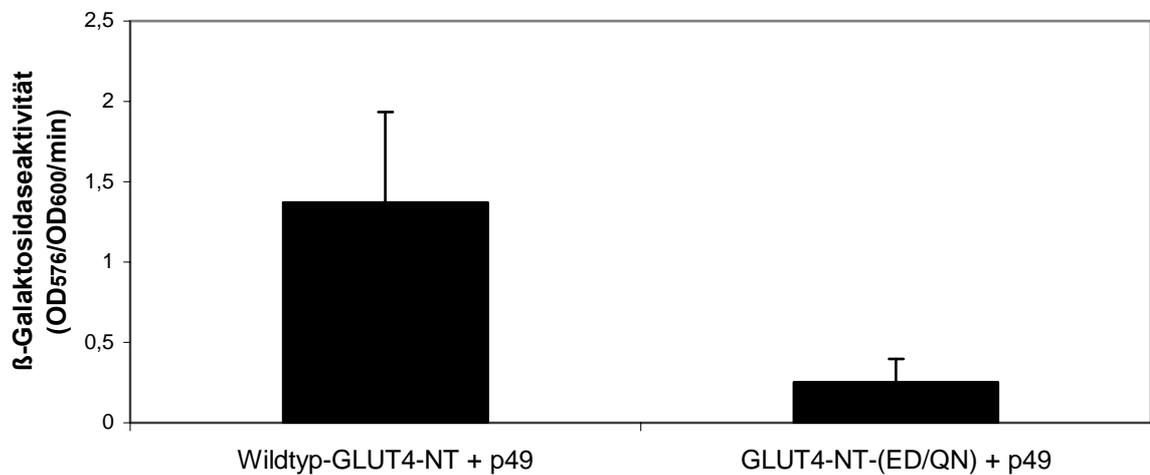


Abb. 2.10. β -Galaktosidaseaktivität von Wildtyp-GLUT4-NT und GLUT4-NT-(ED/QN) kotransfiziert mit p49 im Hefe-Two-Hybrid-System.

Wildtyp-GLUT4-NT und die GLUT4-NT-(ED/QN)-Bindungsmotivmutante wurden mit p49 in Hefezellen kotransfiziert. Danach ist ein β -Galaktosidaseaktivitätsnachweis durchgeführt worden.

2.1.11. Untersuchung der HA-GLUT4-(ED/QN)-Translokation in Adipocyten

Im vorherigen Versuch wurde demonstriert, dass die p49-Bindung an den GLUT4-N-Terminus durch die (ED/QN)-Mutation aufgehoben wird. Um nun zu untersuchen, ob diese Mutation im GLUT4 das Recycling des Glucosetransporters in Adipocyten beeinflusst, wurde eine entsprechende HA-GLUT4-(ED/QN)-Mutante hergestellt und in Adipocyten exprimiert. Als Kontrolle dienten Adipocyten, die entweder Wildtyp-HA-GLUT4 oder HA-GLUT4 mit *myc*-p49-N koexprimierten. Die Zelloberflächenexpression der HA-markierten Transporter wurde durch den radioaktiven Antikörperbindungsversuch bestimmt. Das Ergebnis der Versuche ist in Abb. 2.11 dargestellt.

Wie bereits in Abb. 2.8. dargestellt bewirkt die Expression von *myc*-p49-N eine Reduktion der HA-GLUT4-Zelloberflächenexpression um 50%. Die Zelloberflächenexpression der HA-GLUT4-(ED/QN)-Mutante ist im Vergleich zum Wildtyp-HA-GLUT4 ebenfalls um 50% reduziert.

Die p49-bindedefiziente Mutante entspricht demnach in ihrer Zelloberflächenexpression genau dem Wildtyp-HA-GLUT4 in Gegenwart von p49-N. Dies bedeutet, dass die Überexpression von p49-N den gleichen Effekt bewirkt, wie das Ausschalten des p49-Bindemotivs im GLUT4.

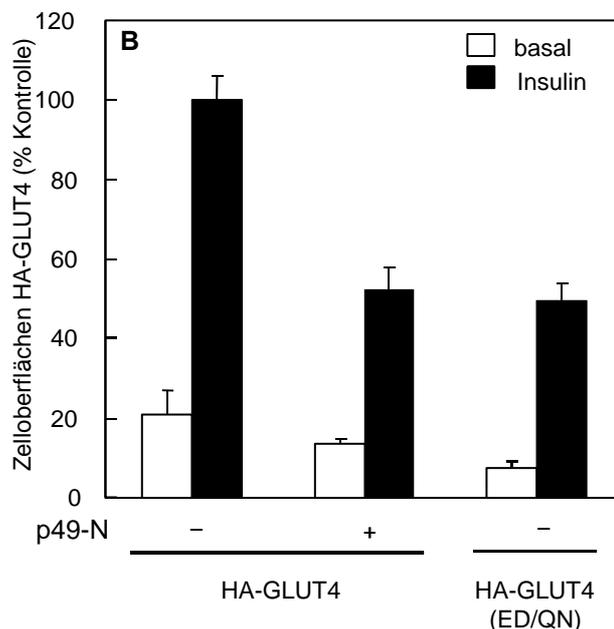


Abb. 2.11. Expression von HA-GLUTs mit p49 in primären Ratten-Adipocyten.

Zelloberflächenexpression von Wildtyp-HA-GLUT4 \pm p49-N, sowie der p49-Bindungsmutante HA-GLUT4-(E11 \rightarrow Q, D12 \rightarrow N; ED/QN) in primären Adipocyten.

2.1.12. Beteiligung von p49 an der Synthese oder der Sortierung von GLUT4

Die Ergebnisse der Überexpression von p49-Konstrukten und die Expression der p49-bindedefizienten HA-GLUT4-(ED/QN)-Mutante in primären Adipocyten demonstrieren eine 50%ige HA-GLUT4-Zelloberflächenreduktion, die auf eine Verminderung der HA-GLUT4-Menge in der Zelle zurückgeht. Dieser inhibitorische Effekt könnte zwei Ursachen haben:

1. P49 könnte an der GLUT4-Synthese bzw. Prozessierung beteiligt sein. Die Überexpression von p49 bzw. das Ausschalten des p49-Bindemotivs im GLUT4 könnte dann mit der GLUT4-Prozessierung bzw. Synthese interferieren und diese hemmen. Eine reduzierte HA-GLUT4-Synthese im endoplasmatischen Retikulum (ER), eine fehlerhafte GLUT4-Prozessierung im Golgi-Apparat oder ein gestörter Transport von GLUT4-Vesikeln im ER/Golgi-System würde zu einer Verminderung der zellulären Menge an HA-GLUT4 führen.

2. P49 könnte an der GLUT4-Translokation vom endosomalen Kompartiment zum Speicherkompartiment mitwirken. Diese Theorie könnte ebenfalls das Ergebnis der 50%igen GLUT4-Zelloberflächenreduktion in primären Adipocyten erklären. Aus dem Recycling von GLUT4 ergibt sich die Notwendigkeit, dass GLUT4 vom endosomalen Kompartiment zum Speicherkompartiment gelangt. Theoretisch könnte endogenes p49 als Sortieradapterprotein fungieren, das die Sortierung der GLUT4-Vesikel vom endosomalen Kompartiment zum Speicherkompartiment gewährleistet. Die Überexpression von p49-N oder das Ausschalten des Bindemotivs im GLUT4 könnten diese Funktion hemmen, indem sie die Bindung des endogenen Wildtyp-p49 verhindern. Die Folge wäre, dass GLUT4 nicht in die Speichervesikel sortiert wird und dadurch in den Endosomen verbleibt. Späte Endosomen werden zu Lysosomen und GLUT4 würde dadurch dem lysosomalen Abbau zugänglich gemacht. Dadurch erklärt sich, dass nicht nur das Oberflächenexprimierte GLUT4, sondern auch die Gesamtmenge an GLUT4 in der Zelle reduziert wird (Abb. 2.12).

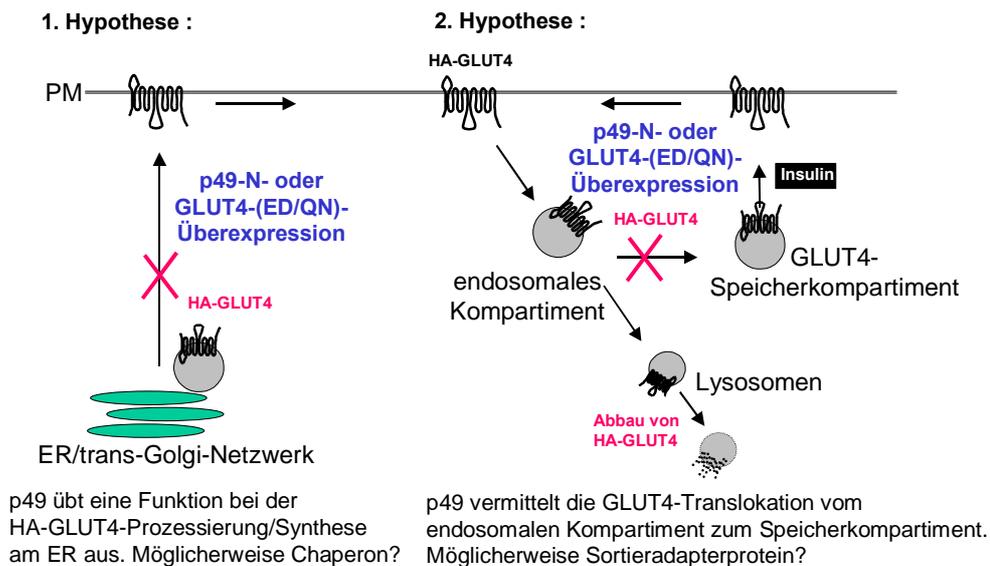


Abb.2.12. Arbeitshypothesen der p49-Funktion in Adipocyten.

Die 1. Hypothese besagt, dass p49 an der GLUT4-Synthese/Prozessierung beteiligt ist. Somit würde die Expression von p49-Konstrukten oder die Mutation der Bindestelle im GLUT4-(ED/QN) einen Transport von neu-synthetisiertem GLUT4 zur Plasmamembran hemmen oder die Menge von neu-synthetisiertem GLUT4 vermindern. Die 2. Hypothese postuliert eine Funktion von p49 in der Sortierung/Transport von GLUT4 vom endosomalen Kompartiment zum Speicherkompartiment. Die Expression der p49-Konstrukte oder die Mutation der Bindestelle könnten ebenfalls die GLUT4-Zelloberflächenexpression reduzieren, indem sie die GLUT4-Sortierung aus dem endosomalen Kompartiment ins Speicherkompartiment hemmen so dass GLUT4 schließlich im lysosomalen Kompartiment abgebaut wird. ER, endoplasmatisches Retikulum.

2.1.13 Einfluss von p49 auf die GLUT4-Synthese/Degradierung

Eine direkte Methode zur Bestimmung der Protein-Degradierungsrate ist die Pulse-Chase-Methode. Bei dieser Methode werden die Proteine in Gegenwart von radioaktivem Methionin (Pulse) synthetisiert. Danach erfolgt eine Inkubation mit nicht-radioaktivem Methionin (Chase). Anschließend kann die Halbwertszeit des Proteins bestimmt werden, indem man in Abhängigkeit von der Zeit die Abnahme der Radioaktivität im Protein misst. In Vorversuchen wurde jedoch beobachtet, dass sich GLUT4 nur sehr ineffektiv radioaktiv markieren ließ. Daher musste auf einen indirekten Nachweis der GLUT4-Synthese/Degradierung zurück gegriffen werden.

Frisch transfizierte Adipocyten synthetisieren kontinuierlich HA-GLUT4, so dass die GLUT4-Konzentration für ca. 6-8 Stunden nach Transfektion linear ansteigt (Al-Hasani et al., 1998). In diesem Zeitraum ist die Zelloberflächenexpression von HA-GLUT4 linear proportional zur Menge an synthetisiertem Protein (Al-Hasani et al., 2000). Blockiert man einige Stunden nach der Transfektion die Proteinsynthese durch Zugabe von Cycloheximid zu den Zellen, dann kommt die HA-GLUT4-Synthese zum Erliegen und die zelluläre Menge von HA-GLUT4 (und damit die Menge des HA-Epitops auf der Plasmamembran) bleibt über mehrere Stunden konstant, da die Abbaugeschwindigkeit, d.h. der *turn-over* von GLUT4 in Fettzellen gering ist. Eine erhöhte Abbaugeschwindigkeit von GLUT4 sollte sich

deshalb in einer mehr oder weniger ausgeprägten Reduktion von HA-GLUT4 in Gegenwart von Cycloheximid bemerkbar machen. Um diesen Effekt zu prüfen, wurden primäre Adipocyten mit p49-N und HA-GLUT4 kotransfiziert und die HA-GLUT4-Zelloberflächenexpression zeitabhängig nach Zugabe von Cycloheximid bestimmt.

Im Experiment wurden primäre Ratten-Adipocyten mit p49-N und HA-GLUT4 kotransfiziert und 3h bei 37°C, 5% CO₂ kultiviert. Nach Zellernte (Überführung der Adipocyten in Eppendorfgefäße, 37°C) erfolgte nach 0, 1, 2 und 3 Stunden eine 10-minütige Insulinstimulierung (67nM Insulin) und danach \pm 50 μ M Cycloheximid-Zugabe. Die Insulinstimulierung erfolgte um das HA-Signal auf der Zelloberfläche und damit die Sensitivität des Nachweises zu erhöhen. Die GLUT4-Zelloberflächenexpression wurde durch den radioaktiven Antikörperbindungsnachweis (primärer Antikörper: α -HA-Antikörper; sekundärer Antikörper: ¹²⁵I-gekoppelte Schafs- α -Maus-Antikörper) bestimmt und die Auswertung wurde zeitabhängig nach 0, 1, 2 und 3 Stunden durchgeführt (Abb. 2.13.).

Abbildung 2.13 zeigt das gemittelte Ergebnis von zwei durchgeführten Versuchen. Im Zeitraum von 3 bis 5 h nach der Transfektion steigt die HA-GLUT4-Zelloberflächenexpression von HA-GLUT4-transfizierten Zellen linear an und man erkennt eine annähernde Verdoppelung des HA-Signals über diese Periode. Nach Zugabe von Cycloheximid (drei Stunden nach der Transfektion) kommt die HA-GLUT4-Synthese erwartungsgemäß zum Stillstand und die HA-Menge an der Zelloberfläche bleibt über die weiteren drei Stunden konstant. Bei den p49-N/HA-GLUT4 kotransfizierten Zellen ist hingegen nur ein Anstieg der HA-GLUT4-Zelloberflächenexpression innerhalb der ersten Stunde zu beobachten, danach flacht die Kurve deutlich ab. Einen ähnlichen Verlauf zeigt die Kurve nach Zugabe von Cycloheximid, die HA-GLUT4-Zelloberflächenexpression fällt deutlicher ab als bei der GLUT4-Kontrolle und den p49-N/HA-GLUT4-Zellen in Abwesenheit von Cycloheximid.

In Gegenwart von p49-N ist somit der Anstieg der HA-GLUT4-Zelloberflächenexpression über die Zeit klar vermindert. Dies könnte auf eine Hemmung der HA-GLUT4-Synthese und/oder einen p49-N-induzierten Proteinabbau von HA-GLUT4 beruhen. Die beobachtete Reduktion von HA-GLUT4 in p49-N-Zellen in Gegenwart von Cycloheximid weist jedoch auf einen beschleunigten Abbau des Glucosetransporters hin.

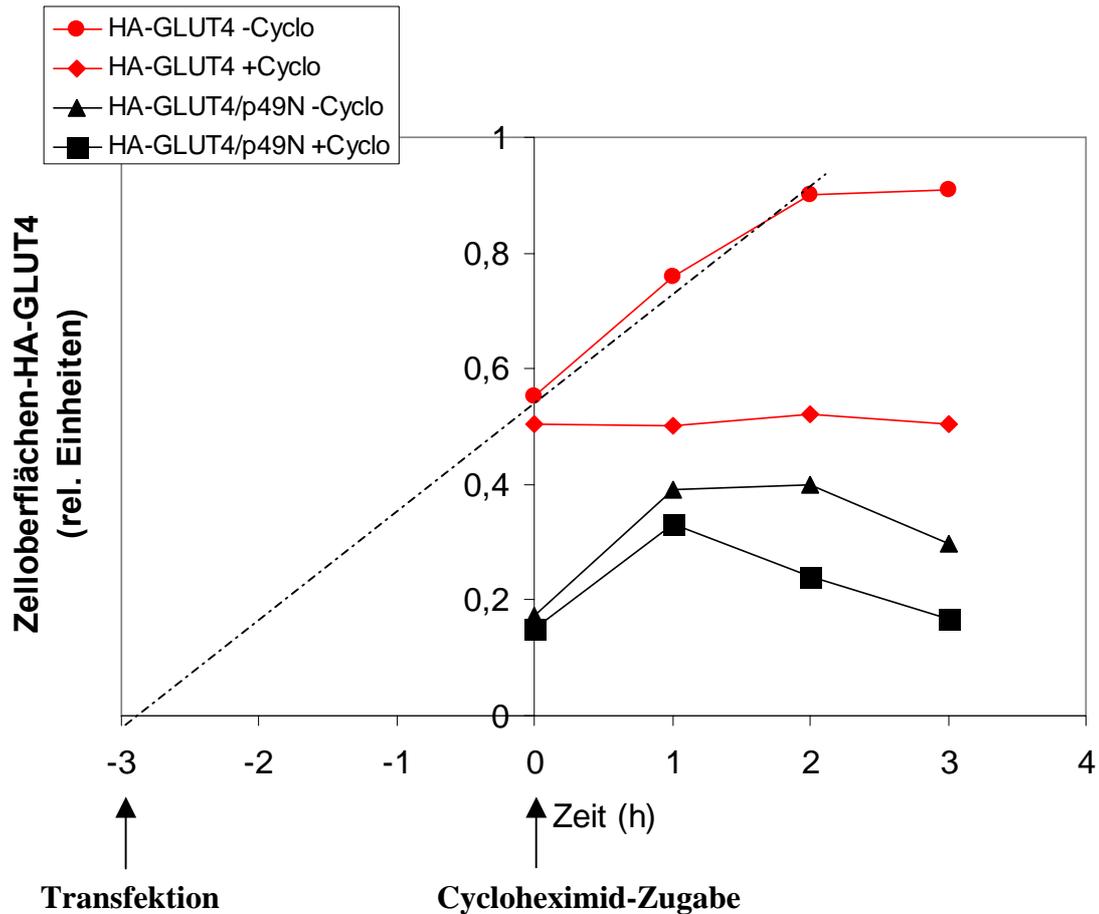


Abb. 2.13. Effekt von p49-N und Cycloheximid auf die syntheseabhängige GLUT4-Zelloberflächenexpression in Adipocyten.

Ratten-Adipocyten wurden mit HA-GLUT4 (0,5 μ m DNA/Küvette) und HA-GLUT4/p49-N (0,5 μ g HA-GLUT4; 5 μ g p49-N/Küvette) transfiziert und 3h kultiviert. Danach wurden die Adipocyten nach 0, 1, 2 und 3 Stunden mit 67nM Insulin stimuliert und mit 0 (-C.) oder 50 μ M (+C.) Cycloheximid inkubiert. Es wurde die HA-GLUT4-Zelloberflächenexpression nach 0, 1, 2 und 3h bestimmt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Einzelwerte wurden jeweils in Vierfachbestimmungen ermittelt. Der Versuch wurde insgesamt drei mal durchgeführt. C., Cycloheximid; G4, HA-GLUT4.

2.1.14. p49 weist eine Kolokalisation mit dem endoplasmatischen Retikulum (ER) in primären Ratten-Adipocyten auf

Wenn p49 eine Funktion bei der GLUT4-Synthese am ER besitzt, dann sollte eine p49/ER-Kolokalisation in primären Adipocyten detektierbar sein. Um diese mögliche p49/ER-Kolokalisation zu untersuchen, wurden ebenfalls in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Matsumoto primäre Adipocyten mit *myc*-markiertem p49 transfiziert (5µg/Küvette) und die Kolokalisation mit dem endogenen ER-Markerprotein Calnexin fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die transfizierten Adipocyten sind mit dem primären monoklonalen α -*myc*-Maus-Antikörper und mit dem sekundären polyklonalen FITC-gekoppelten Antikörper inkubiert worden, um *myc*-p49 zu detektieren. Der Nachweis des endogenen Calnexins erfolgte durch einen primären polyklonalen α -Kaninchen-Antikörper und sekundären polyklonalen Rhodamin-rot-X-gekoppelten Antikörper.

In Abbildung 2.14 wird gezeigt, dass die Fluoreszenzsignale von *myc*-p49 (grüne Fluoreszenz) und Calnexin (rote Fluoreszenz) im perinukleären Bereich partiell überlappen (gelbe Fluoreszenz). Dargestellt ist das 16te konfokale Fluoreszenzbild von insgesamt 28 Z-Ebenen. Dieses Ergebnis zeigt somit eine partielle Lokalisation von p49 im ER.

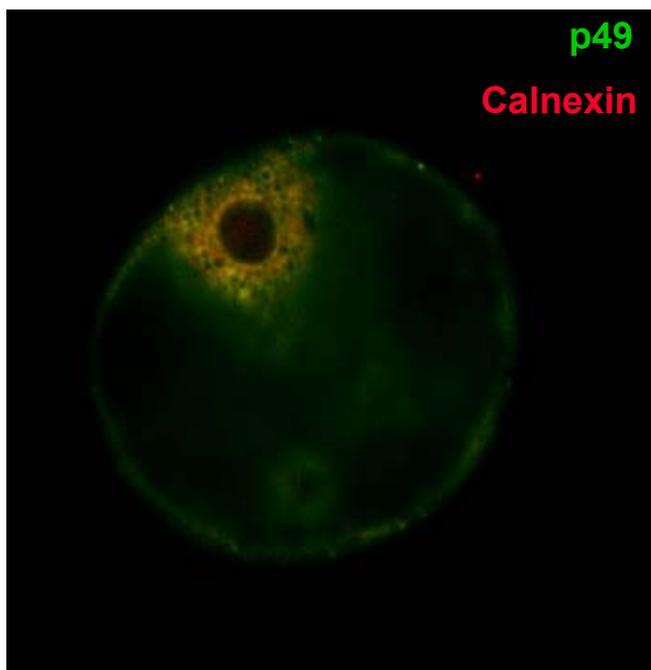


Abb.2.14. Kolokalisation von p49 mit dem endoplasmatischen Retikulum (ER)-Markerprotein Calnexin in primären Ratten-Adipocyten.

Die Zellen wurden mit *myc*-markiertem p49 (5µg/Küvette) transfiziert und für 16h bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Nach der Zellernte wurden die Adipocyten fixiert und *myc*-p49 mit einem primären monoklonalen α -*myc*-Maus-Antikörper sowie einem sekundären polyklonalen FITC-fluoreszenzmarkierten Antikörper nachgewiesen. Das endogene Calnexin wurde mit dem polyklonalen α -Kaninchen-Antikörper und dem sekundären polyklonalen Rhodamin-Rot-X-Antikörper fluoreszenzmikroskopisch detektiert. Die Kolokalisation von *myc*-p49 mit dem endogenen Calnexin wurde durch konfokale Immunofluoreszenzmikroskopie untersucht. Die gelbe Fluoreszenz markiert *myc*-p49/Calnexin-Kolokalisationsbereiche. Dargestellt ist das 16te konfokale Fluoreszenzbild von insgesamt 28 Z-Ebenen. Mikroskop : Nikon Optiphot-2-Fluoreszenzmikroskop.

2.1.15. Zusammenfassung der Ergebnisse (p49)

Ergebnisse zum p49-Protein :

- Um regulatorische Komponenten des GLUT4-Recyclings zu isolieren/identifizieren, wurde der GLUT4-N-Terminus als Köder verwendet, um eine Ratten-Adipocyten-cDNA-Bank im Hefe-Two-Hybrid-System nach GLUT4-interagierenden Klonen zu durchsuchen.
- Ein 19 kDa Fragment eines Proteins (p19) wurde als GLUT4-Bindepotner identifiziert und das entsprechende Vollängen-Protein, ein neuartiges 49 kDa Protein (p49) anschließend aus einer Mausgehirn-cDNA-Bank kloniert.
- p49-Orthologe wurde in Säugern (Mensch, Maus, Ratte, Rind und Schaf) gefunden. Die p49-mRNA wurde in Zusammenarbeit mit Frau Prof. Schürmann unter anderem in insulinresistenten Geweben der Maus (Muskel und Fett) lokalisiert. Proteine mit schwacher Homologie zu p49 finden sich in *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster*.
- Das p49-Protein ist stark basisch (pI 9,5) und der Primärsequenz nach löslich. P49 enthält drei helikale Regionen im N-Terminus, die vermutlich Coiled-coil-Domänen ausbilden (Lupas-Algorithmus). Im C-Terminus findet sich eine speziesspezifische Bindestelle für SH3-Proteine (PxxP).
- P49 bindet *in vivo* und *in vitro* an GLUT4. Der Sättigungsverlauf der Bindung von GST-p49 an den immobilisierten N-Terminus von GLUT4 zeigt eine sigmoidale Form, die auf eine Oligomerisierung von p49 hindeutet.
- Die Aminosäuresequenz „QIGSEDG“ im GLUT4-N-Terminus wurde als Bindemotiv für p49 identifiziert. Die beiden sauren Aminosäuren, Glu-11 und Asp-12 im GLUT4-N-Terminus sind essentiell für die Bindung von p49: Der Austausch Glu/Asp→Gln/Asn verhindert die Interaktion von p49 und GLUT4.
- Mit Hilfe von Ultrazentrifugation und Westernblotanalysen wurde demonstriert, dass p49 *in vivo* mit Membranen assoziiert vorliegt. Die Membranbindung von p49 ist unabhängig von der Bindung an den membrangebundenen GLUT4.
- Durch konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie von primären Ratten-Adipocyten wurde nachgewiesen, dass *myc*-epitopmarkiertes p49-Protein sowohl mit GLUT4 als auch mit dem endoplasmatischen Retikulum (ER)-Markerprotein Calnexin kolokalisiert.
- Durch die Überexpression von p19, p49-N und p49 in primären Ratten-Adipocyten wird die HA-GLUT4-Zelloberflächenexpression um ca. 50% gehemmt, während die Zelloberflächenexpression eines Kontrollproteins (HA-GLUT8) nicht verändert wird. Die insulinstimulierte Translokation von HA-GLUT4 zur Plasmamembran wird jedoch nicht beeinflusst. Der inhibitorische Effekt von p49 geht auf eine Reduktion der HA-GLUT4-Menge in den Zellen zurück, was auf eine verminderte Synthese und/oder einen vermehrten Abbau des Reporterproteins schließen lässt.
- Eine p49-bindedefiziente HA-GLUT4-Mutante (GLUT4-(ED/QN)) zeigt ebenfalls eine um ca. 50% verminderte Zelloberflächenexpression, bedingt durch eine niedrigere Expression des Proteins in Adipocyten.

- Versuche zur Bestimmung des *turn-overs* von HA-GLUT4 mit dem Proteinsyntheseinhibitor Cycloheximid deuten auf eine erhöhte Abbaugeschwindigkeit von HA-GLUT4 in p49-überexprimierenden Zellen hin.
- In Adipocyten kolokalisiert p49 partiell mit dem ER-Markerprotein Calnexin, was auf eine mögliche Involvierung von p49 bei der Synthese von GLUT4 schließen lässt.

2.2 GLUT6 und GLUT8. Charakterisierung zweier neuartiger Glucosetransporter in Ratten-Adipocyten.

2.2.1. GLUT4-*null*-(*knockout*) Mäuse und neuartige Glucosetransporter

Die Pathophysiologie des Typ-2 *Diabetes mellitus* (NIDDM) beruht auf einer Insulinresistenz der Glucoseaufnahme und Glucoseverwertung in Muskel- und Fettgewebe (Kahn et al., 1995; Kahn et al., 1996). In Fett- und Muskelgewebe ist GLUT4 die dominante Glucosetransporter-Isoform und hauptverantwortlich für den insulinstimulierten Glucosetransport und die Glucosehomöostase (Kahn, 1995). Überraschenderweise zeigte sich jedoch, dass GLUT4-*null* Mäuse zwar Abnormalitäten im Glucose- und Lipidmetabolismus aufwiesen, entgegen aller Erwartung jedoch nicht diabetisch waren (Katz et al., 1995). Der Blutglucosespiegel von GLUT4-*null* Mäusen ist normal, auch die Glucosetoleranz ist unverändert gegenüber dem Wildtyp. Allerdings weisen die GLUT4-*null* Mäuse deutliche Merkmale einer Insulinresistenz auf. Die basale und insulinstimulierte Glucoseaufnahme von *Soleus*- and *EDL*- Muskelfasern *in vitro* konnte durch Cytochalasin B, einem Inhibitor der GLUT-Glucosetransporter, gehemmt werden (Ryder et al., 1999). Weitere Untersuchungen haben geklärt, dass keiner der bisher bekannten GLUTs bzw. Natrium-gekoppelter Glucosetransporter in den Muskelzellen heraufreguliert wurde. Diese Ergebnisse legten den Schluss nahe, dass in GLUT4-*null* Mäusen die Expression weiterer, bisher unbekannter Glucosetransporter für die beobachtete Euglykämie der Tiere verantwortlich ist.

Fünf Jahre später wurden in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Hans Joost an der RWTH Aachen die cDNAs zweier weiterer, neuartiger Glucosetransporter, GLUT6 (umbenannter GLUT9) und GLUT8, kloniert (Doege et al., 2000). GLUT4, GLUT6 und GLUT8 sind zu 25-35% identisch zueinander und transportieren Glucose in *in vitro*-rekonstituierten Vesikeln. GLUT8 wird endogen in Fett- und Muskelgewebe, GLUT6 in Leukocyten und im Gehirn exprimiert.

Um der Frage nachzugehen, ob der von Ryder et al (Ryder et al., 1999) beobachtete insulinstimulierbare Glucosetransport in *Soleus*-Muskelfasern der GLUT4-*null* Mäuse auf die Expression von kompensatorisch wirkenden GLUTs (wie GLUT6 bzw. GLUT8) zurückzuführen sein könnte, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit die beiden neuartigen GLUTs in Adipocyten exprimiert und charakterisiert. Die Arbeiten erfolgten in Zusammenarbeit mit den Arbeitsgruppen von **Herrn Prof. Hans Joost (RWTH Aachen)** und **Herrn Dr. Samuel Cusman (NIH, Bethesda, USA)**.

2.2.2. Konstruktion epitopmarkierter GLUTs

Um GLUT6 und GLUT8 auf der Oberfläche von intakten Adipocyten detektieren zu können, wurde eine Hämagglutinin-Epitopmarkierung (HA) in den großen extrazellulären Loop (Loop9) beider GLUTs kloniert (Abb. 2.14B). Zunächst wurde durch gerichtete PCR-Mutagenese eine einzigartige NcoI-Restriktionsenzymstichstelle in die Loop9-cDNA-Sequenz von GLUT6 und GLUT8 eingefügt. Anschließend erfolgte die Ligation eines synthetisch hergestellten doppelsträngigen Oligonukleotids (27-mer) für das Hämagglutinin-(HA)-Peptid (SYPYDVPDYA) in diese Schnittstelle. Eine weitere einzigartige AatII-Restriktionsschnittstelle im HA-Oligonukleotid diente der Identifizierung der positiven Klone nach der Ligation. HA-GLUT6/8 sind in den HindIII/EcoRI-geschnittenen pcDNA3-Expressionsvektor ligiert worden. Die so erhaltenen DNA-Konstrukte für HA-GLUT6 und HA-GLUT8 wurden durch DNA-Sequenzierung verifiziert. Die resultierenden Aminosäuresequenzen der epitopmarkierten extrazellulären Loops sind in Abb. 2.14A aufgeführt.

GLUT4: NH₂-SYNETWLGRQGP[SYPYDVPDYA]EGPSSIPP-COOH

GLUT1: NH₂-NQTWVHRYGES[SYPYDVPDYA]ILPTTLTTL-COOH

GLUT8: NH₂-PSNSSHVGVPPIA[SYPYDVPDYA]GGACGC-COOH

GLUT6: NH₂-PLSPNSTAGLES[SYPYDVPDYA]WGDLAQ-COOH

Abb. 2.14A. Aminosäuresequenzen der epitopmarkierten extrazellulären Loops von HA-GLUT4, HA-GLUT1 und HA-GLUT8.

Die Position und Aminosäuresequenz des eingefügten HA-Epitops [SYPYDVPDYA] ist hervorgehoben.

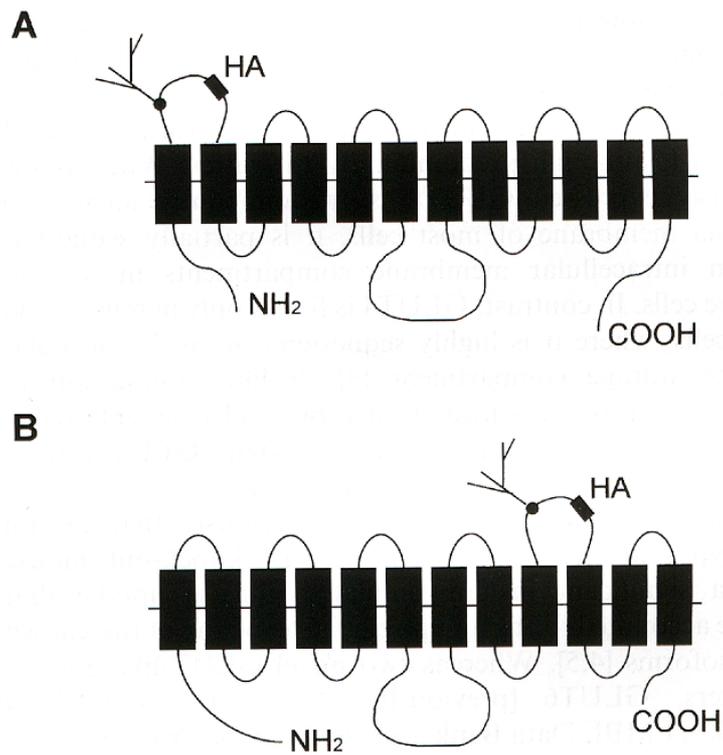


Abb. 2.14B. Membran-Topologie von (A) GLUT4 und GLUT1, (B) GLUT6 und GLUT8. Die Lokalisation der putativen Glykosylierungsstelle und des Epitopmarkers (HA) ist angezeigt. Die HA-Epitopmarker sind extrazellulär lokalisiert, während die N- und C-Termini im Zellinneren exponiert sind. Die HA-Aminosäuresequenz: SYPYDVPDYA.

2.2.3. Zelloberflächenexpression von Wildtyp-(HA)-GLUT6 und Wildtyp-(HA)-GLUT8 in primären Adipocyten

Das Einfügen von HA-Epitopmarkern in die extrazellulären Loops von GLUT6 und GLUT8 ermöglichte es, die Transporter mit Hilfe des radioaktiven Antikörperbindungsnachweises auf der Zelloberfläche von intakten Adipocyten zu detektieren. Für diesen Nachweis wurde epididymales Fettgewebe aus Ratten entnommen und 1-2 h mit Collagenase inkubiert. Die aus dem Zellverband gelösten Adipocyten wurden schließlich mehrmals in KRBH-Puffer/BSA gewaschen (s. Methodenteil 4.3.2. und 4.3.3./ s. Einleitung 1.4.2.). Anschließend erfolgte die Transfektion der Zellen mit den Expressionplasmiden (pcDNA3-(HA)-GLUT6/8) durch Elektroporation (500V/cm für 3x12msec). Nach der Kultivierung der Zellen in Petrischalen (16 h bei 37°C und 5% CO₂) erfolgte der radioaktive Antikörperbindungsnachweis. Dafür wurden die Zellen geerntet, in Eppendorfgefäße überführt und für 30 min. bei 37°C ± Insulin (i.d.R. 67 nM) inkubiert. Die anschließende Zugabe von Kaliumzyanid (2 mM) inhibiert das Recycling von Membranproteinen ohne die Zellen zu zerstören. Schließlich wurde die Zellexpression der HA-Epitopmarkierung durch einen Antikörperbindungsnachweis quantifiziert. Dazu wurden die Zellen zuerst mit einem monoklonalen α -HA-Antikörper (1:1000) für 1 h inkubiert. Nach einem Waschschrift, der überschüssige Antikörper entfernt, wurden die Zellen mit einem zweiten Antikörper, ¹²⁵I-markiertem Schaf-Anti-Maus (¹²⁵I-Sham, 0.1 μ Ci/Probe) für 1 h inkubiert. Der überschüssige sekundäre Antikörper ist schließlich durch Zentrifugation der Zellen durch Dinonylphtalat-Öl entfernt worden. Die Bestimmung der Zelloberflächen-assoziierten Radioaktivität (proportional zur Menge des HA-Epitops) erfolgte anschließend durch Messung der Zellen im γ -Counter. Als negativ-Kontrolle wurde der leere Expressionsvektor eingesetzt und die mit dieser Probe erhaltene Hintergrundstrahlung (ca. 300 cpm/Probe, ca. 5% des maximalen Signals) wurde von allen anderen Werten abgezogen (spezifische Bindung). Parallel zum Antikörperbindungsnachweises wurde die Expression der rekombinanten HA-GLUT-Proteine durch Westernblot-Analysen quantifiziert. Als primärer Antikörper für den Westernblot diente der gleiche monoklonale α -HA-Antikörper wie für den Bindungsversuch. Als sekundäres Reagenz wurde ¹²⁵I-markiertes Protein-A verwendet. Die Auswertung der Blots erfolgte durch Verwendung eines Phosphor-Imagers. Abbildung 2.15 demonstriert das Ergebnis der Transfektionsstudien.

Wie erwartet bewirkt die Insulinstimulierung der mit HA-GLUT4 transfizierten Ratten-Adipocyten eine ca. 3-fache Erhöhung der Menge an HA-GLUT4 an der Zelloberfläche (Translokation). Im Gegensatz dazu steigt nach Insulinstimulierung die HA-GLUT1-Zelloberflächenexpression nur gering (ca. 0,5-fach) an. Überraschenderweise erreichte die Menge an HA-GLUT6 und HA-GLUT8 auf der Zelloberfläche von nichtstimulierten Adipocyten nur 30% des Wertes für HA-GLUT4, trotz 2-fach höherer Expression der HA-markierten Proteine (Abb. 2.15). Die Insulinstimulierung der Adipocyten führte im Gegensatz zu HA-GLUT4 zu keiner statistisch signifikanten Erhöhung der Zelloberflächenexpression bei HA-GLUT6 und HA-GLUT8 (Abb. 2.15). Bezogen auf die relative Proteinexpression für die HA-GLUTs bedeutet dies, dass der größte Anteil (ca. 95%) von HA-GLUT6/8 intrazellulär lokalisiert ist.

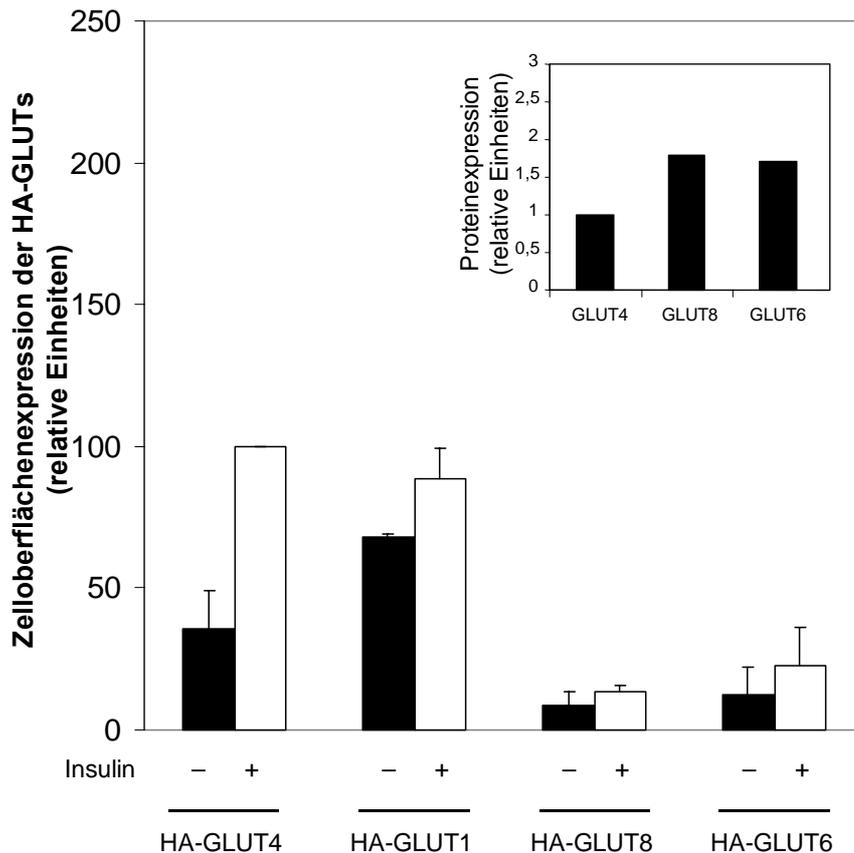


Abb. 2.15. Zelloberflächenexpression der Wildtyp-HA-GLUTs in Ratten-Adipocyten.

Isolierte primäre Adipocyten wurden mit 0,5 µg HA-GLUT-Plasmid/Küvette transfiziert und für 16 h bei 37°C kultiviert. Danach wurden die Zellen für 30 min. ± 67 nM Insulin stimuliert, und die Zelloberflächenrate der HA-GLUTs ist mittels eines Zelloberflächenbindungs nachweises bestimmt worden. Die Zelloberflächen-assoziierte Radioaktivität wurde auf den insulinstimulierten HA-GLUT4-Wert normiert. Die Abbildung zeigt die Werte ± S.D. von Doppel- und Vierer-Bestimmungen in 3-10 unabhängigen Experimenten. *P < 0.05 (Student T-Test) basal versus Insulin-stimuliert.

Einsatz: Relative Proteinexpression der HA-GLUTs, bestimmt durch Westernblot mit dem α-HA-Antikörper.

Das Ergebnis demonstriert, dass zumindest in Ratten-Adipocyten GLUT6 und GLUT8 keiner insulinstimulierten Translokation unterliegen. Die sehr geringe Zelloberflächenexpression der beiden Transporter ließ jedoch vermuten, dass GLUT6 und GLUT8 in Adipocyten vorwiegend intrazellulär lokalisiert sind.

2.2.4. Zelloberflächenexpression der (HA)-GLUT6/8-(LL/AA)-Mutanten in primären Adipocyten

HA-GLUT6 und GLUT8 enthalten N-terminale Dileucin Motive, die an der intrazellulären Retention der Proteine beteiligt sein könnten (Abb. 2.16). Um diese Hypothese zu prüfen wurde das (LL)-Motiv durch gerichtete PCR-Mutagenese zu Alanin (LL/AA) mutiert und die Translokation der HA-GLUT6/8-(LL/AA)-Mutanten ebenfalls in primären Adipocyten charakterisiert.

GLUT4: MPSGFQQIGSEEDGEPPQQRVTGTL
 GLUT6: MQEP[LL]GAEGPDYDTFPEKPPSPGDRARVGTQLQNKR
 GLUT8: MTPEDPEETQP[LL]GPPGGSAPRGRR

Abb. 2.16. Cytoplasmatische Aminosäuresequenz des N-Terminus von GLUT4, GLUT6 und GLUT8.

Das Dileucin-Motiv (LL-Motiv) in GLUT6 und GLUT8 ist markiert.

Die so erhaltenen Expressionsplasmide für die HA-GLUT6/8-(LL/AA)-Mutanten wurden wie oben beschrieben für die Transfektion von Adipocyten verwendet. Die parallel durchgeführte Quantifizierung der rekombinanten Transporter erfolgte wiederum durch Western-Blot-Analysen von Adipocyten-Lysaten. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abb. 2.17 dargestellt.

Die Mutation des (LL)-Motivs in HA-GLUT6/8 führte in Adipocyten zu einem dramatischen Anstieg (>10-fach) der Zelloberflächenexpression gegenüber den Wildtyp-Transportern. Offenbar bewirkt der (LL/AA)-Austausch eine völlige Umkehrung der zellulären Lokalisation der GLUTs. Während sich HA-GLUT6/8 in Adipocyten überwiegend in intrazellulären Kompartimenten befinden, werden die korrespondierenden (LL/AA)-Mutanten überwiegend auf der Plasmamembran exprimiert. Gleichzeitig bewirkt die (LL/AA)-Mutation eine deutliche Steigerung der Proteinexpression (1,5-fach Wildtyp-GLUT6/8 versus 2,5-fach (LL/AA)-GLUT6/8 versus 1-fach GLUT4). Eine insulinstimulierte Translokation der (LL/AA)-mutierten Transporter wurde, ebenso wie für die Wildtyp-Transporter nicht nachgewiesen.

Zusammenfassend belegen die Daten einen inhibitorischen Effekt der (LL)-Motive von HA-GLUT6 und HA-GLUT8 auf die Zelloberflächenexpression in Adipocyten. Da die relative Zelloberflächenexpression von Membranproteinen vom Verhältnis der Geschwindigkeiten von Exocytose und Endocytose abhängt ergeben sich zwei Möglichkeiten für die Funktion des (LL)-Motivs: a) Retention: Das (LL)-Motiv könnte mit einem zellulären Retentionsmechanismus interagieren, der die intrazelluläre Lokalisation der GLUTs bewirkt b) Internalisierung: Das (LL)-Motiv könnte ein Erkennungssignal für die Endocytose der GLUTs darstellen. In Folge würde die Mutation des (LL)-Motivs zur verminderten Internalisierung und zur Akkumulation der Transporter auf der Plasmamembran führen. Dieser Mechanismus impliziert ein konstitutives Recycling der Transporter.

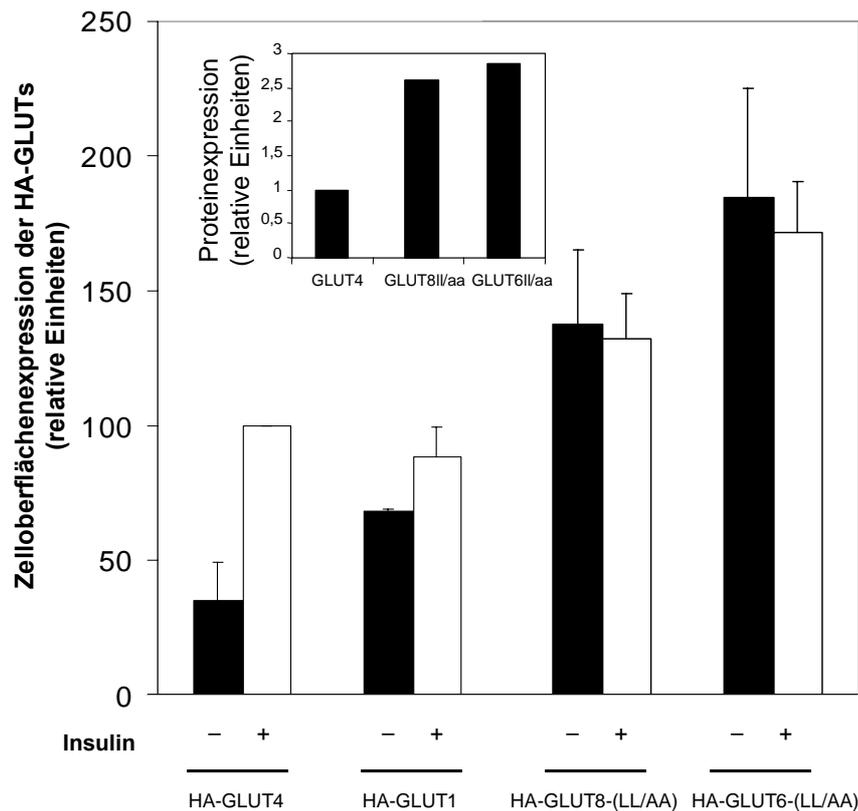


Abb. 2.17. Zelloberflächenexpression der HA-GLUT-(LL/AA)-Mutanten in Ratten-Adipocyten.

Isolierte primäre Adipocyten wurden mit 0,5 µg HA-GLUT-(LL/AA)-Plasmid/Küvette transfiziert und für 16 h bei 37°C kultiviert. Danach wurden die Zellen für 30 min. ± 67 nM Insulin stimuliert und die Zelloberflächenrate der HA-GLUTs ist mittels eines Zelloberflächenbindungsnachweises bestimmt worden. Die Zelloberflächen-assoziierte Radioaktivität wurde auf den insulinstimulierten HA-GLUT4-Wert normiert. Die Abbildung zeigt die Werte ± S.D. von Doppel- und Vierer-Bestimmungen in 3-10 unabhängigen Experimenten. *P < 0.05 (Student T-Test) basal versus Insulin-stimuliert.

Einsatz: Relativer Proteinexpressionslevel von HA-GLUTs.

Bestimmt durch Westernblot mit dem α-HA-Antikörper.

2.2.5. Koexpression der HA-GLUTs mit der dominant-negativen Dynamin-(K44A)-Mutante (GTPase)

Um zu untersuchen, ob die HA-GLUT6/8-Transporter einem Recycling unterliegen, wurde die Endocytose durch Koexpression mit der dominant-negativen Dynamin-(K44A)-Mutante blockiert. Die Dynamin-GTPase (*D. melanogaster*, *Shibire*'-Produkt) katalysiert vermutlich den letzten Schritt der Endocytose, das Abschnüren von Clathrin- und Caveolin-coated Vesikeln an der Plasmamembran (Henley et al., 1999). Die Dynamin-(K44A)-Mutante ist eine GTP-bindedefiziente Mutante, die in dominant-negativer Weise die Funktion des endogenen Dynamins inhibiert (Sweitzer und Hinshaw, 1998). Es wurde bereits demonstriert, dass Dynamin-(K44A)-Expression in Adipocyten die Endocytose von GLUT4 hemmt und zur Akkumulation von GLUT4 auf der Plasmamembran führt (Al-Hasani et al., 2001). Analog dazu sollte eine erhöhte HA-GLUT6/8-Plasmamembranlokalisation nach Kotransfektion mit Dynamin-(K44A) zu beobachten sein, falls HA-GLUT6/8-Transporter

in primären Adipocyten recyceln. Die Ergebnisse der Dynamin-(K44A)-Koexpression sind in Abb. 2.18. dargestellt.

Wie in der Abbildung dargestellt, führt die Koexpression von HA-GLUT4 mit Dynamin-(K44A) zu einem dramatischen Anstieg der Zelloberflächenexpression. Die HA-GLUT4-Zelloberflächenexpression in unstimulierten (basalen) Adipocyten betrug ca. 38%, in insulinstimulierten Adipocyten 100% und in Dynamin-(K44A)-stimulierten Zellen ca. 125%. Somit bewirkte die Dynamin-(K44A)-Mutante eine höhere HA-GLUT4-Zelloberflächenexpression als die Insulinstimulierung. Die Koexpression von Dynamin-(K44A) mit Wildtyp-GLUT8 führte im Vergleich zur Wildtyp-GLUT8-Kontrolle ohne Dynamin-(K44A) zu einem 5-fachen Anstieg in der Zelloberflächenexpression (Abb. 2.18.). Einen ähnlichen Effekt auf die Zelloberflächenexpression hatte der Wildtyp-GLUT6-Transporter, der mit Dynamin-(K44A) kotransfiziert wurde. Es konnte ebenfalls ein deutlicher (2.5-fach) Anstieg der Wildtyp-GLUT6-Zelloberflächenexpression detektiert werden (Abb. 2.18.). Die durchgeführten Westernblotanalysen demonstrierten, dass die Proteinexpression von Wildtyp-GLUT6 und Wildtyp-GLUT8 im Vergleich mit Dynamin-(K44A)/Wildtyp-GLUT6/8 kotransfizierten Adipocyten nur minimal reduziert worden ist (Abb. 2.18.). Es ist weiterhin auffällig, dass Zellen, die mit Dynamin-(K44A) kotransfiziert wurden, die Zelloberflächenexpression von Wildtyp-GLUT6/8 deutlich erhöhen konnten, aber nicht die GLUT6/8-(LL/AA)-Zelloberflächenexpressionsrate erreichten.

Im Gegensatz zu den Wildtyp-HA-GLUT6/8-Transportern hatte die Dynamin-(K44A)-Mutante keinen Einfluss auf die Zelloberflächenexpression der HA-GLUT6/8-(LL/AA)-Mutanten (Daten nicht gezeigt). Dies lässt vermuten, dass die (LL/AA)-Mutanten bereits vollständig an der Zelloberfläche exprimiert waren und eine Hemmung der Endocytose durch Dynamin-(K44A) hatte somit keinen weiteren Effekt auf die Plasmamembranexpression.

Durch diese Ergebnisse wurde demonstriert, dass die HA-GLUT6/8-Transporter in einem Dynamin-abhängigen Prozess zwischen internen Kompartimenten und der Plasmamembran recyceln. Im Gegensatz dazu wiesen die (LL/AA)-Mutanten eine vollständige Plasmamembranlokalisation auf, wobei die Koexpression mit Dynamin-(K44A) keinen Einfluß ausübte.

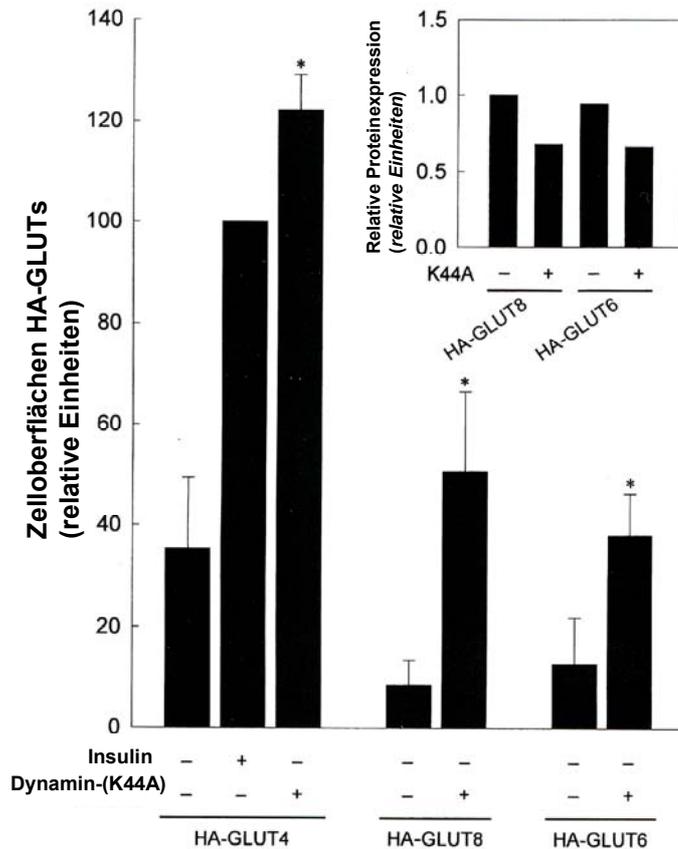


Abb. 2.18. Koexpression der HA-GLUTs mit Dynamin-(K44A).

Isolierte Adipocyten wurden mit 0,5 μ g HA-GLUT-Plasmid/Küvette und 0 (-) oder 4,5 (+) μ g Dynamin-K44A-Plasmid/Küvette kotransfiziert und für 16 h bei 37°C kultiviert. Danach wurden die Zellen für 30 min. (basal) oder mit 67 nM Insulin stimuliert. Der Zelloberflächenexpressionslevel wurde durch Westernblot mit dem α -HA-Antikörper bestimmt. Die Zelloberflächen-assoziierte Radioaktivität wurde auf den insulinstimulierten HA-GLUT4-Wert normiert. Die Abbildung zeigt die Werte \pm S.D. von Doppel- und Dreier-Bestimmungen in 2-3 unabhängigen Experimenten. * $P < 0.05$ (Student T-Test) basal versus Dynamin-(K44A)-kotransfizierte Zellen.

Einsatz: Relative Proteinexpression von HA-GLUTs \pm Dynamin-(K44A).

Bestimmt durch Westernblot mit dem α -HA-Antikörper.

2.2.6. Subzelluläre Verteilung von HA-GLUT8 in COS-7 Zellen

In den bisher vorgestellten Experimenten konnte demonstriert werden, dass GLUT6 und GLUT8 einem Recycling zwischen intrazellulären Kompartimenten und der Plasmamembran unterliegen, dass von einem N-terminalen *Tageting*-Signal (LL) und der GTPase Dynamin reguliert wird. Um zu prüfen, ob dieser Befund auch in anderen Zelltypen reproduzierbar ist wurden in Zusammenarbeit mit Frau Prof. Annette Schürmann (RWTH Aachen) COS-7-Zellen mit HA-GLUT8 transfiziert und die subzelluläre Lokalisation der Transporter durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie bestimmt.

Im Experiment wurden COS-7-Zellen mit HA-GLUT8 transfiziert und nach 3 Tagen Inkubation für die Mikroskopie präpariert. Detergenz-permeabilisierte und nicht-permeabilisierte Zellen wurden auf Objektträgern fixiert und mit den primären Antikörpern, dem α -HA-Antikörper bzw. einem Antikörper gegen den GLUT8-C-Terminus inkubiert. Die Detektion des Antigen-Antikörper-Komplexes erfolgte anschließend mit einem sekundären Fluorescein-markierten Antikörper. In parallelen Ansätzen wurden weiterhin Dynamin-(K44A)-kotr transfizierte COS-7-Zellen analysiert. Die Ergebnisse der Versuche sind in Abb. 2.19 dargestellt.

In permeabilisierten HA-GLUT8-transfizierten Zellen demonstriert die GLUT8-Verteilung ein vom eingesetzten primären Antikörper abhängiges Muster. Der sekundäre Antikörper war fluoreszenzmarkiert und machte die HA-GLUT8-Lokalisation im konfokalen Laser-Analyse-Mikroskop (Leica TCS NT, Leica Microsystems, Heidelberg, Deutschland) detektierbar.

Die COS-7-Zellen, die den Wildtyp-HA-GLUT8 exprimierten, wiesen mit beiden Antikörpern ein punktuell verteiltes Verteilungsmuster auf, wobei HA-GLUT8 gehäuft in intrazellulären Membranen lokalisiert war. Der obere Pfeil im vierten Fluoreszenzbild weist auf Bereiche in der Plasmamembran. Es konnte demonstriert werden, dass nur wenig Wildtyp-HA-GLUT8 an der Plasmamembran lokalisiert war (s. obere 3 Fluoreszenzbilder in Abb. 2.19.). Die nicht-permeabilisierten COS-7-Zellen, die ebenfalls Wildtyp-HA-GLUT8 exprimierten, demonstrierten keine HA-Epitopinteraktion (s. oberes linkes Fluoreszenzbild in Abb. 2.19.). Im Gegensatz dazu wiesen permeabilisierte und nicht-permeabilisierte Zellen, die mit der HA-GLUT8-(LL/AA)-Mutante transfiziert wurden ein starkes Zelloberflächen-HA-Epitopsignal auf (s. mittlere 4 Fluoreszenzbilder in Abb. 2.19.). Die beiden Pfeile im mittleren vierten Fluoreszenzbild weisen ebenfalls auf Plasmamembranbereiche hin und es ist erkennbar, dass die Plasmamembranlokalisierung der HA-GLUT8-(LL/AA)-Mutante im Vergleich mit dem Wildtyp, deutlich stärker ausgeprägt ist. Somit entsprechen die fluoreszenzmikroskopischen Ergebnisse der HA-GLUT8-Lokalisation den erhaltenen Ergebnissen in primären Adipocyten. In beiden Zellsystemen war Wildtyp-HA-GLUT8 intrazellulär lokalisiert, während die (LL/AA)-Mutante an der Plasmamembran akkumulierte. Im Vergleich zu Adipocyten demonstrierten HA-GLUT8/Dynamin-(K44A)-kotr transfizierte COS-7-Zellen ebenfalls eine hohe HA-Zelloberflächenexpression (s. untere 4 Fluoreszenzbilder in Abb. 2.19.). Das Ergebnis wurde unter Verwendung beider GLUT8-Antikörper erhalten. Die erhaltenen Fluoreszenzbilder in Abbildung 2.19 weisen deutlich darauf hin, dass HA-GLUT8 auch in COS-7-Zellen recyceln kann. Somit ist das GLUT8-Recycling nicht ausschließlich in

Adipocyten, sondern auch in COS-7-Zellen nachgewiesen worden und stellt ein allgemeines Prinzip dar. Zusätzlich konnte demonstriert werden, dass die HA-GLUT8-(LL/AA)-Mutante zu einem großen Anteil an der Plasmamembran lokalisiert war, was ebenfalls auf die Funktion des HA-GLUT8-N-terminalen (LL)-Motivs als ein Reinternalisierungsmotiv hindeutet.

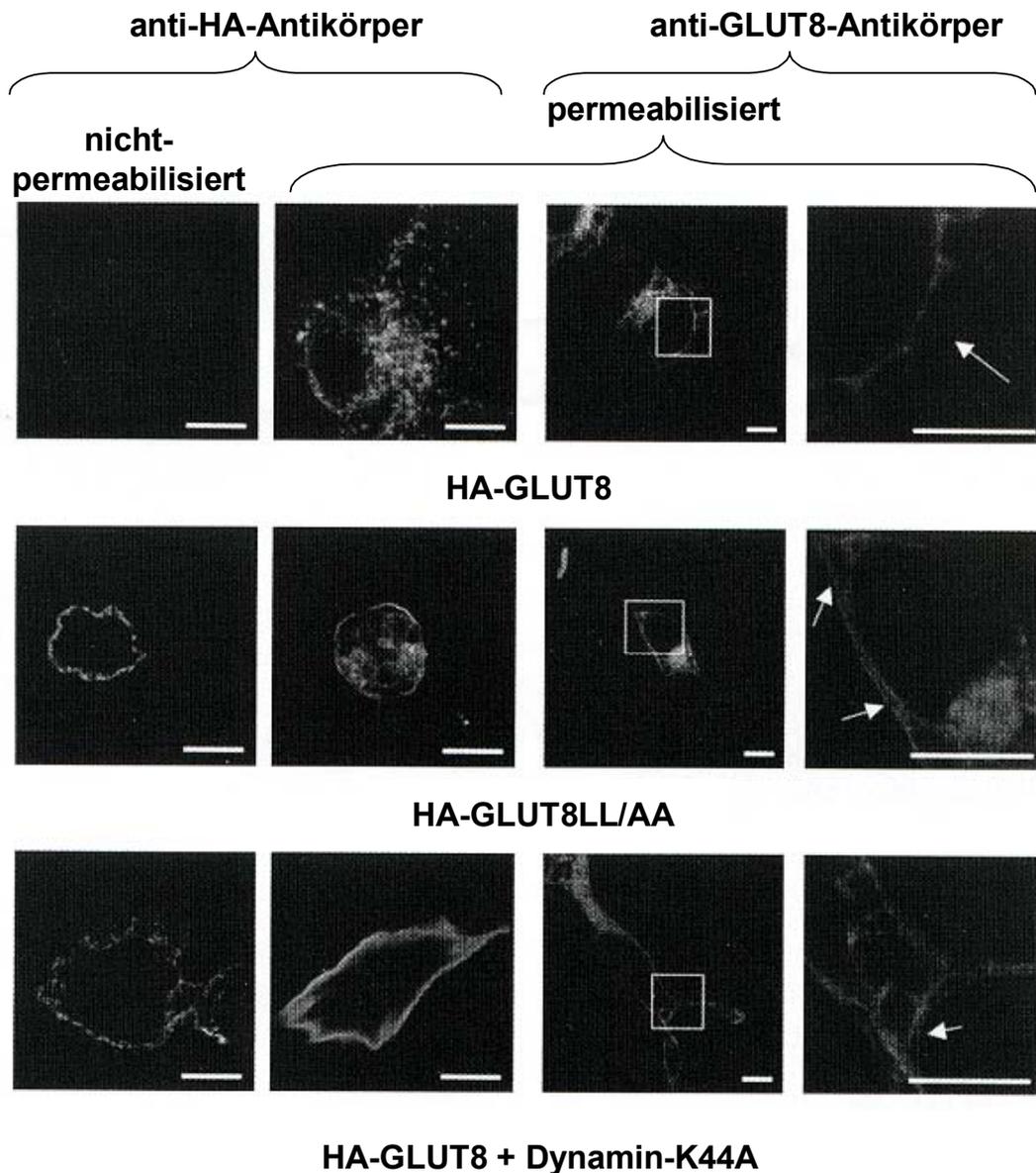


Abb. 2.19. Subzelluläre HA-GLUT8-Verteilung in COS-7-Zellen.

Die Zellen wurden mit HA-GLUT8 und HA-GLUT8-(LL/AA) transfiziert, sowie mit HA-GLUT8 und Dynamin-K44A kotransfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen permeabilisiert bzw. nicht-permeabilisiert und mit dem α -HA-Antikörper sowie dem α -GLUT8-Antikörper inkubiert. Die Analyse erfolgte durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie. Die Quadrate markieren Plasmamembranregionen, die in der rechten Spalte vergrößert gezeigt werden. Bereiche in der Plasmamembran werden durch Pfeile markiert.

2.2.7. Stimulierung der HA-GLUT-Translokation in Ratten-Adipocyten

Nachdem nachgewiesen wurde, dass die Translokation von HA-GLUT6 und HA-GLUT8 zur Plasmamembran nicht durch Insulin stimuliert wurde, sind weitere potentielle Stimuli für eine Translokation der HA-GLUTs untersucht worden. Ähnlich zum Insulin bewirkt die Stimulierung von Adipocyten mit Phorbolestern (PMA) oder hyperosmolaren Lösungen (Sorbitol, Mannitol) eine GLUT4-Translokation von intrazellulären Vesikeln zur Plasmamembran (Todaka et al., 1996; Chen et al., 1997). Für GLUT4 konnte nachgewiesen werden, dass PMA durch die Stimulierung der Proteinkinase-C-Aktivität die GLUT4-Translokation zur Plasmamembran verstärkt, während Hyperosmolarität vermutlich die Aktivierung von Tyrosinkinase (vermutlich Stresskinasen) bewirkt und teilweise mit dem Zellstresssignaltransduktionsweg überschneidet. Es wird vermutet, dass die PMA-sensitive Proteinkinase-C auch durch die Muskelglucoseaufnahme reguliert wird (Czech und Corvera, 1999). Hansen et al beobachteten eine 3-4-fache Stimulierung des Glucosetransports wenn sie isolierte Ratten-Muskelzellen mit Phorbolestern behandelten. Abbildung 2.20A demonstriert, dass eine 30-minütige Inkubation von primären Adipocyten mit 300mM Sorbitol (Hyperosmolarität) eine Translokation von HA-GLUT4 zur Plasmamembran zur Folge hat, die in ihrem Ausmaß dem der Insulinwirkung entspricht. Auch die Inkubation der Zellen mit PMA (1 μ M, 30 min) weist eine, im Vergleich zur Sorbitolstimulierung geringer ausgeprägte, Translokation von HA-GLUT4 zur Plasmamembran auf (Abb. 2.20A). Im Gegensatz zum GLUT4 bewirken Hyperosmolarität und PMA keinen Anstieg der Zelloberflächenexpression von HA-GLUT6 und HA-GLUT8.

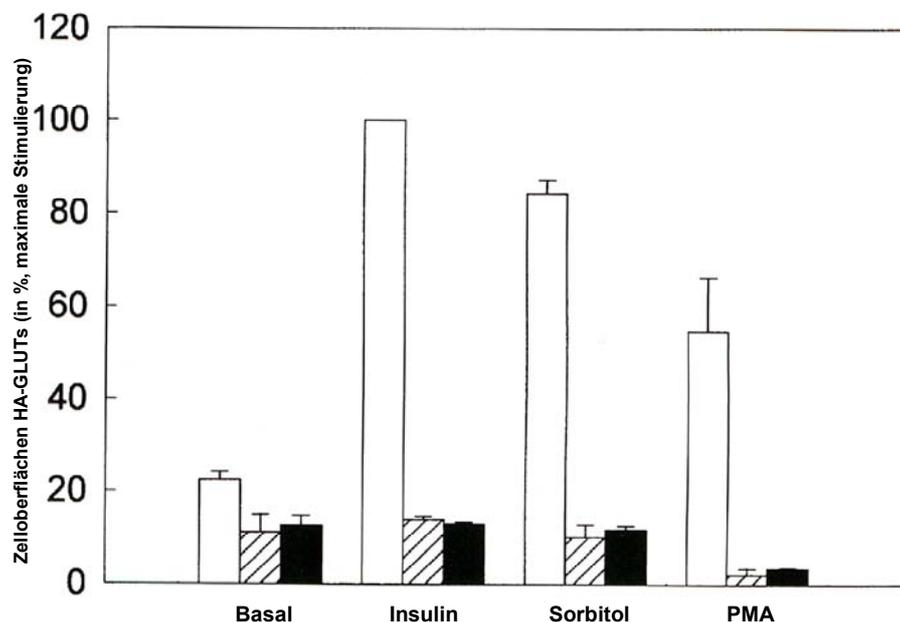


Abb. 2.20A. Zelloberflächenexpression von HA-GLUT4, HA-GLUT6 und HA-GLUT8 in Adipocyten.

Die Zelloberflächenexpression von HA-GLUT4 (leere Balken), HA-GLUT8 (gestreifte Balken) und HA-GLUT6 (schwarze Balken) wurde nach Stimulierung der transfizierten Ratten-Adipocyten mit 67 nM Insulin, 300mM Sorbitol und 1 μ M PMA für 30min. gemessen. Die Zelloberflächen-assoziierte Radioaktivität wurde auf den insulinstimulierten HA-GLUT4-Wert normiert. Die Abbildung zeigt die Werte \pm S.D. der Zelloberflächenexpression, der durch Doppel- und Vierer-Bestimmungen in einem repräsentativen Experiment bestimmt wurde.

Die GLUT4-Translokation wird neben PMA und Hyperosmolarität (Sorbitol, Mannose) auch durch Vasopressin, GTP γ S, Isoproterenol, Oxytocin und Peroxyvanadat stimuliert. Vasopressin und Oxytocin sind Hormone und stimulieren die GLUT4-Translokation vermutlich durch die intrazelluläre Mobilisierung von Ca²⁺ und die dadurch ausgelöste Aktivitätserhöhung verschiedener Proteinkinasen wie z.B. der Proteinkinase-C (PKC) und der Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K). Darüber hinaus kann Vasopressin auch Ca²⁺-unabhängige Signaltransduktionswege stimulieren. Lange et al. demonstrierten 1997, dass die Formierung von Mikrovillistrukturen (Cytoskelettkomponente) in direktem Zusammenhang mit dem Vasopressineffekt und somit auch mit der GLUT4-Translokation steht. Vasopressin stimuliert zusätzlich die Wasserresorption in der Niere. Elmendorf et al. konnten nachweisen, dass die GTP γ S-Behandlung von permeabilisierten Adipocyten zu einer deutlichen Steigerung der GLUT4-Zelloberflächenexpression führt. Es wird vermutet, dass GTP γ S die Proteinkinase-B-(Akt)-Aktivität steigert, indem es eine Reihe von Proteinkinasen (Proteinkinase-B, pp130 Crk-assoziiertes Substrat, Cbl und Paxillin) an Tyrosinresten phosphoryliert (Elmendorf et al., 1998). Interessanterweise konnte zusätzlich von Gillingham et al. demonstriert werden, dass in Zellfreien *in vitro*-Untersuchungen die Interaktion des AP-1-Komplexes mit GLUT4-Vesikeln um das 4-fache gesteigert ist, wenn GTP γ S und ein ATP-regenerierendes System hinzugefügt wird (Gillingham et al., 1999). Ferrara und Cushman zeigten 1999, dass Stimuli wie z.B. Isoproterenol (ISO) und Adenosindeaminase (ADA) die Aktivität von G-Proteinen stimulieren und dadurch die GLUT4-Exocytose an der Plasmamembran erhöhen. Wie in Abbildung 2.20B, C, D und E dargestellt, wurden HA-GLUT6 und HA-GLUT8 mit Vasopressin, Mannose, Oxytocin, GTP γ S und Isoproterenol/Adenosindeaminase stimuliert. Im Gegensatz zur GLUT4-Translokation wies keiner der bekannten GLUT4-Stimuli einen Einfluss auf die HA-GLUT6/8-Translokation in primären Adipocyten auf. Durch die eingesetzten Stimuli sind alle bekannten Signaltransduktionswege und GLUT4-Stimuli untersucht worden. Dieses Ergebnis demonstriert, dass die Stimulierung des HA-GLUT6- und HA-GLUT8-Recyclings in primären Adipocyten weiterhin unklar bleibt.

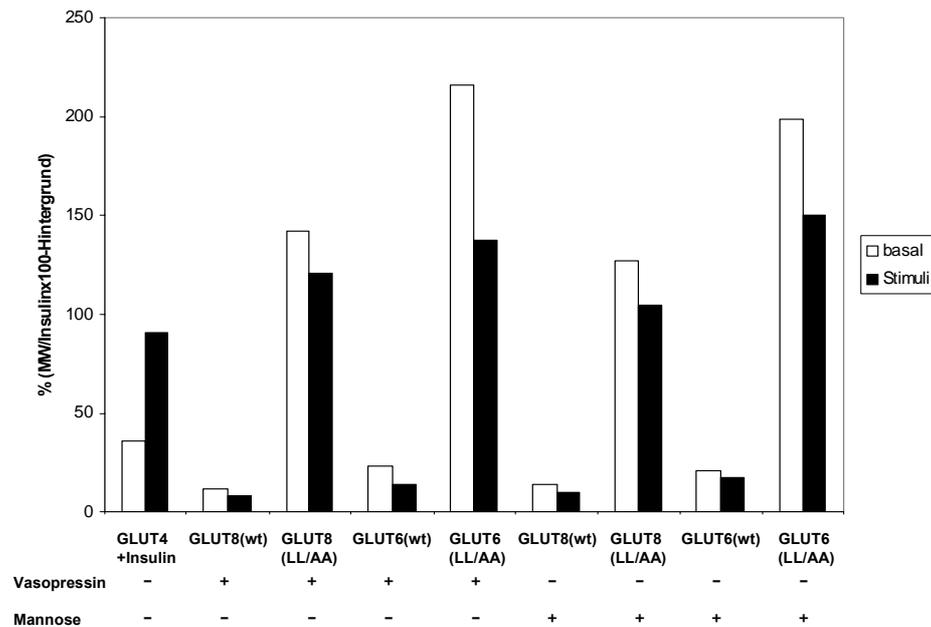


Abb. 2.20B. Zelloberflächenexpression von HA-GLUT4, HA-GLUT6 [(wt), (LL/AA)] und HA-GLUT8 [(wt), (LL/AA)] in Adipocyten.

Die Zelloberflächenexpression von HA-GLUT4 (basal, Insulin), HA-GLUT8 [(wt), (LL/AA)] und HA-GLUT6 [(wt), (LL/AA)] wurde nach Stimulierung der transfizierten Ratten-Adipocyten mit 67 nM Insulin, 300mM Mannitol und 10^{-9} M Vasopressin für 30min. gemessen. Die Zelloberflächen-assoziierte Radioaktivität wurde auf den insulinstimulierten HA-GLUT4-Wert normiert. Die Abbildung zeigt die Werte \pm S.D. die Zelloberflächenexpression, der durch Doppel-Bestimmungen in einem repräsentativen Experiment bestimmt wurde.

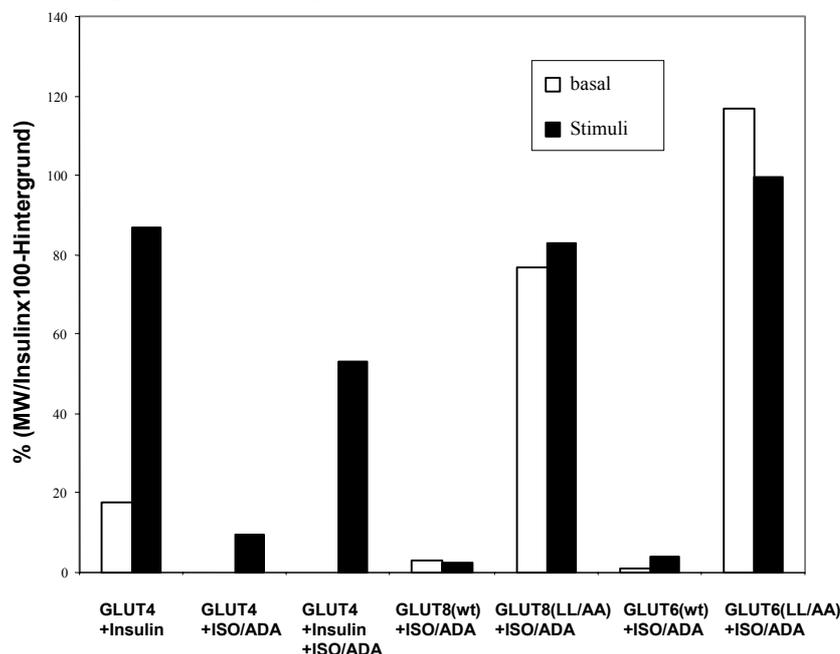


Abb. 2.20C. Zelloberflächenexpression von HA-GLUT4, HA-GLUT6 [(wt), (LL/AA)] und HA-GLUT8 [(wt), (LL/AA)] in Adipocyten.

Die Zelloberflächenexpression von HA-GLUT4 (basal, Insulin), HA-GLUT8 [(wt), (LL/AA)] und HA-GLUT6 [(wt), (LL/AA)] wurde nach Stimulierung der transfizierten Ratten-Adipocyten mit 67 nM Insulin, 200nM Isoproterenol (ISO) und 1Unit/ml Adenosindiaminase (ADA) für 30min. gemessen. Die Zelloberflächen-assoziierte Radioaktivität wurde auf den insulinstimulierten HA-GLUT4-Wert normiert. Die Abbildung zeigt die Werte \pm S.D. die Zelloberflächenexpression, der durch Doppel-Bestimmungen in einem repräsentativen Experiment bestimmt wurde.

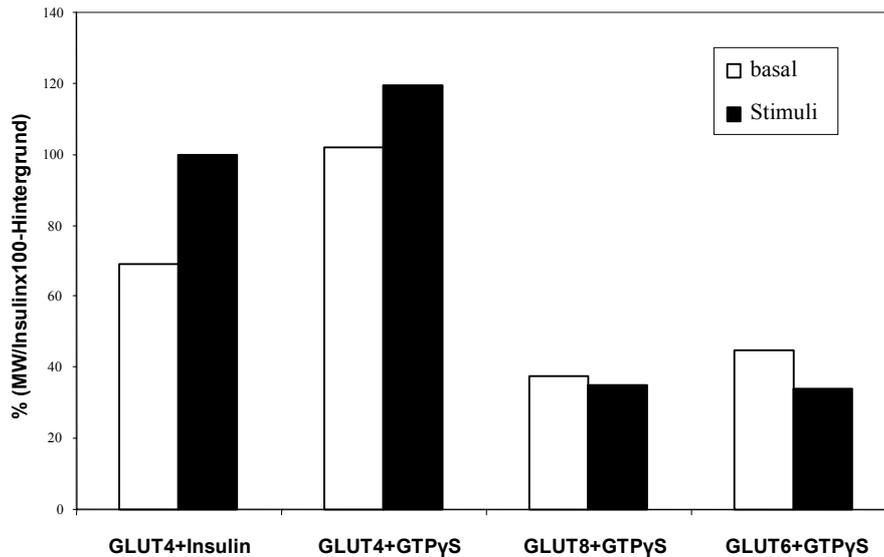


Abb. 2.20D. Zelloberflächenexpression von HA-GLUT4, HA-GLUT6-(wt) und HA-GLUT8-(wt) in Adipocyten. Die Zelloberflächenexpression von HA-GLUT4 (basal, Insulin), HA-GLUT8-(wt) und HA-GLUT6-(wt) wurde nach Stimulierung der transfizierten Ratten-Adipocyten mit 67 nM Insulin und 1mM GTP γ S (GTP(gamma)S) für 30min. gemessen. Die Zelloberflächen-assoziierte Radioaktivität wurde auf den insulinstimulierten HA-GLUT4-Wert normiert. Die Abbildung zeigt die Werte \pm S.D. die Zelloberflächenexpression, der durch Doppel-Bestimmungen in einem repräsentativen Experiment bestimmt wurde.

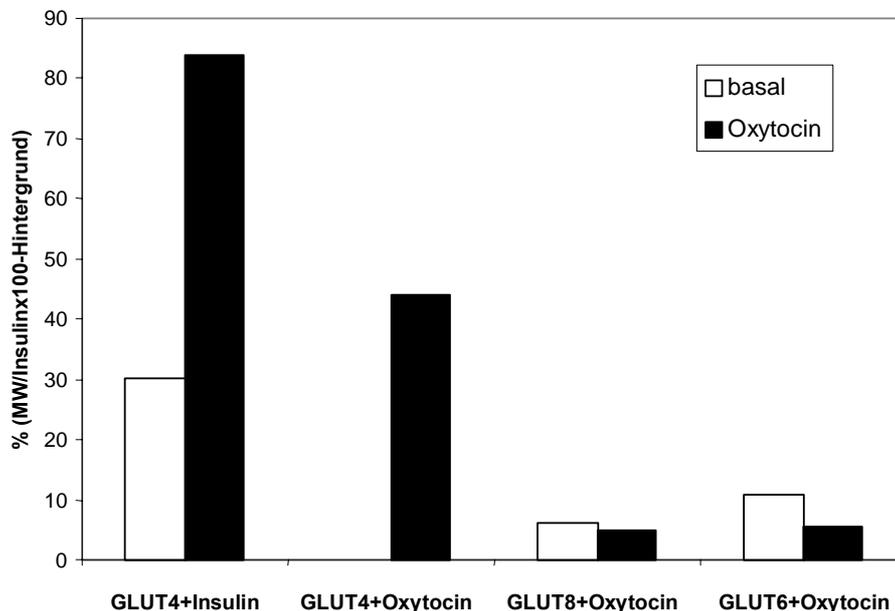


Abb. 2.20E. Zelloberflächenexpression von HA-GLUT4, HA-GLUT6-(wt) und HA-GLUT8-(wt) in Adipocyten.

Die Zelloberflächenexpression von HA-GLUT4 (basal, Insulin), HA-GLUT8-(wt) und HA-GLUT6-(wt) wurde nach Stimulierung der transfizierten Ratten-Adipocyten mit 67 nM Insulin und 10^{-8} M Oxytocin für 30min. gemessen. Die Zelloberflächen-assoziierte Radioaktivität wurde auf den insulinstimulierten HA-GLUT4-Wert normiert. Die Abbildung zeigt die Werte \pm S.D. die Zelloberflächenexpression, der durch Doppel-Bestimmungen in einem repräsentativen Experiment bestimmt wurde.

2.2.8. Zusammenfassung der Ergebnisse (GLUT6/8)

Charakterisierung der beiden neuartigen GLUT-Transporter, GLUT6 und GLUT8 :

- Es wurde ein Haemagglutinin-(HA)-Epitop-Marker in den Loop9 von GLUT6 und GLUT8 kloniert, um die beiden GLUT-Transporter mittels eines radioaktiven Antikörperbindungsassays auf der Plasmamembran von intakten Ratten-Adipocyten zu detektieren.
- Zusätzlich zu den Wildtyp-Transportern, die von Doege et al kloniert wurden, habe ich ein (LL)-Motiv im HA-GLUT6- und HA-GLUT8-N-Terminus mit Hilfe der gerichteten PCR-Mutagenese zu Alanin (LL→AA) mutiert. Das (LL)-Motiv ist ebenfalls im GLUT4-C-Terminus enthalten und ist in der Literatur als Reinternalisierungssignal beschrieben.
- Die Wildtyp-Transporter sowie die HA-GLUT6- und HA-GLUT8-(LL/AA)-Mutanten wurden in intakte primäre Ratten-Adipocyten transfiziert, und es wurde die GLUT-Zelloberflächenexpression +/- Insulin bestimmt. Als Kontrolle wurde die Zelloberflächenexpression von HA-GLUT4 und HA-GLUT1 ermittelt. Sowohl die beiden Wildtyp-HA-GLUT6- und HA-GLUT8-Transporter, als auch die beiden (LL/AA)-Mutanten, zeigten keinen Anstieg in der Zelloberflächenexpression nach Insulinstimulierung. Im Gegensatz zu der niedrigen Wildtyp-HA-GLUT6- und Wildtyp-HA-GLUT8-Zelloberflächenexpression war die Zelloberflächenexpression der (LL/AA)-Mutanten deutlich (ca. 100%) erhöht. → Dieses Ergebnis ist ein starker Hinweis, dass es sich bei dem HA-GLUT6/8-N-terminalen (LL)-Motiv um ein Reinternalisierungsmotiv handelt. Somit verhindert das (LL)-Motiv die HA-GLUT6/8-Translokation zur Plasmamembran.
- HA-GLUT6-(wt) und HA-GLUT8-(wt) wurden mit der dominant-negativen Dynamin-(K44A)-Mutante in Ratten-Adipocyten kotransfiziert, und es wurde ebenfalls die Zelloberflächenexpression bestimmt. Als Kontrolle diente der HA-GLUT4. → Durch diesen Versuch wurde nachgewiesen, dass HA-GLUT6 und HA-GLUT8 in einem Dynamin-abhängigen Prozess zwischen der Plasmamembran und intrazellulären Kompartimenten recyceln.
- HA-GLUT6 und HA-GLUT8 wiesen im Gegensatz zu HA-GLUT4 keine Insulinstimulierung auf. Zusätzlich wurde die Wirkung von Phorbolestern (PMA), Hyperosmolarität, Vasopressin, GTP γ S, Isoproterenol/Adenosindeaminase und Oxytocin untersucht. → Keiner der untersuchten GLUT4-Stimuli bewirkte eine Stimulierung der HA-GLUT6- und HA-GLUT8-Translokation in primären Adipocyten.
- Der Wildtyp-HA-GLUT8-Transporter besitzt in transfizierten COS-7-Zellen eine punktuelle intrazelluläre Expression, während die GLUT8-(LL/AA)-Mutante eine starke Zelloberflächenexpression aufweist.

3. Diskussion

3.1. Charakterisierung des GLUT4-bindenden Proteins p49

3.1.1. Identifizierung des p49-Proteins im Hefe-Two-Hybrid-System

Der insulinregulierte Glucosetransporter GLUT4 wird im Fett, Herz und der Skelettmuskulatur exprimiert. GLUT4 liegt im basalen Zellzustand in intrazellulären Speichervesikeln vor. Nach Insulinstimulierung kommt es zu einer Translokation von GLUT4 zur Plasmamembran (Exocytose). Durch Endocytose gelangt GLUT4 über das endosomale Kompartiment zurück in das Speicherkompartiment. Die Lokalisation von GLUT4 in den Speichervesikeln beruht vermutlich auf Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen GLUT4 und bisher unbekanntem Sortierproteinen (s. Einleitung, Abb. 1.1).

Eine Eigenschaft eines solchen, hypothetischen Sortierproteins sollte demnach sein, dass es spezifisch an eine Aminosäuresequenz (*Targeting*-Motiv) im GLUT4 bindet, die wiederum notwendig ist für die intrazelluläre Sortierung des Proteins. Eine zweite Eigenschaft sollte sein, dass dieses Protein im Fett- und Muskelgewebe exprimiert wird. Das Sortierprotein sollte weiterhin (zumindest partiell) im gleichen Kompartiment der Zelle vorliegen wie der GLUT4 selbst. Schließlich würde man erwarten, dass das Ausschalten des Bindemotivs im GLUT4 oder die Verhinderung der GLUT4/Sortierprotein-Interaktion zu einer Störung im intrazellulären Recycling von GLUT4 führt.

Vorarbeiten der Arbeitsgruppe hatten ergeben, dass der C-Terminus des GLUT4 keine relevante *Targeting*-Information für das Recycling des Proteins in Adipocyten besitzt. Deshalb wurde der 24 Aminosäuren umfassende N-Terminus des GLUT4 benutzt, um GLUT4-bindende Proteine zu isolieren, die Kandidaten für das gesuchte Sortierprotein darstellen könnten. Dazu wurde der GLUT4-N-Terminus an die GAL4-DNA-Bindungsdomäne fusioniert und als Köder für Hefe-Two-Hybrid-*screens* einer Adipocyten-cDNA-Bank verwendet.

Als GLUT4-Interaktionspartner wurden mehrere Klone isoliert, die alle für ein 19 kDa internes Fragment eines bisher unbekanntem 49 kDa Proteins, p49, codierten. Die Klonierung der Vollängen-cDNA von p49 erfolgte anschließend durch PCR-Amplifikation mit spezifischen p49-Primern aus einer Mausgehirn-cDNA-Präparation.

Das p49-Protein aus der Maus besteht der cDNA-Sequenz nach aus 441 Aminosäuren und findet sich nach dem jetzigen Stand der Datenbanken beim Menschen, der Ratte, dem Rind und dem Schaf. Charakteristische Merkmale des p49-Proteins sind 1) der hohe Isoelektrische Punkt (pI 9,5), 2) charakteristische 7-Aminosäure-Sequenzwiederholung (a-b-c-d-e-f-g)_n mit hydrophoben und hydrophilen Resten, die auf die Anwesenheit von drei Coiled-coil-Regionen in der N-terminalen Hälfte hinweisen, und 3) eine Spezies-konservierte Prolin-haltige Sequenz (PxxP) im C-Terminus, die eine mögliche Bindungsstelle für SH3-Domänen-Proteine darstellen könnte. Auffällige Sequenzähnlichkeiten bestehen weiterhin zu Proteinen aus *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* (s. Ergebnisse, Tab.2.1B).

α -helikale Coiled-coil-Sequenzen sind involviert in der Oligomerisierung vieler Proteine. Coiled-coils bestehen aus zwei oder mehreren amphipathischen Helixstrukturen, die sich umeinander winden können. Sie enthalten eine charakteristische 7-Aminosäure-Sequenzwiederholung (a-b-c-d-e-f-g)_n mit hydrophoben und hydrophilen Resten. Dabei formen die Positionen a und d eine hydrophobe Verbindung zwischen den Helixstrukturen aus (Harbury et al., 1993, 1994). Die Positionen b, c, e, g und f sind dem Lösungsmittel zugewandt und normalerweise polar. Die Positionen e und g flankieren die hydrophobe Mitte und können interhelikale Interaktionen eingehen (Kohn et al., 1995). Somit bilden Proteine, die Coiled-coil-Regionen besitzen, meist dimere oder multimere Proteinstrukturen aus. Für einige Proteine, wie z.B. Golgin-95 konnte demonstriert werden, dass sie mittels ihrer Coiled-coil-Regionen Komplexe mit anderen Proteinen eingehen können. Zusätzlich wurde nachgewiesen, dass bei der Endocytose von GLUT4-Vesikeln spezifische GLUT4-Vesikelproteine (v-SNAREs) mit speziellen Membranbindeproteinen (t-SNAREs) interagieren. Die sog. SNAREs (v-SNAREs und t-SNAREs) bilden einen sehr stabilen Coiled-coil-Komplex aus 4 Helixstrukturen aus (Lin und Scheller, 1997; Sutton et al., 1998; Thurmond und Pessin, 2001).

Das Coiled-coil-Protein Uso1p aus *S. cerevisiae* weist eine 39%ige Sequenzhomologie mit p49 auf und ist verantwortlich für den Vesikeltransport vom endoplasmatischen Retikulum (ER) zum Golgi-Apparat (Barlowe, 1997). Sapperstein et al. konnten 1996 demonstrieren, dass Uso1p einen langen Coiled-coil-Helixkomplex mit anderen Uso1-Proteinen ausbildet. Das native Uso1-Protein ist ein Dimer mit zwei globulären Enden und einem langen mittleren Coiled-coil-Bereich (Yamakawa et al., 2002) Der Uso1p-Komplex verbindet Zielmembranen mit Transportvesikeln noch bevor die spezifischen Transportvesikel-SNARE-Proteine (v-SNAREs) mit den Membran-SNARE-Proteinen (t-SNAREs) fusionieren. Zusätzlich sind im Uso1p-C-Terminus auffällige Sequenzhomologin mit Cytoskelettproteinen wie z.B. Proteinen der Myosin-Familie (Myosin, Paramyosin und Tropomyosin) identifiziert worden (Nakajima et al., 1991). Untersuchungen mit einer temperatursensitiven Uso1-1-Mutante demonstrieren, dass diese Mutante keine native Helixstruktur ausbilden kann. Die temperatursensitive Uso1-1-Mutante akkumuliert bei der restriktiven Temperatur (37°C) am ER und dem perinuklearen Zellbereich. Interessant ist, dass der Uso1-1-Phenotyp durch die Überexpression der bekannten ER- und Golgi-Apparat-v-SNARE-Proteine (z.B. Bet1p, Bos1p, Sec22p und Ykt6p) kompensiert wurde, was demonstrierte, dass die Uso1p-Funktion vor der SNARE-Vesikelinteraktion auftritt (Sapperstein et al., 1996).

In Säugern konnte ein weiteres Protein (p115) identifiziert werden, das eine hohe Sequenzhomologie zum p49-Protein besitzt. Das Uso1p-Säugerhomolog p115 dirigiert vermutlich den intra-Golgivesikeltransport und ist unter anderem an dem „Abschnüren“ von ER-Transportvesikeln beteiligt (Allan et al., 2000). Das p115-Protein bildet mittels langer Coiled-coil-Regionen dimere Proteinstrukturen aus und bindet mit globulären Proteinenden an NSF-(N-Ethylmaleimid-sensitives-Fusionsprotein)-Vesikel und Golgimembranen. Somit kann das p115-Protein zusätzlich die Vesikel-Membran-Fusionierung mittels spezifischer SNARE-Proteine einleiten.

3.1.2. Interaktion von p49 und GLUT4 *in vitro*

Es konnte demonstriert werden, dass sowohl p49 als auch p19 als GST-Fusionsproteine nativen GLUT4 aus Detergenz-solubilisierten Fettzellmembranen präzipitieren (s. Ergebnisse 2.1.2.). Dabei ist die Interaktion zwischen GST-p49 und GLUT4 stärker, als die Bindung zwischen GST-p19 und GLUT4 (Abb. 2.2.). Dieses Ergebnis könnte bedeuten, dass die GLUT4-Interaktion Aminosäuren im p49 benötigt, die nicht im p19-Proteinfragment enthalten sind. P19 umfasst die Aminosäuren 92 – 245 aus dem 441 Aminosäuren langen p49-Protein, und damit zwei der drei vorhergesagten Coiled-coil-Region des Proteins. Es könnte also sein, dass entweder die N-terminale Region von p19 oder die C-terminale Hälfte des Proteins in die Bindung von GLUT4 involviert sind. Alternativ kann spekuliert werden, dass p49 an Bereiche des GLUT4 bindet, die über den N-Terminus des Transporters hinausgehen.

Die Interaktion zwischen GST-p49 und GLUT4 ist stabil gegenüber Salz (bis 700mM KCl) und wird durch Detergenz (1% Thesis) nur wenig abgeschwächt. Somit kann die p49/GLUT4-Interaktion nicht ausschließlich ionischer oder hydrophober Natur sein, weil diese Interaktionen durch hohe Salzkonzentration und Detergenz gehemmt würden. Schließlich wäre denkbar, dass GST-p49 strukturelle Eigenschaften besitzt, die eine GLUT4-Bindung verstärken.

Um zu untersuchen, ob der ursprünglich als Köder in den Two-Hybrid-*screens* eingesetzte GLUT4-N-Terminus hinreichend für die Bindung von p49 auf Proteinebene ist, wurde ein GST-GLUT4-N-terminales Fusionsprotein hergestellt. Anschließend wurde das GST-GLUT4-NT-Fusionsprotein kovalent an Affigel-10 gekoppelt und mit ansteigender Konzentration von GST-p49 inkubiert. Es zeigte sich, dass p49 an den GLUT4-N-Terminus bindet und demnach dieser Bereich im GLUT4 für die Interaktion ausreichend ist. Weiterhin zeigte sich ein sigmoidaler Sättigungsverlauf der Bindungskurve (Abb. 2.3.). Die p49-Konzentration musste somit einen bestimmten Schwellenwert (ca. 0,5 nmol/pro Ansatz p49-Protein) überschreiten, damit das p49-Protein an den GLUT4-N-Terminus binden konnte. Bei einer p49-Konzentration von ca. 2 nmol/pro Ansatz gelangte die p49/GLUT4-NT-Bindung in die Sättigung.

Viele Rezeptor-Liganden-Bindungskurven weisen einen hyperbolischen Verlauf auf. So wurde für das monomere *Tail-interacting* 47kDa-Protein (TIP47), das als Sortierprotein an den Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (MPR) bindet, ein hyperbolischer Sättigungsverlauf demonstriert (Orsel et al., 2000). Ein weiteres Beispiel für einen hyperbolischen Verlauf der Ligandenbindung ist die Sauerstoff-Sättigungskurve des monomeren Myoglobins. Im Gegensatz dazu zeigt die Sättigungskurve der Sauerstoffbindung des tetrameren Hämoglobins einen sigmoidalen Verlauf, der eine Kooperativität der Sauerstoffbindung an die Untereinheiten des Hämoglobins aufweist.

Die sigmoidale Sättigungskurve bei der Bindung von p49 an den immobilisierten GLUT4-NT könnte also auf eine Oligomerisierung des p49 hinweisen. Somit müsste eine kritische p49-Konzentration überschritten werden, die eine p49-Dimerisierung bzw. p49-Oligomerisierung ermöglicht. Erst nach Ausbildung von p49-Oligomeren, möglicherweise

über die Coiled-coil-Regionen, könnte der immobilisierte GLUT4-N-Terminus effektiv gebunden werden.

ein indirekter Hinweis auf eine oligomere Struktur von p49 ergab sich aus Gelfiltrationsexperimenten mit gereinigtem GST-p49. Das 27 kDa GST liegt in Lösung als natürliches Dimer vor, das mit einer apparenten Molmasse (M_r) von ca. 50 kDa aus der verwendeten Superose-12-Gelfiltrationssäule eluiert. Affinitätsgereinigtes GST-p49 (27+49= 76 kDa) eluierte hingegen im Ausschlussvolumen der Säule, entsprechend einer M_r von >400 kDa (Daten nicht gezeigt). Die unerwartet hohe Molmasse des Fusionsproteins könnte jedoch auch auf eine nicht-sphärische Form des Moleküls zurückzuführen sein. Leider gelang es nicht, GST und p49 durch enzymatische Spaltung an der zwischen beiden Proteinen lokalisierten Faktor-X-Schnittstelle zu trennen, so dass die Frage nach der oligomeren Struktur von p49 nicht weiter untersucht werden konnte.

3.1.3. p49 hat eine cytosolische Lokalisation in HeLa-Zellen

Nachdem die Hefe-Two-Hybrid-Interaktion zwischen p49 und dem GLUT4-N-Terminus auf Proteinebene verifiziert werden konnte, sollte als nächstes untersucht werden, ob die Lokalisation von p49 in der Zelle eine Interaktion mit dem GLUT4 überhaupt erlauben würde. Viele Kernproteine, wie z.B. Histone, haben einen basischen pI. Deshalb könnte die starke Basizität von p49 auf eine nukleäre Lokalisation des Proteins hinweisen – und damit eine biologisch sinnvolle Interaktion von vorn herein ausschließen, da sich der N-Terminus von GLUT4 im Cytosol befindet.

Um das p49-Protein in Säugerzellen detektieren zu können, wurde die cDNA in einen entsprechenden Expressionsvektor kloniert und mit einer N-terminalen *myc*-Epitopmarkierung versehen. In Zusammenarbeit mit Frau Dr. Matsumoto wurden anschließend HeLa-Zellen mit *myc*-p49-Plasmiden transfiziert. Nach Kultivierung der Zellen wurde das *myc*-Epitop durch einen monoklonalen Antikörper und einen sekundären Farbstoffmarkierten Antikörper fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen. Wie in Abschnitt 2.1.4 dargestellt, ist *myc*-p49 in HeLa-Zellen nicht im Zellkern sondern im Cytosol lokalisiert. Die cytoplasmatische Lokalisation von p49 würde also eine *in vivo* Interaktion zwischen dem Protein und dem GLUT4-NT erlauben.

3.1.4. p49 ist im perinukleären Bereich von primären Adipocyten lokalisiert.

Um die Lokalisation von p49 in primären Adipocyten zu bestimmen, wurden Fettzellen mit *myc*-p49 transfiziert und das *myc*-Epitop durch konfokale Immunofluoreszenzmikroskopie detektiert.

Bei der Untersuchung von Proben mit der konfokalen Immunofluoreszenzmikroskopie sind oft viele einzelne "Bilder" aufzunehmen, aus denen später die Struktur des untersuchten Objektes ermittelt wird. Im Vergleich zu konventionellen Mikroskopen besitzen konfokale Immunofluoreszenzmikroskope einen stärkeren Kontrast, das bedeutet, dass die zu den einzelnen Punkten des untersuchten Objekts zugehörigen Bildpunkte schärfer begrenzt sind. Die wesentliche ein konfokales Mikroskop auszeichnende Eigenschaft ist jedoch dessen Tiefenschärfe. Dies macht die konfokale Mikroskopie für Anwendungen interessant, bei

denen die Kenntnis der räumlichen Verteilung von z.B. Zellstrukturen gefragt ist (Wingender, 1996).

Das *myc*-p49-Färbemuster weist eine überwiegend punktförmige, granuliert verteilte Verteilung innerhalb der Zelle auf, wobei sich die stärkste Färbung im perinukleären Bereich fand (Abb. 2.5). In diesem Bereich der Adipocytenzelle, der sowohl Teile des endoplasmatischen Retikulums (ER) als auch das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) enthält, befindet sich auch das GLUT4-Speicherkompartiment. Die Färbung deutete darauf hin, dass sich p49 im Cytosol oder auch assoziiert mit cytosolischen Vesikeln, nicht jedoch im Zellkern befindet. Die Insulinstimulierung von Adipocyten hatte keinen Einfluss auf die Lokalisation von p49.

3.1.5. p49 assoziiert partiell mit Membranen.

Nach Fraktionierung transfizierter Adipocyten in lösliche und unlösliche Bestandteile durch Ultrazentrifugation und anschließende Westernblotanalysen zeigte sich, dass ein signifikanter Anteil von *myc*-p49 in der Membranfraktion vorlag. Diese Membranassoziation geht offenbar auf die N-terminale Hälfte des Proteins zurück, denn *myc*-p49-N war in Adipocyten zu 50% membranassoziiert und zu 50% cytosolisch (Daten nicht gezeigt). Die Insulinstimulierung der Zellen hatte keinen Einfluss auf den Grad der Membranassoziation von p49-N.

Es stellt sich nun die Frage, ob die Membranassoziation von p49 durch Bindung an den GLUT4 oder durch eine autonome Membranbindung des Proteins zustande kommt. Deshalb wurden CHO-Zellen, die keinen endogenen GLUT4 enthalten, mit *myc*-p49 transfiziert und nach der Zellernte durch Ultrazentrifugation in Gesamtmembranen und Cytosol fraktioniert. Tatsächlich bindet, wie der Western-Blot zeigt, *myc*-p49 selbst in Abwesenheit von GLUT4 an die Zellmembranen von CHO-Zellen (Abb. 2.7.).

Nach der Aminosäuresequenz ist p49 ein sehr hydrophiles, lösliches Protein. Rekombinantes GST-p49 findet sich ebenfalls im löslichen Überstand von *E. coli*-Zellen die das Protein exprimieren. Kleine, 21 kDa GTPasen aus der Ras-Familie sind jedoch ebenfalls nach ihrer Primärstruktur lösliche Proteine, enthalten jedoch eine sekundäre Modifikation die eine reversible Membranassoziiierung der GTPasen erlaubt. Für die Ausbildung ihrer signaltransduzierenden Funktion müssen die Ras-Proteine farnesyliert sein. Nichtfarnesyliertes Ras befindet sich im Cytosol und ist daher inaktiv (Hinterding et al., 1998; Levitzki et al., 1994; Hancock et al., 1990).

Zu den posttranslationalen Protein-Modifikationen zählt die kovalente Anbindung niedermolekularer Reste an funktionelle Gruppen bestimmter Aminosäureseitenketten oder an die terminale Amino- oder Carboxygruppe. Besonders wichtig für die spätere Membraninsertion von einigen Proteinen ist die posttranslationale Lipidierung. Sie umfasst die Anbindung dreier verschiedener Lipidgruppen: Die N-terminale Myristoylierung eines Glycins, die S-Palmitoylierung von Cysteinen im Protein oder die S-Prenylierung von Cysteineinheiten am oder in der Nähe des C-Terminus mit einem von zwei Isoprenoiden, dem 15C-Farnesyl- oder dem 20C-Geranylgeranylrest (Voet et al., 1994). Die hydrophoben Modifikationen garantieren die Membranlokalisation dieser Proteine, ohne die sie ihre Funktion nicht ausüben können. So werden z.B. unmodifizierte Ras-Vorstufenproteine im

Anschluss an ihre Translation am Cystein des C-terminalen Erkennungsmotivs CaaX (C= Cystein, a= aliphatische Aminosäure, X= Serin, Methionin, Alanin, Glutaminsäure) vom löslichen Enzym Farnesyltransferase (Ftase) farnesyliert. Anschließend spaltet eine Protease das C-terminale Tripeptid- aaX ab, und eine Methyltransferase methyliert das nun C-terminale farnesylierte Cystein. Eine spätere stabile Ras-Membraninsertion wird durch die Anbindung von mindestens einem Palmitoylrestes erreicht (Zhang et al., 1996).

Die Aminosäuresequenz von p49 weist jedoch keine Konsensussequenzen für eine Lipidmodifikation auf. Die 100 kDa GTPase Dynamin kann durch Interaktion der Prolinreichen Sequenz mit SH3-Domänen anderer Proteine zur Plasmamembran rekrutiert werden (Shepetner et al, 1996; Shupliakov et al., 1997). Eine Membranassoziation von p49 über das C-terminale PxxP-Motiv durch Bindung an membrangebundene SH3-Proteine ist jedoch eher unwahrscheinlich, da die N-terminale Hälfte von p49 bereits an Membranen bindet. Man kann daher spekulieren, dass p49 über die N-terminalen Coiled-coil-Regionen an ein unbekanntes membranassoziertes Coiled-coil-Protein bindet und daher selbst membranassoziert wird.

3.1.6. In Adipocyten kolokalisiert p49 mit GLUT4

Um eine genauere Lokalisation von p49 in Adipocyten vorzunehmen, wurden Kolokalisationsstudien mit *myc*-p49-transfizierten Adipocyten durchgeführt. Dazu wurden zwei unterschiedliche Antikörperpaare zur Färbung eingesetzt, wobei die beiden sekundären Antikörper mit verschiedenen Fluorophoren markiert waren. In der vorliegenden Arbeit wurden FITC- und Rhodamin-markierte sekundäre Antikörper eingesetzt, die nach Anregung jeweils grünes (FITC) oder rotes (Rh) Licht emittieren. Überlagert man nun den FITC- und den Rh-Kanal, erhält man ein gelbes Signal wenn sich beide Fluorophoren sehr nahe kommen (< 2 nm).

Die Doppelimmunfluoreszenz-Färbungen demonstrieren deutlich eine Kolokalisation von *myc*-p49 und GLUT4 im perinukleären Bereich der Zelle, die wahrscheinlich auf eine *myc*-p49/GLUT4-Interaktion an den GLUT4-Vesikeln zurückgeht. Die Kolokalisation von *myc*-p49 mit GLUT4 in primären Adipocyten kann somit als Beleg für eine Protein-Protein-Interaktion *in vivo* gewertet werden.

3.1.7. p49-N reduziert die GLUT4-Zelloberflächenexpression in primären Adipocyten

Um einen Einfluss des p49-Proteins auf das Recycling von GLUT4 zu untersuchen, wurden intakte Ratten-Adipocyten mit *myc*-markierten p49-Konstrukten und Hämagglutinin-(HA)-markiertem GLUT4 kotransfiziert. Die Glucosetransporter, die den Epitopmarker im großen extrazellulären Loop des Proteins enthielten, wurden anschließend auf der Oberfläche von intakten Zellen durch einen radioaktiven Antikörpernachweis quantitativ nachgewiesen. Die untersuchten p49-Konstrukte waren: das Vollängen-p49-Protein, p19 und p49-N.

Die Überexpression der GLUT4-bindenden p49-N-Domäne, des p19-Proteinfragments sowie des Vollängen-p49-Proteins bewirkten eine ca. 50%ige Reduktion der HA-GLUT4-Zelloberflächenexpression in Adipocyten, sowohl in basalen, als auch in insulinstimulierten Zellen (Abb. 2.8A.; dargestellt sind die p49-N-Ergebnisse). Im Gegensatz dazu hatte die

Expression der p49-Konstrukte keinen Effekt auf die Zelloberflächenexpression einer HA-GLUT8-(LL/AA)-Mutante, die in Adipocyten konstitutiv auf der Plasmamembran exprimiert wird und keiner Regulation durch Insulin unterliegt (Lisinski et al., 2001; s. Abschnitt 2.1.8.). Western-Blot-Analysen zeigten jedoch, dass die reduzierte Zelloberflächenexpression von HA-GLUT4 eindeutig auf eine Reduktion der HA-GLUT4-Proteinexpression zurückzuführen war: HA-GLUT4/*myc*-p49-N- bzw. *myc*-p49-kotransfizierte Adipocyten enthielten nur ca. 50% des epitopmarkierten GLUT4-Reporters im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 2.8B.; dargestellt ist der Western-Blot von HA-GLUT4/*myc*-p49-N-kotransfizierten Adipocyten).

Das Experiment weist auf, dass die Überexpression der p49-Konstrukte nicht mit der insulinstimulierten GLUT4-Translokation interferiert, sondern mit Prozessen, die einen Einfluss auf die zelluläre Menge von HA-GLUT4 haben. Dies könnte folgende Ursachen haben:

- 1) Inhibition der HA-GLUT4-Synthese
- 2) Beschleunigung des Abbaus von HA-GLUT4

Zu 1) Zum einen könnte die Kotransfektion der p49-Konstrukte die Translation des HA-GLUT4-Reporters hemmen. Beispielsweise könnte der Promotor der p49-Plasmide Transkriptionsfaktoren die für die Transkription von HA-GLUT4 benötigt werden binden und so deren verfügbare Menge in der Zelle reduzieren. Als Folge würde die Zelle weniger HA-GLUT4 herstellen. Diese Möglichkeit erschien eher unwahrscheinlich, da dieser Effekt nicht bei Koexpression des GLUT8-Konstrukts auftrat, das den gleichen Promotor enthält wie das HA-GLUT4-Plasmid.

Alternativ könnte p49 in die Synthese (Prozessierung, biosynthetischer Signalweg) von GLUT4 involviert sein. Die Überexpression von p49 könnte dann durch Konkurrenz der p49-Konstrukte um die Bindungsstelle im GLUT4 zu einer Hemmung des biosynthetischen Weges von GLUT4 führen.

Eukaryotische Zellen enthalten membrangebundene Kompartimente, wie das endoplasmatische Retikulum (ER) und das Golgi-Netzwerk. Eine Aufgabe von ER und Golgi-Apparat ist es, ein Transportnetzwerk für neu synthetisierte Proteine zu formen. Im exocytotischen Signalweg werden Proteine in das ER rekrutiert und von dort in den Golgi-Apparat transportiert. Im Golgi-Apparat kommt es zu einer Proteinsortierung in das Trans-Golgi-Netzwerk, wo die Proteine in sekretorische Transportvesikel gelangen. Die Transportvesikel können dann mit der Plasmamembran fusionieren, und die Proteine sind somit an der Zelloberfläche exponiert.

Theoretisch könnte p49 eine ähnliche Funktion ausüben wie das Uso1-Protein. Das Coiled-coil-Protein Uso1p aus *S. cerevisiae* weist eine 39%ige Sequenzhomologie mit p49 auf und ist verantwortlich für den Vesikeltransport vom endoplasmatischen Retikulum (ER) zum Golgi-Apparat (Barlowe, 1997). Der Uso1p-Komplex verbindet Zielmembranen mit Transportvesikeln noch bevor die spezifischen Transportvesikel-SNARE-Proteine (v-SNAREs) mit den Membran-SNARE-Proteinen (t-SNAREs) fusionieren. Zusätzlich sind im Uso1p-C-Terminus auffällige Sequenzhomologien mit Cytoskelettproteinen wie z.B. Proteinen der Myosin-Familie (Myosin, Paramyosin und Tropomyosin) identifiziert worden (Nakajima et al., 1991).

Möglicherweise verbindet p49 den GLUT4 mit anderen noch „unbekannten“ Proteinen, die eine korrekte GLUT4-Prozessierung gewährleisten. Die Überexpression einer dominant-negativen p49-N-Mutante könnte die GLUT4-Prozessierung hemmen, da überexprimierte p49-Konstrukte das endogene p49-Protein kompetitiv aus der Bindung verdrängen. Somit würde weniger GLUT4 hergestellt und an die Plasmamembran gelangen (50%ige Reduktion der GLUT4-Zelloberflächenexpression in p49-N-transfizierten Adipocyten; Abb. 2.8.).

Zu 2) Die von der Plasmamembran internalisierten Proteine werden in sog. „frühe“ Endosomen sortiert. Diese können zu späten Endosomen und schließlich zu Lysosomen umgewandelt werden. In den Lysosomen werden die Proteine abgebaut (Segev, 2001). Die Überexpression von p49 bzw. das Ausschalten des Bindemotivs im GLUT4 könnte zu einer Fehlsortierung des Glucosetransporters führen, bei der GLUT4 nicht mehr aus dem endosomalen Kompartiment heraussortiert wird und in Folge in Lysosomen abgebaut wird. Ein derartiger Vorgang wurde bereits für die Sortierung des Mannose-6-Phosphat-Rezeptors (MPR) beschrieben (Diaz und Pfeffer, 1998).

Der MPR vermittelt den Transport von neu-synthetisierten lysosomalen Enzymen aus dem trans-Golgi-Netzwerk (TGN) in entstehende Lysosomen. Im TGN bindet der MPR hydrolytische Enzyme über seine extrazelluläre, lumenale Domäne. Die MPR-Proteinkomplexe werden dann über sekretorische Vesikel (z.T. über die Plasmamembran) in das endosomale Kompartiment transportiert. Im Verlaufe der Reifung dieser endosomalen Vesikel zu Lysosomen kommt es, neben der Anreicherung von Hydrolasen, zu einem Abfall des lumenalen pH und schließlich zur Dissoziation der MPR-Ligandenkomplexe. Ein 47 kDa Adaptorprotein, TIP47, bindet selektiv an den C-Terminus vom MPR und vermittelt den Rücktransport des Rezeptors zum TGN, wo er erneut beladen werden kann. Die Überexpression von TIP47 oder Mutation des C-terminalen TIP47-Phenylalanin/Tryptophan-Bindemotivs im MPR verhindern den Retrotransport des MPR von Endosomen/Lysosomen zum TGN. In Folge verbleibt der MPR in den lysosomalen Vesikeln und wird schließlich abgebaut (Diaz und Pfeffer, 1998; Orsel et al., 2000).

Die überexprimierten p49-Konstrukte könnten ebenfalls die Rekrutierung von GLUT4 aus dem endosomalen Kompartiment zurück ins Speicherkompartiment blockieren, indem sie die Bindung von endogenem p49 verhindern, oder mit dem Transportsystem interferieren. Somit würde GLUT4 in den Endosomen verbleiben und später im lysosomalen System abgebaut (50%ige HA-GLUT4-Zelloberflächenreduktion bei Überexpression mit p49-N in Adipocyten, Abb. 2.8.).

3.1.8. Mutation des p49-Bindemotivs führt zur Reduktion der HA-GLUT4-Expression

Da die Koexpression der p49-Konstrukte zu einer Inhibition der GLUT4-Expression führte war nun die Frage welcher Effekt eintritt wenn das p49-Bindemotiv im GLUT4 ausgeschaltet wurde. Um dieses Bindemotiv im GLUT4 zu lokalisieren, wurden der 24 Aminosäure lange Wildtyp-GLUT4-N-Terminus (MPSGFQQIGSEDEPPQQRVTGTL) und drei überlappende GLUT4-NT-Deletionsmutanten als Köder im Hefe-Two-Hybrid-System eingesetzt um mit p49 zu interagieren (s. Ergebnisse 2.1.9.). Durch Messung der

resultierenden β -Galaktosidaseaktivität konnte ein spezifisches Bindemotiv von 7 Aminosäuren (Q₇IGSEDG₁₃) im GLUT4-N-Terminus identifiziert werden, das für die Bindung von p49 essentiell ist. Der Austausch der beiden sauren Aminosäuren im GLUT4-NT-Bindemotiv, Glu11/Asp12 zu Gln11/Asn12 führte im Hefe-Two-Hybrid-System dazu, dass die p49-Bindung um das 10-fache (s. Ergebnisse 2.1.9) abgeschwächt wurde. Somit konnte festgestellt werden, dass die Präsenz der beiden sauren Aminosäuren Glu11 und Asp12 im GLUT4-N-Terminus für die p49-Bindung essentiell sind.

Die entsprechende (ED→QN)-Mutation im HA-GLUT4 führte zu einer deutlichen Reduktion der GLUT4-Zelloberflächenexpression, die wiederum auf eine Reduktion der Proteinexpression zurückzuführen war. Tatsächlich entsprach die Zelloberflächenexpression der HA-GLUT4-(DE/QN)-Mutante genau der Zelloberflächenexpression des Wildtyp-HA-GLUT4 in p49-überexprimierenden Zellen. Somit konnte die Hypothese, dass die Kotransfektion der p49-Konstrukte die Translation des HA-GLUT4-Reporters hemmt ausgeschlossen werden. Es schien um so mehr, dass die p49-Bindung bzw. die Präsenz des Bindemotivs mit der Synthese oder dem Abbau von HA-GLUT4 interferiert.

3.1.9. Einfluss von p49 auf die GLUT4-Synthese/Degradierung

Eine direkte Methode zur Bestimmung der Protein-Degradierungsrate ist die Bestimmung der Halbwertszeit des Proteins durch die Pulse-Chase-Methode. Dabei werden Proteine *in vivo* mit radioaktivem Methionin markiert und die Änderung der spezifischen Radioaktivität im Protein über die Zeit bestimmt. Vorversuche ergaben jedoch sehr niedrige Einbauraten, was weniger auf die geringe Anzahl der Methionine und Cysteine im GLUT4 (Ratten-GLUT4: 12 Met, 4 Cys), sondern auf die geringe Synthesemenge des epitopmarkierten Proteins zurückzuführen ist. Bei der Elektroporation werden nur ca. 5-10% der Zellen transfiziert, die daraus resultierende Menge an neusynthetisiertem GLUT4 ist demnach zu gering für biochemische Analysen. Daher musste auf einen indirekten Nachweis der GLUT4-Synthese/Degradierung zurück gegriffen werden.

Im Experiment wurden Zellen mit HA-GLUT4 transfiziert und 3 h inkubiert. Zu diesem Zeitpunkt war bereits eine gut messbare Menge an HA-GLUT4 in den Zellen (d.h. auf der Zelloberfläche) vorhanden. Dann wurde die Neusynthese des GLUT4-Reporters durch Zugabe des Proteinsyntheseinhibitors Cycloheximid gestoppt. Eine erhöhte Abbaugeschwindigkeit von GLUT4 sollte sich nun in einer beschleunigten Reduktion des HA-GLUT4-Signals bemerkbar machen.

Die Kontrollversuche zeigen, dass die HA-GLUT4-Zelloberflächenexpression über die Zeit annähernd linear ansteigt, während nach Zugabe von Cycloheximid die HA-GLUT4 Synthese zum Stillstand kommt und die HA-Menge an der Zelloberfläche konstant bleibt. Dies war auch erwartet, denn die Abbaurate von GLUT4 in Fettzellen ist sehr niedrig (Halbwertszeit ca. 24 h, Dr. Cushman, pers. Mitteilung).

In Gegenwart von p49-N ist hingegen nur ein Anstieg der HA-GLUT4-Zelloberflächenexpression innerhalb der ersten Stunde zu beobachten, danach flacht die Kurve deutlich ab. Nach Zugabe von Cycloheximid nimmt die HA-GLUT4-Zelloberflächenexpression jedoch deutlich ab. Das Ergebnis dieser Pilotversuche weist auf einen beschleunigten Abbau des Glucosetransporters in Gegenwart von p49 hin. Demnach

könnte p49 an der Rekrutierung von GLUT4 aus dem Endosomalen System in das Speicherkompartiment beteiligt sein. Eine Inhibition dieses Sortierschritts würde dann zur Akkumulierung von GLUT4 in Endosomen führen. Da sich Endosomen zu Lysosomen entwickeln können, kann man spekulieren, dass GLUT4 schließlich in Lysosomen gelangt und dort abgebaut wird.

Über die biologische Funktion von p49 im GLUT4-Recycling kann jedoch nur spekuliert werden. Zum einen waren die Effekte in Cycloheximid-Versuch relativ klein. Eine längere Inkubation der Zellen mit dem Inhibitor scheidet jedoch wegen der Toxizität der Substanz aus. Darüber hinaus hemmt Cycloheximid sicher auch die Synthese anderer essentieller Proteine, was zu Artefakten führen kann. Schließlich wird durch den Inhibitor die Synthese beider Proteine, p49 und der GLUT4-Reporter gehemmt, was die Interpretation der Daten sehr schwierig macht. Da im verwendeten experimentellen System beide Proteine, p49 und HA-GLUT4, gleichzeitig synthetisiert werden, ist der Einfluß von p49 auf das GLUT4-Recycling mit dieser Technik kaum aufzulösen. Besser wäre es, den Effekt der p49-Expression auf den endogenen GLUT4 zu bestimmen, was jedoch wegen der niedrigen Transfektionsrate von primären Adipocyten nicht möglich ist. Alternativ könnte p49 über virale Transfektionssysteme in 3T3-L1 Adipocyten überexprimiert werden, denn diese Methode erreicht Transfektionsraten von 80-100%. Eine andere Möglichkeit bestünde in einem zellulärem *knockout* von p49 mittels siRNA (small-interfering RNA) oder der Generierung von p49-*knockout* Mäusen.

P49 scheint neben dem GLUT4-Kompartiment auch im ER lokalisiert zu sein, wie die Kolokalisationsexperimente mit p49 und dem ER-Protein Calnexin belegen. Eine ER-Assoziation von p49 wäre ein Hinweis auf eine Rolle des Proteins in der Biosynthese von GLUT4, ähnlich zum Hefe-Homolog Uso1p (Nakajima et al., 1991). Die Lokalisierung von Proteinen kann jedoch auch aus der Überexpression resultieren. Daher sollte die subzelluläre Lokalisierung des endogenen p49 mit einem p49-spezifischen Antikörper überprüft werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass p49 eine Reihe von Merkmalen aufweist, die ein putatives Sortierprotein haben sollte: 1) Spezifische Bindung an GLUT4 *in vitro* und *in vivo*, 2) Kolokalisation mit GLUT4-Vesikeln, 3) cytosolische/membranassoziierte Lokalisation in der Zelle 4) Expression in Muskel- und Fettgewebe und 5) Effekte auf das GLUT4-Recycling nach Überexpression des Proteins.

Um die biologische Funktion von p49 aufzuklären müssen jedoch weitergehende Versuche durchgeführt werden. Dabei muss auf biochemischem Weg die Reduktion der GLUT4-Expression nach p49-Überexpression bzw. Mutation des Bindemotivs analysiert werden, um zwischen einer Rolle von p49 in der Synthese und dem Recycling von GLUT4 unterscheiden zu können.

3.1.10. Zusammenfassung der p49-Ergebnisse/Diskussion

- Mit Hilfe des Hefe-Two-Hybrid-Systems konnte ein neuartiges 49 kDa Coiled-coil-Protein (p49) aus einer Adipocyten-cDNA-Bank isoliert werden, das *in vitro* und *in vivo* an ein 7 Aminosäuren umfassendes Bindemotiv (QIGSEDG) im GLUT4-N-Terminus bindet.
- Das basische p49-Protein (pI 9.5) enthält vermutlich drei Coiled-coil-Domänen (Lupas-Algorithmus) im N-Terminus sowie eine Konsensussequenz für die Bindung von SH3-Proteinen (PxxP) im C-Terminus.
- Das p49-Protein findet sich in Säugern (Mensch, Maus, Ratte, Rind und Schaf) und die p49-mRNA konnte in insulin sensitiven Geweben wie Muskelzellen und Fettzellen nachgewiesen werden. P49-Homologe (ca. 40%) finden sich in *Saccharomyces cerevisiae* (*Uso1p*; 39%), *Caenorhabditis elegans* (F18C12.3p; 40%) und *Drosophila melanogaster* (*Rbl1p*; 38%). *Uso1p* hat in Hefen eine Funktion im Vesikeltransport.
- P49 ist mit GLUT4 in primären Ratten-Adipocyten kolokalisiert und zeigt zusätzlich eine Kolokalisation mit dem ER-(endoplasmatisches Retikulum)-Markerprotein Calnexin. P49 assoziiert *in vivo* über die N-terminalen Coiled-coil Regionen mit der Membranfraktion.
- Durch die Überexpression von p49-Konstrukten, die die GLUT4-bindende N-terminale Hälfte von p49 enthalten (Vollängen p49, p49-N (Aminosäuren 1-216, 25kDa) und p19 (Aminosäuren x-y, 19 kDa) in primären Ratten-Adipocyten, wird die GLUT4-Expression um ca. 50% gehemmt.
- Der gleiche Effekt, d.h. die Reduktion der GLUT4-Expression, wird erreicht, wenn das p49-Bindemotiv im GLUT4 ausgeschaltet wird.
- Pilotversuche zur Bestimmung des *turn-overs* von GLUT4 mit dem Proteinsyntheseinhibitor Cycloheximid weisen auf eine Rolle von p49 bei der intrazellulären Sortierung von GLUT4 in Adipocyten hin. Die Überexpression von p49 scheint einen beschleunigten Abbau von GLUT4 zu induzieren, möglicherweise als Folge einer verminderten Rekrutierung von GLUT4 aus dem Endosomalen Kompartiment.

Eine p49-induzierte Hemmung der GLUT4-Synthese und damit eine Beteiligung von p49 am biosynthetischen Vesikeltransport von GLUT4 kann jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden.

3.2. Charakterisierung der neuartigen Glucosetransporter GLUT8 und GLUT6

3.2.1. Die GLUT4-*null*-(knockout) Maus

Der Typ-2 *Diabetes mellitus* (NIDDM) beruht auf einer Insulinresistenz der Glucoseaufnahme und Glucoseverwertung in Muskel- und Fettgewebe (Kahn et al., 1995; Kahn et al., 1996). Hauptverantwortlich für den insulinstimulierten Glucosetransport in diesen Geweben ist die Glucosetransporter-Isoform GLUT4. Überraschenderweise führte das Ausschalten von GLUT4 in Mäusen jedoch nicht zur Entwicklung von NIDDM (Katz et al., 1995). Die GLUT4-*null* Mäuse wiesen zwar deutliche Merkmale einer Insulinresistenz auf, hatten jedoch einen normalen Blutglucosespiegel und auch eine normale Glucosetoleranz.

Interessanterweise beobachteten Ryder et al. (1999) einen insulinstimulierbaren Glucosetransport in *Soleus*-Muskelfasern der GLUT4-*null* Mäuse. Die basale und insulinstimulierte Glucoseaufnahme von *Soleus*- und *EDL*- Muskelfasern *in vitro* konnte zudem durch Cytochalasin-B, einem Inhibitor der GLUT-Glucosetransporter, gehemmt werden (Ryder et al., 1999). Markierungsstudien mit einem GLUT-spezifischen Photoaffinitätsmarker wiesen auf die Existenz eines GLUT-artigen Proteins von ca. 45 kDa in den Muskeln von GLUT4-*null* Mäusen hin, der mit keinem der verfügbaren Anti-GLUT-Antikörper kreuzreagierte (Ryder et al., 1999). Da keiner der zu dem Zeitpunkt bekannten GLUTs bzw. Natrium-gekoppelten Glucosetransportern in den Muskelzellen heraufreguliert war, legten diese Ergebnisse den Schluss nahe, dass in GLUT4-*null* Mäusen die Expression weiterer, bisher unbekannter Glucosetransporter für die beobachtete Euglykämie der Tiere verantwortlich ist.

Tatsächlich wurden in den letzten Jahren acht neuartige GLUT-Gene bei Säugern beschrieben (GLUT6-GLUT12, HMIT), die Identifizierung der cDNAs gelang zumeist durch Sequenzanalysen von EST-(*expressed sequence tags*)-Klonen (s. Einleitung 1.4; Tabelle 1.2.). Die Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Hans Joost an der RWTH Aachen konnte mit dieser Strategie die Vollängen-cDNAs von GLUT6, GLUT8 und GLUT11 klonieren und partiell charakterisieren (Joost und Thorens, 2001; Doege et al., 2001; Doege et al., 2000). Für alle drei GLUTs konnte eine Glucosetransportaktivität nachgewiesen werden (Doege et al., 2001; Carayannopoulos et al., 2000).

Die Fragestellung der vorliegenden Untersuchungen war:

Es sollte untersucht werden, ob die beiden Glucosetransporter GLUT6/8 den GLUT4-Effekt in GLUT4-*null* Mäusen kompensieren können, so dass der beobachtete Glucosetransport in diesen Mäusen erklärt werden kann. Weiterhin wollte bestimmt werden ob und wie GLUT6 und GLUT8 in primären Adipocyten recyceln.

3.2.2. Expression epitopmarkierter GLUT8 und GLUT6 in primären Adipocyten

In Adipocyten (und Muskelzellen) recycelt die GLUT4-Isoform zwischen intrazellulären Kompartimenten und der Plasmamembran. Insulinstimulierung (und in Muskelzellen auch Kontraktion) bewirkt die Translokation von GLUT4-Vesikeln zur Plasmamembran. Adipocyten enthalten demnach die nötige Maschinerie für die Sortierung von GLUT4 in die

Speichervesikel und die Translokation von Glucosetransportern zur Plasmamembran. Deshalb sollte in primären Adipocyten untersucht werden, ob die beiden Glucosetransporter GLUT6 und GLUT8 am insulinregulierten Glucosetransport beteiligt sein könnten. Während GLUT8 natürlicherweise in Fett- und Muskelzellen vorkommt, wird GLUT6 nicht in diesen Geweben, sondern vorwiegend im Gehirn, in der Milz und in peripheren Leukocyten exprimiert (Ibberson et al., 2000; Doege et al., 2000; Carayannopoulos et al., 2000). Möglicherweise könnte ein GLUT4-*knockout* jedoch zur kompensatorischen Expression von GLUT-Isoformen (wie z.B. GLUT6) in insulinsensitiven Geweben führen, die dort normalerweise nicht vorkommen.

Zur Detektion der beiden Glucosetransporter GLUT6 und GLUT8 wurde ein Hämagglutinin-(HA)-Epitopmarker in die großen extrazellulären Loops der Transporter kloniert. Die HA-markierten Glucosetransporter wurden dann in primären Adipocyten exprimiert und die Zelloberflächenexpression des HA-Epitops durch einen radioaktiven Antikörpernachweis bestimmt (Al-Hasani et al., 1998; Lisinski et al., 2001).

Obwohl beide Proteine nach den Western-Blot-Analysen transfizierter Adipocyten in ausreichenden Mengen hergestellt wurden, konnte nur ein schwaches Hämagglutinin-Signal auf der Zelloberfläche detektiert werden (Abb. 2.15). Dieses Ergebnis wies darauf hin, dass die GLUTs einer ausgeprägten intrazellulären Retention unterliegen, oder nicht korrekt prozessiert werden um anschließend zur Plasmamembran zu gelangen. Darüber hinaus und im Gegensatz zum HA-GLUT4 hatte die Insulinstimulierung der Zellen keinen Effekt auf die Zelloberflächenexpression von HA-GLUT6 und HA-GLUT8.

3.2.3. Die Mutation der N-terminalen Dileucinmotive in GLUT8 und GLUT6 erhöht die Plasmamembranexpression in Adipocyten

Dileucin-(LL)-Motive, die sich in den cytoplasmatischen Anteilen einiger Membranproteine finden, wurden als Targetingsignale für die Internalisierung von Proteinen beschrieben (Heilker et al., 1999). Es konnte nachgewiesen werden, dass Komponenten der zellulären Endocytosemaschinerie, die β 2-Untereinheit des AP-2-Adapterproteins und auch das vesikuläre Coat-Protein Clathrin, an (LL)-Motive binden und dadurch die Internalisierung der Proteine (z.B. des Mannose-6-Phosphat-Rezeptors) einleiten. In den N-Termini von GLUT6 und GLUT8 findet sich ebenfalls ein (LL)-Motiv (Abb. 2.16). Um einen möglichen Zusammenhang der (LL)-Motive und der geringen Zelloberflächenexpression der GLUTs zu untersuchen, wurden durch gerichtete Mutagenese die (LL)-Motive gegen Alanine ausgetauscht und die entsprechenden (LL/AA)-mutierten HA-GLUTs in Adipocyten exprimiert.

Es zeigte sich, dass die (LL \rightarrow AA)-Mutation in beiden GLUTs zu einer drastischen Erhöhung (>10-fach) der Zelloberflächenexpression führte – die Insulinstimulierung der Zellen hatte jedoch wie bei den Wildtyp-GLUTs keinen Effekt auf die Oberflächenexpression der Proteine (Abb. 2.17). Die Zelloberflächenexpression der GLUT8-(LL/AA)- und GLUT6-(LL/AA)-Mutanten überstieg die GLUT4-Zelloberflächenexpression nach Insulinstimulierung, was darauf hindeutet, dass die Mutanten annähernd vollständig auf der Plasmamembran exprimiert wurden. Dieser Befund

belegt, dass die intrazelluläre Lokalisation von GLUT6 und GLUT8 auf die Anwesenheit der N-terminalen (LL)-Motive zurückzuführen ist. Zur Erklärung der Funktion der (LL)-Motive bieten sich zwei Möglichkeiten an: Zum einen könnte das (LL)-Motiv an einem intrazellulären Retentionsmechanismus beteiligt sein, der die Transporter innerhalb der Zelle fixiert. Zum anderen könnte das (LL)-Motiv ein Internalisierungssignal für die GLUTs darstellen, dessen Mutation zur Akkumulierung der Transporter auf der Plasmamembran führt. Dieser Mechanismus würde allerdings voraussetzen, dass beide Transporter zwischen intrazellulären Kompartimenten und der Plasmamembran recyceln.

Interessanterweise war die Proteinexpression der HA-GLUT6/8-(LL/AA)-Mutanten höher als die der entsprechenden Wildtypen (Abb. 2.15 und 2.17). Demnach könnte das (LL)-Motiv entweder einen Einfluss auf die Proteinsynthese oder den Proteinabbau der Transporter haben. Man könnte spekulieren, dass die erhöhte Plasmamembran-Lokalisation der (LL/AA)-GLUTs eine Schutzwirkung für den Proteinabbau besitzt, bei dem die Proteine langsamer in den lysosomalen Proteindegradierungsweg eintreten.

In zwei Veröffentlichungen wurde die Zelloberflächenexpression von GLUT8 durch Messung der Glucoseaufnahme in transfizierten *Xenopus-Oocyten* analysiert. Während eine Arbeit die GLUT8-vermittelte Glucosetransportaktivität nur nach Mutation des N-terminalen Dileucin-Motivs beschreibt (Ibberson et al., 2000), konnte in der anderen Studie die Glucosetransportaktivität von GLUT8 auch in Anwesenheit des Dileucin-Motivs gemessen werden (Carayannopoulos et al., 2000). Die Ergebnisse von Ibberson et al. entsprechen somit den hier gefundenen Daten, wobei Vergleiche zwischen Ergebnissen aus *Oocyten* und Säugerzellen nur schwer zu interpretieren sind. So führt die Expression von GLUT1 in *Xenopus-Oocyten* zu einer ausgeprägten intrazellulären Anreicherung, während das Protein in jeder bisher untersuchten Säugerzelle überwiegend auf der Plasmamembran lokalisiert ist (Dauterive et al., 1996).

Die Funktion von Dileucin-Motiven in GLUTs ist ebenfalls strittig. Die GLUT4-Isoform enthält ebenfalls ein (LL)-Motiv, dies ist jedoch im C-Terminus des Proteins lokalisiert. Für ektopisch in COS7- und CHO-Zellen exprimierten GLUT4 (diese Zelllinien enthalten keinen endogenen GLUT4) wurde eine Rolle des (LL)-Motivs in der Endocytose berichtet (Corvera et al., 1994), während die (LL/AA)-Mutation in Adipocyten keinen Effekt auf das Recycling von GLUT4 hat (Al-Hasani et al., 2002). Diese unterschiedlichen Befunde weisen auf eine zellspezifische Funktion dieses Motivs hin, könnten jedoch auch z.B. auf unterschiedliche Expressionsmengen der Proteine zurückzuführen sein.

3.2.4. Koexpression von GLUT8 und GLUT6 mit der Dynamin-(K44A)-Mutante in Adipocyten

Um zu prüfen, ob GLUT6 und GLUT8 in Adipocyten zwischen intrazellulären Kompartimenten und der Plasmamembran recyceln, wurden die HA-markierten GLUTs in Adipocyten exprimiert, in denen die Endocytose durch Koexpression einer dominant-negativen Dynamin-Mutante (K44A) inhibiert war. Die 100 kDa GTPase Dynamin ist eine zentrale Komponente in der Clathrin-vermittelten Endocytose (Henley et al., 1999) und an der Endocytose einer Reihe von Membranproteinen beteiligt. Dynamin bildet (GTP-

abhängig) *in vitro* multimere helicale Strukturen aus, die vermutlich das „Abschnüren“ von Clathrin-Vesikeln von der Plasmamembran katalysieren (Sweitzer und Hinshaw, 1998). Die GTP-bindedefiziente Dynamin-(K44A)-Mutante interferiert mit der Organisation der helicalen Strukturen und verhindert die Assoziation von Dynamin-Monomeren. Die Expression von Dynamin-(K44A) in Adipocyten inhibiert vollständig die Internalisierung von GLUT4 von der Plasmamembran und führt zur Akkumulation des zellulären GLUT4-Vorrats auf der Zelloberfläche (Al-Hasani et al., 1998; Kao et al., 1998).

Die Expression von Dynamin-(K44A) in Adipocyten führte im Versuch zu einer gesteigerten Zelloberflächenexpression von HA-GLUT6, HA-GLUT8 und HA-GLUT4 und ist ein deutlicher Beleg für das Recycling der Glucosetransporter in Adipocyten (Abb. 2.18). Während die Expression von Dynamin-(K44A) offenbar zur Akkumulierung des gesamten GLUT4-Vorrats auf der Zelloberfläche führt, war dieser Effekt für HA-GLUT6 und HA-GLUT8 weniger ausgeprägt (Abb. 2.18). Eine vollständige Akkumulierung der GLUT6/8-Moleküle auf der Zelloberfläche sollte der Zelloberflächenexpression der jeweiligen (LL/AA)-Mutanten entsprechen. Diese Daten legen den Schluss nahe, dass unter den gegebenen Bedingungen nur ein Teil der HA-GLUT6- und HA-GLUT8-Moleküle einem Recycling unterliegt.

Die Koexpression von Dynamin-(K44A) hatte einen schwach inhibitorischen Effekt auf die HA-GLUT6/8-Proteinexpression (Abb. 2.18). Da Dynamin auch in den post-biosynthetischen Transport von Golgi-Vesikeln zur Plasmamembran involviert ist, kann vermutet werden, dass die Prozessierung von HA-GLUT6/8 durch die mutierte GTPase gestört wurde.

Zusammengefasst demonstrieren die Ergebnisse deutlich, dass die beiden neuartigen Glucosetransporter GLUT8 und GLUT6 in Adipocyten einem Recycling zwischen intrazellulären Kompartimenten und der Plasmamembran unterliegen. Für GLUT8 konnte dieses Ergebnis ebenfalls in transfizierten COS-7-Zellen reproduziert werden, die diesen Transporter natürlicherweise nicht enthalten. Während Wildtyp-HA-GLUT8 intrazellulär in diesen Zellen vorlag, bewirkte die Mutation des (LL)-Motivs oder die Expression der Dynamin-Mutante eine deutliche Verschiebung des Fluoreszenzsignals vom Inneren der Zelle zur Plasmamembran.

3.2.5 Stimulierung der GLUT8- und GLUT6-Translokation in primären Adipocyten

Die Beobachtung, dass in Adipocyten der überwiegende Anteil (ca. 90%) von HA-GLUT6 und HA-GLUT8 intrazellulär lokalisiert ist, lässt vermuten, dass in Analogie zum GLUT4 die Zellen zur Translokation der Transporter zur Plasmamembran befähigt sein könnten. Obwohl der genaue Mechanismus der GLUT4-Translokation bisher nur teilweise verstanden ist, sind eine Reihe von Signalwegen bzw. Stimuli bekannt, die zur Translokation von GLUT4 führen oder die Plasmamembranexpression von GLUT4 modulieren. Additiv zur Insulinstimulierung bewirkt die Kontraktion von Muskelzellen, vermutlich über eine AMP-abhängige Kinase, die Translokation von GLUT4 (Hayashi et al., 1998). In Adipocyten bewirkt die Stimulierung mit Phorbolestern oder Hyperosmolarität ebenfalls eine Translokation von GLUT4 (Todaka et al., 1996; Chen et al., 1997), die physiologische Bedeutung dieser Effekte ist jedoch unbekannt. Katecholamine und andere

Agonisten β -adrenerger Rezeptoren modulieren die Plasmamembranexpression von GLUT4 über einen unbekanntem Mechanismus, der offenbar über heterotetramere G-Proteine vermittelt wird (Kishi et al., 1996; Ferrara und Cushman, 1999). Die Tabelle 3.1 gibt einen Überblick über die untersuchten GLUT4-Stimuli und ihre unterschiedlichen Signalwege.

Um zu untersuchen, welcher Stimulus die GLUT6/8-Translokation von internen Kompartimenten zur Plasmamembran bewirken kann, habe ich Adipocyten mit Wildtyp-HA-GLUT6 oder Wildtyp-HA-GLUT8 transfiziert und mit verschiedenen Agenzien behandelt.

Stimuli	Signalwege	GLUT4-Effekt	Referenzen
Insulin	PI3K-abhängiger Weg und Cbl/CAP-Weg	Stimulierung der Translokation	Holman und Cushman, 1994
Phorbolster (z.B.PMA)	Aktivierung der Proteinkinase-C		Todaka et al., 1996
Hyperosmolarität	Aktivierung von Tyrosinkinasen		Czech und Corvera, 1999
GTP γ S	Aktivierung der Proteinkinase-B		Elmendorf et al., 1998
Insulin/ISO/ADA	Aktivierung von G-Proteinen		Ferrara und Cushman, 1999
Vasopressin	Aktivierung der Proteinkinase-C/ Aktivierung der Phosphoinositol-3-Kinase		Lange et al., 1997
Oxytocin	Aktivierung der Proteinkinase-C		Keller, 2003
Muskelkontraktion	AMP-abhängige Kinase		Hayashi et al., 1998

Tab. 3.1. Die GLUT4-Stimuli und ihre Signalwege.

Dargestellt sind die bekannten GLUT4-Stimuli, ihre Signalwege, der GLUT4-Effekt und die dazugehörige Referenz. Alle Stimuli bewirken einen Anstieg der GLUT4-Translokation zur Plasmamembran. Diese Stimulierung erfolgt jedoch über unterschiedliche Signalwege. ISO/ADA, Isoproterenol/Adenosindeaminase.

In den Versuchen bewirkte die Stimulierung der Adipocyten mit Insulin, Phorbolster oder Hyperosmolarität wie erwartet eine Translokation von HA-GLUT4 zur Plasmamembran. Im Gegensatz dazu wurde, ebenso wie erwartet, die insulinstimulierte Plasmamembranexpression von HA-GLUT4 durch Isoproterenol inhibiert. Isoproterenol aktiviert das G(s)-Protein, das wiederum die insulinstimulierte Glucosetransport-Aktivität in isolierten Ratten-Adipocyten verringert (Ferrara und Cushman, 1999).

Keine einzige der getesteten Bedingungen führte jedoch zu einer signifikanten Änderung der Plasmamembranexpression von HA-GLUT6 oder HA-GLUT8.

Sorbitol (osmotischer Schock) hatte nahezu den gleichen Effekt auf die GLUT4-Translokation zur Plasmamembran wie Insulin. Jedoch wiesen GLUT6 und GLUT8 keine erhöhte Translokation nach Hyperosmolarität auf. Auch PMA (Aktivierung der Proteinkinase-C) demonstrierte eine hohe Stimulierung der GLUT4-Translokation jedoch keine GLUT6/8-Stimulierung. Somit wird die GLUT6/8-Translokation nicht über Stresskinasen, Proteinkinase-C und der Phosphoinositol-3-Kinase stimuliert. Weiterhin konnte ebenfalls eine GLUT4-Stimulierung durch Insulin/ISO/ADA, GTP α S und Oxytocin nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu PMA und Hyperosmolarität wiesen diese Stimuli eine schwächere Wirkung auf die GLUT4-Translokation auf. GLUT6/8 zeigten keine

Translokationsänderung und werden somit nicht über die Proteinkinase-B und die G-Proteine stimuliert. Somit bleibt ein theoretischer Stimulus weiterhin unbekannt.

GLUT8 und GLUT6 recyceln langsam zwischen internen Kompartimenten und der Plasmamembran (s. Ergebnisse/Abschnitt 2.2.5.). Durch die Ergebnisse der Dynamin-(K44A)-Versuche wurde das Recycling an der Plasmamembran blockiert. Die physiologische Rolle von GLUT8 und GLUT6 in primären Adipocytten ist unsicher, jedoch konnte nachgewiesen werden, dass Blastocysten, die selber kein GLUT4 enthielten, eine GLUT8-Translokation zur Plasmamembran nach Insulinstimulierung aufwiesen (Carayannopoulos et al., 2000).

3.2.6. Die biologische Funktion von GLUT8 in Adipocytten

Die meisten Untersuchungen zur GLUT8-Funktion wurden *in vitro* oder in *Oocytten*, Gehirn und Testis durchgeführt. Die höchste GLUT8-mRNA-Konzentration konnte in Testis bestimmt werden, so dass GLUT8 vermutlich eine wesentliche Funktion in diesem Gewebe aufweist. Schürmann et al konnten 2002 nachweisen, dass eine hohe GLUT8-Konzentration in den Köpfen von Maus- und Mensch-Spermatozoen zu finden ist. Das Ergebnis lässt auf eine GLUT8-Funktion bei der Glucose-Versorgung der Spermazellen schließen. Ibberson et al demonstrierten, dass GLUT8 in speziellen Gehirnregionen und Neuronen vorhanden ist, wo es eine Rolle im Gehirn-Metabolismus spielt (Ibberson et al., 2002). Weiterhin ist bekannt, dass während der *Blastocysten*-Entwicklung der Embryo sehr schnell von Pyruvat als primäre Energiequelle zu Glucose umsteigt. Um den Glucosetransport in dieser kritischen Phase zu maximalisieren wird die GLUT8-Expression stark erhöht (Carayannopoulos et al., 2000). Da die GLUT8-Expression in adulten Geweben wie z.B. Gehirn, Muskel und Fett geringer ist als in z.B. *Blastocysten* wird vermutet, dass die GLUT8-Funktion nur während der Embryonalentwicklung ausgeübt wird, damit der Embryo zusätzlich mit Glucose versorgt werden kann. GLUT8 wäre somit vor allem ein embryonaler Transporter.

Während der embryonalen Entwicklung von Maus-Leberzellen werden diese kontinuierlich mit Glucose aus dem mütterlichen Blut versorgt. In dieser Entwicklungsphase ist die GLUT8-mRNA-Rate der Leber besonders hoch. Mit zunehmender Maus-Entwicklungsstufe nimmt die GLUT8-mRNA-Rate wieder ab, da die GLUT1- und GLUT2-Proteinexpression in der Leber hochreguliert wird (Gorovits et al., 2003). Interessant ist, dass die GLUT8-mRNA-Rate in der Leber von jungen Mäusen (ca. 28 Tage nach der Geburt) wieder ein Maximum erreicht, nach etwa 6 Wochen jedoch stark abgesenkt wird (Gorovits et al., 2003). Während der Säugungsphase nehmen die Mäuse hohe Mengen an Proteinen und Triacylglycerinen mit der mütterlichen Milch auf. Im Gegensatz dazu ist der Kohlenhydrat-Anteil der Milch nur gering. In der Entwöhnungsphase hingegen ist der Kohlenhydrat-Anteil der Nahrung hoch und der Fettanteil gering. In dieser Phase ist der Insulinspiegel und die GLUT4-mRNA-Konzentration im Fett- und Muskelgewebe ca. 2-3-fach erhöht. Es wird angenommen, dass die GLUT8-mRNA-Konzentration durch den erhöhten glycolytischen Austausch und den erhöhten Insulinspiegel in dieser Phase reguliert wird (Gorovits et al., 2003).

GLUT8 wird auch in differenzierten (adulten) Adipocytten exprimiert und muss somit eine Funktion in diesem Gewebe ausüben. Es ist möglich, dass die GLUT8-Funktion in

Adipocyten erst unter extremen Bedingungen ausgeübt wird. Jedoch wies ein osmotischer Schock (Mannose und Sorbitol) keine GLUT8-Translokation zur Plasmamembran auf. Trotzdem könnte GLUT8 theoretisch eine ausreichende Glucoseversorgung der Adipocyten unter z.B. Glucosemangel-Bedingungen gewährleisten, da dieser Transporter alle Eigenschaften und wichtigen Aminosäuren eines GLUT-Transporters besitzt. Da GLUT8 jedoch keine Insulinstimulierung aufweist und auch andere GLUT4-Stimuli keinen Effekt auf die GLUT8-Translokation aufwiesen ist es unwahrscheinlich, dass dieser Transporter z.B. den GLUT4-Effekt kompensieren kann.

Möglicherweise übt GLUT8 ausschließlich eine Funktion während der Adipocytenentwicklung aus und versorgt die Zellen in diesem Entwicklungsstadium zusätzlich mit Glucose. Wenn die Adipocyten vollständig ausdifferenziert sind übernimmt GLUT4 diese Rolle. Thorens et al stellten die Hypothese auf, das GLUT8 in der Leber möglicherweise prädominant intrazellulär lokalisiert ist und dort eine Funktion beim intrazellulären *Trafficking* von Substraten ausübt. Es bleibt weiterhin unklar, welche Funktion GLUT8 in Adipocyten ausübt.

3.2.7. Zusammenfassung der GLUT8- und GLUT6-Ergebnisse/Diskussion

- Es wurde ein Hämagglutinin-(HA)-Epitopmarker in den Loop9 von GLUT6 und GLUT8 kloniert, um die beiden GLUT-Transporter mittels eines radioaktiven Antikörperbindungsnachweises auf der Plasmamembran von intakten Ratten-Adipocyten zu detektieren.
- Zusätzlich zu den Wildtyp-Transportern, die von Doege et al kloniert wurden, konnte ein Konstrukt untersucht werden, bei dem ein (LL)-Motiv im HA-GLUT6- und HA-GLUT8-N-Terminus mit Hilfe der PCR-Mutagenese zu Alanin (LL→AA) mutiert wurde. Das (LL)-Motiv ist ebenfalls im GLUT4-C-Terminus enthalten und ist in der Literatur als Reinternalisierungsmotiv beschrieben.
- **Ergebnis:** Wildtyp-GLUT6/8 befinden sich in intrazellulären Kompartimenten und recyceln nur langsam zwischen dem Zellinneren und der Plasmamembran. Durch Mutation des N-terminalen (LL)-Motivs, konnten beide Transporter nicht mehr von der Plasmamembran reinternalisiert werden, so dass sie an der Zelloberfläche akkumulierten. Dieses Ergebnis demonstrierte, dass es sich bei dem HA-GLUT6/8-N-terminalen (LL)-Motiv um ein Reinternalisierungsmotiv handelt. Somit verhindert das (LL)-Motiv die HA-GLUT6/8-Translokation zur Plasmamembran.
- Die Wildtyp-Transporter sowie die HA-GLUT6-(LL/AA)- und HA-GLUT8-(LL/AA)-Mutanten wurden in intakte primäre Ratten-Adipocyten transfiziert und es wurde die GLUT-Zelloberflächenexpression +/- Insulin bestimmt. Als Kontrolle wurde die Zelloberflächenexpression von HA-GLUT4 und HA-GLUT1 ermittelt. **Ergebnis:** Sowohl die beiden Wildtyp-HA-GLUT6/8-Transporter, als auch die beiden (LL/AA)-Mutanten, wiesen keinen Anstieg in der Zelloberflächenexpression nach Insulinstimulierung auf.
- HA-GLUT6-(wt) und HA-GLUT8-(wt) wurden mit der dominant-negativen Dynamin-(K44A)-Mutante in primäre Ratten-Adipocyten kotransfiziert und es

wurde ebenfalls die Zelloberflächenexpression bestimmt. Als Kontrolle diente der HA-GLUT4.

- **Ergebnis:** Durch diesen Versuch wurde nachgewiesen, dass HA-GLUT6 und HA-GLUT8 in einem Dynamin-abhängigen Prozess zwischen der Plasmamembran und intrazellulären Kompartimenten recyceln.
- HA-GLUT6 und HA-GLUT8 wiesen im Gegensatz zu HA-GLUT4 keine Insulinstimulierung auf. Zusätzlich wurden die beiden Transporter mit Phorbolestern (PMA), Hyperosmolarität, Vasopressin, GTP γ S, Isoproterenol, Oxytocin und Peroxyvanadat stimuliert.
- **Ergebnis:** Keiner der untersuchten GLUT4-Stimuli ergab eine Stimulierung der HA-GLUT6- und HA-GLUT8-Translokation in primären Adipocyten.

Durch die Versuche konnte nachgewiesen werden, dass GLUT8 und GLUT6 in einem Dynamin-abhängigen Prozess zwischen internen Kompartimenten und der Plasmamembran recyceln, und dass in insulinempfindlichen primären Adipocyten die Überexpression von GLUT6 und GLUT8 nicht den insulinregulierten Glucosetransport in GLUT4-*null* Mäusen erklärt, weil keine Insulinstimulierung von GLUT6 und GLUT8 nachgewiesen werden konnte. Für die insulinstimulierte Translokation von GLUT8 in Blastocysten (Carayannopoulos et al., 2000) müssen wahrscheinlich spezielle zellspezifische Faktoren eine wichtige Rolle spielen. Durch die Mutation eines Dileucin-Motivs im GLUT6- und GLUT8-N-Terminus kommt es zu einer erhöhten Zelloberflächenlokalisation beider Transporter. Das Dileucin-Motiv im N-Terminus von GLUT6 und GLUT8 stellt somit ein Reinternalisierungsmotiv dar.

4. Methoden

4.1. Molekularbiologische Methoden

Die nachfolgenden Methoden wurden gemäß Standardprotokollen durchgeführt: Agarose-Gelelektrophorese, DNA-Extraktion aus dem Agarosegel, DNA-Fällung, Konzentrationsbestimmung von DNA, Plasmid-Präparation (kleine Präparation und große Präparation), Restriktionsendonukleolytische Spaltung, Ligation, PCR-Reaktion.

4.1.1. Agarose-Gelelektrophorese

1. DNA-Leiter und Proben auftragen.
2. 3 µl DNA-Leiter in einen Probenschlitz. DNA-Leiter entsprechend der erwarteten Fragmente wählen.
3. Je 10-25 µl einer Probe mit 3 µl 10x DNA-Probenpuffer mischen.
4. DNA-Probenpuffer *Bromphenolblau* läuft bei ca. 200-300 bp; gut geeignet für Fragmente über 300 bp Länge.
5. DNA-Probenpuffer *Xylencyanol* läuft bei ca. 2000 bp; gut geeignet für kurze Fragmente.
6. Elektrophorese starten. (100 V, ca. 30 min)
7. Abschalten der Elektrophorese je nach Position der DNA-Probenpuffer-Bande.
8. Betrachten des Gels auf einer UV-Lampe und mit der Gelkamera photographieren.

4.1.2. Extraktion der DNA mit dem „UltraClean 15, DNA-Purification Kit“

1. Bestimmung des Gewichts der Gelbande in einem 1,5-2,0 ml Eppendorfgefäß.
2. Für TAE Gele: Zugabe von 3 Volumen ULTRA SALT. Gut mischen.
3. Nach Salzzugabe wird das Gelstück bei 55°C-65°C inkubiert.
4. Nachdem das Gelstück komplett geschmolzen ist wird 5 µl plus 1 µl per µg DNA *ULTRA BIND* hinzugefügt. Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur.
5. Zentrifugation für 5 Sekunden. Überstand wird abgenommen und das Pellet mit 1 ml *ULTRA WASH* für 5-10 Sekunden vortexen.
6. Zentrifugation für 5 Sekunden. Überstand verwerfen und noch mal 5 Sekunden zentrifugieren.
7. Lösen des DNA-Unterstands in Wasser oder TE-Puffer.

4.1.3. DNA-Fällung mit Ethanol

1. 50 µl Plasmidpräparation
2. Zugabe von 5 µl **NaOAc** (Natriumacetat, pH 5,2, 3M).
3. Zugabe von 150 µl 100% **EtOH**.
4. In Tischzentrifuge bei 15.000 rpm ca. 15 min zentrifugieren.
5. Überstand verwerfen.
6. 1,4 ml **70% EtOH** dazugeben.
7. 5 min auf *Eis* stellen.
8. In Tischzentrifuge bei 15.000 rpm ca. 15 min zentrifugieren.

9. Überstand verwerfen.
10. Unterstand an der Luft trocknen lassen.
11. In **TE-Puffer** oder MQ aufnehmen.

4.1.4. Plasmidpräparation (1-3ml Bakterienkultur)

1. 1,5 ml Übernachtskultur zentrifugieren (1 min, 10.000g)
2. Überstand verwerfen (bis auf ca. 50-100µl)
3. Pellet resuspendieren, 300 µl frisch angesetzten TENS-Puffer zugeben
4. 4× invertieren
5. 150 µl 3M NaOAc (pH 5) dazugeben
6. 4× invertieren
7. zentrifugieren (10 min, max rpm)
8. Überstand in neues Eppendorfgefäß transferieren, Pellet verwerfen
9. Zum Überstand 900 µl 100% EtOH dazugeben
10. zentrifugieren (15 min, max rpm)
11. Überstand verwerfen
12. 750 µl 70% EtOH hinzugeben
13. zentrifugieren (5 min, max rpm)
14. Überstand verwerfen

Pellet in 50-100 µl TE-Puffer *mit RNase* aufnehmen

4.1.4.1. Plasmidpräparation (10-50ml Bakterienkultur)

1. Übernachtskultur bei 3500 g für 15 min bei 4°C zentrifugieren.
2. Überstand verwerfen.
3. resuspendieren in 4 ml (*low-copy:8 ml*) **Puffer S1+RNase** auf Eis.
4. hinzufügen von 4 ml (*low-copy:8 ml*) **Puffer S2**.
5. mehrmals invertieren
6. hinzufügen von 4 ml (*low-copy:8 ml*) **Puffer S3**.
7. mehrmals invertieren
8. für 5 min auf Eis stehen lassen.
9. bei 15.000g 4°C für 35 min zentrifugieren.
10. Überstand durch Papierfilter auf Säule geben.
11. Säule 2x mit 5 ml **Puffer N3** waschen, Durchlauf verwerfen.
12. Säule mit 4x 1 ml **Puffer N5** eluieren.
13. + 0,8 ml **Isopropanol** hinzufügen.
14. zentrifugieren bei 4°C für 30 min in der Tischzentrifuge bei 20.000g.
15. Überstand verwerfen.
16. waschen mit *kalt*em 1,4 ml **70% EtOH**.
17. zentrifugieren bei 15.000g bei 4°C für 10 min.
18. Überstand verwerfen.
19. trocknen (bei Raumtemperatur für 10 min).
20. Aufnehmen in **TE-Puffer**.

4.1.5. Restriktionsendonukleolytische Spaltung

Die DNA wurde mittels Restriktionsendonukleasen gespalten. Dabei wird die DNA mit den Enzymen bei spezifischen Pufferbedingungen eine Stunde bei 37°C inkubiert.

4.1.5.1. Ligation

Die linearisierte DNA (z.B. Plasmid) kann mittels einer Ligase mit einem anderen DNA-Molekül (z.B. *Insert*) unter ATP-Verbrauch verknüpft werden. Diese Reaktion erfolgt für 3 Stunden bei Raumtemperatur bzw. für ca. 15 Stunden bei 16°C.

4.1.6. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Durch die PCR-Methode kann ein DNA-Abschnitt mittels einer hitzestabilen DNA-Polymerase vervielfältigt werden. Die Anzahl der Zyklen beträgt in der Regel 20-40 und wird der erwarteten Genauigkeit der Amplifikation angepasst.

4.1.7. Bakterienkultur

Zellen des *E.coli* Stammes DH5 α wurden bei 37°C in Luria-Berani-Medium (LB-Medium) und auf LB-Agarplatten kultiviert (Sambrook et al. 1989).

4.1.7.1. Herstellung kompetenter Bakterien

Kompetente Bakterien wurden nach Chung et al. (1989) mit TSS Puffer (85 % LB-Medium, 10 % (w/v) Polyethylenglycol, 5 % (v/v) DMSO, 50 mM MgCl₂, pH6,5) hergestellt und bei -80°C gelagert. Die Transformation der Bakterien erfolgte durch Hitzeschock und durch Elektrotransformation.

4.1.8. Konstruktion von Haemagglutinin (HA)-GLUT6 und HA-GLUT8-Mutanten

Die Konstruktion der Expressionsplasmide für HA-GLUT4, HA-GLUT1 und Dynamamin (K44A) (eine dominant-negative Dynamamin-Mutante) wurde kürzlich beschrieben (Al-Hasani et al. 1998 und 1999). Es wurde die gerichtete PCR-Mutagenese unter Anwendung der PCR-*QuikChange*-Methode (Stratagene, La Jolla, CA, U.S.A.) durchgeführt. Für die PCR-Amplifikation wurde die PCR-Polymerase von Stratagene benutzt und es wurden 16-20 Amplifikationszyklen gewählt. Als Matrix wurden die cDNAs von GLUT6 und GLUT8 (GenBank, Y17803 und Y17802) kloniert in den pUC18-Vektor verwendet. Es wurde eine einzigartige NcoI-Restriktionsschnittstelle in die cDNAs von GLUT6 und GLUT8 eingeführt, ohne die Aminosäuresequenz im externen Loop zu ändern.

Der Mutageneseprimer („sense“ Strang, Austausch eingerahmt) für GLUT6 war: 5'- GGC CTG GAA AGC G CT AGC TGG GGG GAC TTG GCG - 3'.

Der Mutageneseprimer („sense“ Strang, Austausch eingerahmt) für GLUT8 war: 5'- GGC CTG GTG CCC ATC GC T AGC GAG CCT GTG GAT GTC - 3'.

In die NcoI-Schnittstelle wurde ein Oligonukleotid, welches für einen HA-Epitopmarker kodiert, ligiert.

Die HA-Epitopmarker-Sequenz („sense“ Strang) war: 5'- TAC CCA TAC GAC GTG CCA GAC TAC GCC – 3'.

Der Mutageneseprimer („sense“ Strang, Austausch eingerahmt) der Dileucin (LL) zu Dialanin (AA) Mutation für HA-GLUT6(LL/AA) war: 5'- GCC ATG CAG GAG CCG GCC GCC GG C GCC GAG GGC CCG – 3'.

Der Mutageneseprimer („sense“ Strang, Austausch eingerahmt) der Dileucin (LL) zu Dialanin (AA) Mutation für HA-GLUT8(LL/AA) war: 5'- CAG GAG ACG CAG CCG GCC GCC CGG CCA CCG GAA GCC – 3'.

Am Ende wurden die EcoRI/HindIII-Fragmente der cDNAs von HA-GLUT6 und HA-GLUT8 in den Expressionsvektor pcDNA3 (Invitrogen, San Diego, CA, U.S.A.) kloniert. Alle cDNA-Sequenzen wurden durch DANN-Sequenzierung überprüft.

4.1.8.1. Konstruktion von Hämagglutinin-(HA)-GLUT10

Das Expressionsplasmid pcDNA3 wurde mit den Restriktionsendonukleasen HindIII und EcoRI linearisiert. Das ebenfalls mit HindIII/EcoRI geschnittene GLUT10-Insert wurde danach in den pcDNA3-Vektor ligiert. Danach wurde das GLUT10-Insert mit den Restriktionsendonukleasen HindIII und BglII aus dem pcDNA3-Vektor herausgeschnitten und in den linearisierten pBSK- Vektor subkloniert. In eine einzigartige EcoRI-Schnittstelle im GLUT10 ist der Haemagglutinin (HA)-Epitopmarker ligiert worden.

Die HA-Epitopmarker-Sequenz („sense“ Strang) war: 5'- AAT TAT ACC CAT ACG ACG TGC CAG ACT ACG CCG GGT CCG GGC – 3'.

Die HA-GLUT10-cDNA konnte mittels HindIII/BglII-Restriktionsverdau in den Expressionsvektor pcDNA3 kloniert werden. Das GLUT10-Konstrukt wurde mittels DNA-Sequenzierung überprüft (Die GLUT10-Ergebnisse sind nicht gezeigt).

4.1.8.2. Klonierung der Tankyrase in den pcMV-HA-Expressionsvektor

Die Tankyrase-cDNA ist mit der Restriktionsendonuklease NotI linearisiert und in den mit NotI geschnittenen Expressionsvektor pcMV-HA ligiert worden. Die Überprüfung des Tankyrase-Konstrukts erfolgte mittels Restriktionsverdau mit der Restriktionsendonuklease NdeI und durch DNA-Sequenzierung (Die HA-Tankyrase-Ergebnisse sind nicht gezeigt).

4.1.9. Konstruktion des p19 DNA-Fragments

4.1.9.1. Klonierung von p19 DNA-Fragment in den pGEX-3X-Expressionsvektor

Das p19-Proteinfragment wurde mit der Restriktionsendonuklease BglII geschnitten und in den mit BamHI linearisierten Expressionsvektor pGEX-3X ligiert. Die Verifikation des p19-Konstrukts erfolgte mittels Restriktionsverdau mit der Restriktionsendonuklease SmaI.

4.1.9.2. Klonierung von p19 DNA-Fragment in den pEGFP-C1-Expressionsvektor

p19 wurde mit den Restriktionsendonukleasen XhoI und EcoRI geschnitten und in den XhoI/EcoRI linearisierten pEGFP-C1-Expressionsvektor kloniert. Das Konstrukt wurde mittels Restriktionsverdau mit XhoI/EcoRI überprüft.

4.1.9.3. Klonierung von p19 DNA-Fragment in den pCMV-Myc.-Expressionsvektor

Nach dem Restriktionsverdau mit der Restriktionsendonuklease BglII wurde p19 in den mit BglII geschnittenen pCMV-myc.-Expressionsvektor ligiert. Das Konstrukt wurde mittels Restriktionsverdau mit der Restriktionsendonuklease BglII verifiziert.

4.1.10. Klonierung und Konstruktion des Vollängen-p49-Proteins

4.1.10.1. Klonierung des Vollängen-p49 aus einer Mausgehirn-cDNA-Bank

Um p49 zu klonieren, wurde eine PCR-Reaktion durchgeführt. Dabei diente eine cDNA-Bank aus Mausgehirn als Matrix. Die PCR-Primer waren :

1. p49EcoRI („sense“ Strang): 5'- CAG AAT TCG AGG CAG CAA GTA TCA AAT CAA TC – 3'.
2. p49XhoI („sense“ Strang): 5'- CGA CTC GAG CCA TGG CGG CTG ACC CTC TTC CTC – 3'.

Für die PCR-Amplifikation wurde die PCR-Polymerase (Pfu) von Stratagene benutzt und es wurden 25 Amplifikationszyklen gewählt. Danach konnte p49 aus einem 1%igen Agarosegel mit dem *QIAquick-PCR-Purification-Kit* gereinigt und die Konzentration bestimmt werden.

4.1.10.2. Klonierung von p49 in den pBluescript II-KS-Vektor

p49 wurde für eine Stunde bei 37°C mit der T4-Polynuklease-Kinase (PNK) von *MBI Fermentas* phosphoryliert und danach in den mit der Restriktionsendonuklease SmaI linearisierten und dephosphorylierten pBluescript II-KS-Vektor „blunt end“ über Nacht bei 16°C ligiert.

4.1.10.3. Klonierung von p49 in den pEGFP-C1-Expressionsvektor

Die p49-cDNA wurde mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und XhoI inkubiert und danach in den ebenfalls mit EcoRI/XhoI geschnittenen pEGFP-C1-Expressionsvektor ligiert. Die Klonierung wurde mittels Restriktionsverdau mit EcoRI/XhoI überprüft.

4.1.10.4. Klonierung von p49 in den pGEX-3X-Expressionsvektor

Dabei wurde p49 mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und XhoI geschnitten und mit Hilfe eines BamHI/XhoI-Adapters in den BamHI/EcoRI linearisierten pGEX-3X-Vektor ligiert. Das Konstrukt wurde mittels Restriktionsverdau mit den Restriktionsendonukleasen XhoI und EcoRI und DNA-Sequenzierung verifiziert.

BamHI/XhoI-Adapter („sense“ Strang): 5'- GAT CCT ATC AGG ATC ATC – 3'.

4.1.10.5. Klonierung von p49 in den pcMV-myc.-Expressionsvektor

p49 wurde aus dem pEGFP-C1-Expressionsvektor mit den Restriktionsendonukleasen XhoI/SalI herausgeschnitten und mittels einem EcoRI/XhoI-Adapter in den mit EcoRI/SalI linearisierten pcMV-myc.-Expressionsvektor ligiert. Das Konstrukt wurde mittels Restriktionsverdau mit EcoRI/SalI verifiziert.

EcoRI/XhoI-Adapter („sense“ Strang): 5'- AAT TCT ATC AGG ATC ATC – 3'.

4.1.10.6. Klonierung von p49 in die Hefe-Expressionsvektoren: pAS2-1 und pGED424

Die beiden Hefe-Expressionsvektoren: pAS2-1 und pGED424 wurden mit der Restriktionsendonuklease SmaI linearisiert und die „sticky ends“ wurden mittels der Klenow-Polymerase zu „blunt ends“ aufgefüllt. p49 wurde mit den Restriktionsendonukleasen NcoI/EcoRI geschnitten und die beiden Enden ebenfalls mittels Klenow-Polymerase aufgefüllt. Die beiden Ligationen erfolgten über Nacht bei 16°C. Die Konstrukte wurden mittels Restriktionsverdau mit BamHI/EcoRI überprüft.

4.1.11. Klonierung von p49-N-Terminus, p49-C-Terminus und p49 ohne C-terminale Prolin-reiche-Sequenz

p49-N-Terminus wurde durch die PCR-Reaktion mit den beiden PCR-Primern: p49XhoI und p49EcoRI aus dem Vollängen-p49-Konstrukt amplifiziert. Als Matrix diente p49 im pGEX-3X-Expressionsvektor. Die Primersequenzen für p49-N-Terminus waren:

1. p49XhoI („sense“ Strang): 5'- CGA CTC GAG CCA TGG CGG CTG ACC CTC TTC CTC – 3'.
2. p49EcoRI („sense“ Strang): 5'- CAG AAT TCG CCC TGG AGT GGT CCC TGC TCT – 3'.

p49-C-Terminus wurde ebenfalls durch die PCR-Reaktion aus dem Vollängen-p49 amplifiziert (Ergebnisse nicht gezeigt). Die PCR-Primersequenzen waren:

1. 2p49XhoI („sense“ Strang): 5'- CGA CTC GAG CCA GGG ACC ACT CCA GGG TCT CAG – 3'.
2. 2p49EcoRI („sense“ Strang): 5'- GAT TGA TTT GAT ACT TGC TGC CTC GAA TTC TG – 3'.

Die PCR-Primersequenzen für das p49 ohne C-terminale Prolin-reiche-Sequenz (Ergebnisse nicht gezeigt) waren:

1. 3p49XhoI („sense“ Strang): 5'- CGA CTC GAG CCA GGG ACC ACT CCA GGG TCT CAG – 3'.
2. 3p49BglIstop („sense“ Strang): 5'- ACT AGA TCT TTA TGC CTG CAT CGT CTG CTT CAC –3'.

Für die drei PCR-Reaktionen wurde die PCR-Polymerase von Stratagene benutzt und es wurden je 30 Amplifikationszyklen gewählt. Die drei Konstrukt wurden anschließend in den pcMV-myc.-Expressionsvektor kloniert.

4.1.12. Konstruktion des GST-(Glutathion-S-Transferase)-GLUT4-N-Terminus

Durch einen Sall-Adapter wurde die MCS (*multi cloning side*) im pGEX-3X-Expressionsvektor umgedreht. Danach wurde der pGEX-3X-Vektor mit den Restriktionsendonukleasen BamHI/EcoRI linearisiert. Dadurch konnte der ebenfalls mit BamHI/EcoRI geschnittene GLUT4 N-Terminus in den Vektor ligiert werden.

4.1.12.1. Konstruktion des GST-GLUT4-(ED/QN)-N-Terminus

Für die Konstruktion der GST-GLUT4-(ED/QN)-NT-Mutante wurde die PCR-Mutagenesereaktion durchgeführt. Es wurde die PCR-Polymerase von Stratagene und 15 Amplifikationszyklen gewählt. Als Template diente Wildtyp-GST-GLUT4-NT. Der PCR-Mutageneseprimer war:

PCR-Mutageneseprimer („sense“ Strang, Austausch eingerahmt): 5'- GCT TCC AAC AGA TAG G $\boxed{\text{A}}$ T CC $\boxed{\text{C}}$ AA $\boxed{\text{A}}$ ATG GGG AAC CCC CTC – 3'.

Nach der PCR-Mutagenese konnte die Wildtyp-GST-GLUT4-NT-Sequenz durch DpnI-Verdau entfernt werden, so dass nur das GST-GLUT4-(ED/QN)-NT-Konstrukt erhalten blieb.

4.1.12.2. Konstruktion von GLUT4-N-Termins (Wildtyp, ED/QN-Mutante) und drei überlappenden GLUT4-N-Terminus-Mutanten (Mutante A, B und C) für das Hefe-Two-Hybrid-System

Die Konstruktion der GLUT4-N-Terminus-Konstrukte für das Hefe-Two-Hybrid-System wurde von Dr. Al-Hasani durchgeführt und sind im J.Cell Sci, 2002. *Roles of the N- and C-termini of GLUT4 in endocytosis*, beschrieben.

4.2. Protein-Biochemische Methoden

4.2.1. Expression und Reinigung von GST-Fusionsproteinen aus *E. coli*

Für die Expression der GST-Fusionsproteine GST-p19, GST-p49, GST-GLUT4-N-Terminus, GST-GLUT4-(ED/QN)-N-Terminus wurde der pGEX-3X-Expressionsvektor verwendet und die Expression erfolgte in *E. coli* DH5 α . Die Anzucht der Bakterien, die Induktion der Proteinexpression und die Reinigung der GST-Fusionsproteine durch Affinitätschromatographie mit Glutathion-Sepharose erfolgte nach Smith & Johnson (1988). Benötigte Puffer:

MTPBS: 20 mM Natriumphosphat pH 7,4, 0,15 NaCl
Elutionspuffer: 50 mM Tris-HCl pH 8,5, 5 mM reduziertes Glutathion (GST)

4.2.1.1. Expression der Fusionsproteine in *E. coli*

1. Transformierte *E. coli* DH5 α in LB+Amp-Medium animpfen und 16 Stunden inkubieren (37°C, 220rpm).
2. Übernachtkultur 1:10 mit LB+Amp-Medium verdünnen.
3. 1 Stunde Inkubation bei 37°C und 220rpm.
4. Induktion mit 1 mM IPTG.
5. 3-4 Stunden Inkubation bei 37°C und 220rpm.
6. Zentrifugation der Bakterien bei 6.000 x g, 4°C für 10 min.

4.2.1.2. Aufschluss der Bakterien

1. Bakterien werden mit 1/50 Kulturvolumen eiskaltem MTPBS gewaschen.
2. Zentrifugation bei 6.000 x g, 4°C für 10 min.
3. Bakterien in 1/100 Kulturvolumen eiskaltem MTPBS (1 mM PMSF, 10 μ m/ml Leupeptin) resuspendieren.
4. Aufschluss durch Ultraschall (1 min, 100 Watt, auf Eis).
5. Zugabe von Triton X-100 auf 1% (v/v).
6. Zentrifugation bei 12.000 x g, 4°C für 15 min.

4.2.2. Reinigung der Fusionsproteine (GST-p19, GST-p49) durch Glutathion-Affinitätschromatographie

1. GST-Sepharose mit 10 Gelvolumen MTPBS äquilibrieren.
2. Bakterienüberstand nach Zentrifugation abnehmen und in 50 ml Polypropylen-Röhrchen überführen.
3. 1 ml gesetztes Gelbett pro 10 ml Probe.
4. 30 min Inkubation, 4°C.
5. Gelbett 3 x 10 min mit je 50 ml MTPBS waschen.
6. Elution mit 3 x 2 Gelvolumen Elutionspuffer, Eluate vereinigen.

Die Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidelektrophoresen wurden nach Laemmli (1970) und Wilson und Gouling (1991) durchgeführt. Die Proteinbanden wurden durch Coomassie-

Färbung (Färbelösung: 0,1% Coomassie R-250 in 50% Methanol, 10% Essigsäure, Entfärbelösung: 50% Methanol, 7% Essigsäure) und Peptidfärbung (Blakesley und Boezi (1977)) sichtbar gemacht.

4.2.3. Transfer und immunologischer Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membran

Der Transfer von Proteinen erfolgte im Semi-Trockenblot und im Nassblot-Verfahren. Nach der SDS-PAGE erfolgte der Transfer auf eine Polyvinylidendifluorid- (PVDF, 0,22 µm) Membran oder Nitrocellulose-Membran mit diskontinuierlichem Puffersystem. Die PVDF-Membran muss vor dem Proteintransfer für wenige Sekunden in Methanol aktiviert und anschließend in Blotpuffer äquilibriert werden.

Blotpuffer für Semi-Trocken-Verfahren: AnodenpufferI: 0,3 M Tris/HCl
10% MeOH, pH 10,8

AnodenpufferII: 25 mM Tris/HCl
10% MeOH, pH 10,3

Kathodenpuffer: 40 mM Glycin
25 mM Tris/HCl
10% MeOH, pH 8,8

Blotpuffer für Nassblot-Verfahren: 25 mM Tris/HCl
190 mM Glycin
0,02% SDS
20% Methanol

Antikörper: α-HA: monoklonaler Antikörper gegen HA-Epitop aus Maus (Berkeley, Antibody Co., Richmond, CA, U.S.A.)
α-Myc: monoklonaler Antikörper gegen Myc-Epitop aus Maus
¹²⁵I-gekoppelter Schafs-α-Maus-Antikörper (Dupont, Boston, MA, U.S.A.)
α-GLUT4: polyklonaler Antikörper gegen GLUT4 aus Kaninchen (Dr. Al-Hasani)
α-GST: polyklonaler Antikörper gegen GST aus Kaninchen (Sigma)
α-GST-CT: polyklonaler Antikörper gegen GST-Fusionsprotein aus Kaninchen (Dr. Al-Hasani (1995))
GαR-AP: polyklonaler Antikörper gegen Kaninchen-IgG aus Ziege, gekoppelt mit Alkalischer Phosphatase (Boehringer Mannheim)

4.3. Zellkultur

4.3.1. CHO- und COS-7-Zellen

Es wurden CHO-(Chinesische Hamster-Ovarien)-Zellen und COS-7-Zellen kultiviert. Dabei erfolgte die Kultivierung der CHO- und COS-7-Zellen in Dulbecco's Modified Eagle - Medium (mit 10% hitzeinaktiviertem, fetalem Kälberserum, 2 mM L-Glutamin, 1,5 g/L Natriumbicarbonat, 1% Penicillin-Streptomycin, ggf. 10 mg/500ml Geneticin (G418)) als adherente Kultur in T-160cm² Fläschchen bei 37°C, 5% CO₂. Bei einer Zelldichte von 1-2 x 10⁶ Zellen/ml wurde 3 x pro Woche subkultiviert. Die Subkultivierung erfolgte mit 0,25% Trypsin, 0,03% EDTA. Die Herstellung und Lagerung der Zellen erfolgte nach dem Standardprotokoll von LIFE TECHNOLOGIES (GibcoBRL). Die Kulturen einer aufgetauten Charge wurden nicht öfter als 30 x subkultiviert (3 Monate). Die Transfektion der CHO-Zellen erfolgte nach dem Standardprotokoll (Lipofectamine Transfektion) von LIFE TECHNOLOGIES (GibcoBRL). Die Transfektion der COS-7-Zellen erfolgte durch Elektroporation mit dem ElectroSquarePorator™ T820 (High Voltage Mode, 99µsec, 1.5 kV, Puls Länge: 90 µsec, Anzahl der Pulse: 2, 4mm Küvette).

4.3.2. Transfektion von Ratten-Adipocyten mit HA-GLUT8, HA-GLUT6 (Wildtyp, (LL/AA)-Mutanten) sowie p49, p49-N und p19

Die Präparation der isolierten Ratten-Adipocyten aus männlichen Ratten (CD strain; Charles River Laboratories, Wilmington, MA, U.S.A.), die Elektroporation der Adipocyten und die Zelloberflächen-Bindungsanalyse erfolgte nach dem Standardprotokoll beschrieben in Al-Hasani et al. (1998). Die isolierten primären Adipocyten (10⁶ Zellen/Probe) wurden in Gegenwart von 0,25 mg/ml carrier DNA (*sheared herring sperm* DNA, Roche, Mannheim) und den Expressionsplasmiden (HA-GLUT8, HA-GLUT6 (Wildtyp, (LL/AA)-Mutanten) oder p49, p49-N und p19 (1,25-12,5 µg/ml, 0,4 ml/Küvette)) elektroporiert (3 Pulse, 12 msec, 500 V/cm). Für die Elektroporation wurde Dulbecco's modified Eagle's Medium benutzt. Nach 24 Stunden Inkubation in Dulbecco's modified Eagle's Medium, 37°C in 5% CO₂, wurden die Zellen in Eppendorfgefäße überführt und mit 67nM Insulin stimuliert.

4.3.3. Zelloberflächen-Antikörper-Bindungsanalyse von transfizierten isolierten primären Adipocyten

Nach Insulinstimulierung der primären Adipocyten wurde die Reaktion mit 2 mM KCN gestoppt und die Zellen für 1 Stunde mit dem ersten Antikörper inkubiert.

Antikörper für HA-GLUT8, HA-GLUT6: α-HA: monoklonaler Antikörper gegen HA-Epitop aus Maus (Berkeley, Antibody Co., Richmond, CA, U.S.A.)

Antikörper für p49, p49-N und p19: α-Myc: monoklonaler Antikörper gegen Myc-Epitop aus Maus

Danach wurden die Zellen gewaschen und für 1 Stunde mit dem ¹²⁵I-gekoppelten Schafs-α-Maus-Antikörper (Dupont, Boston, MA, U.S.A.) inkubiert. Die Zellen wurden durch

Dinonylphthalat-Öl zentrifugiert um den ungebundenen Antikörper zu entfernen. Die Zelloberflächen-Radioaktivität konnte im Gamma-Zähler bestimmt werden. Für die Zelloberflächen-Antikörper-Bindungsanalyse wurden Doppel- und Dreier-Proben untersucht. Als Kontrolle diente pCIS- bzw. pcDNA-Plasmid.

4.3.4. Koexpression von HA-GLUTs mit Dynamin-(K44A)

Die isolierten Adipocyten wurden mit 0,5 µg HA-GLUTs-(HA-GLUT8/6)-Plasmid/Küvette + 4,5 µg Dynamin-(K44A)-Plasmid/Küvette kotransfiziert und bei 37°C für 20 h kultiviert. Als Kontrolle wurden 0,5 µg HA-GLUTs-Plasmid/Küvette ohne Dynamin-(K44A) transfiziert. Nach der Kultivierung wurden die Zellen für 30 min mit 67 nM Insulin stimuliert und eine Zelloberflächen-HA-Epitop-Bindungsanalyse durchgeführt. Die Proteinexpression der HA-GLUTs +/- Dynamin-(K44A) ist durch Westernblot unter Verwendung des α -HA Antikörpers bestimmt worden.

4.3.5. Zelloberflächen-Expression von HA-GLUT4, HA-GLUT8 und HA-GLUT6

Die Zelloberflächen-Expression von HA-GLUT4, HA-GLUT8 und HA-GLUT6 wurde nach Stimulierung der transfizierten Adipocyten für 30 min mit Insulin (67 nM), Sorbitol/Mannose (300 mM), PMA (1 µM), 10^{-9} M Vasopressin, 200 nM Isoproterenol, 1 Unit/ml Adenosindeaminase, 1 mM GTP γ S und 10^{-8} M Oxytocin bestimmt.

4.3.6. Immunocytochemische Detektion von überexprimiertem HA-GLUT8 in COS-7 Zellen

COS-7 Zellen wurden in Zusammenarbeit mit Frau Prof. Schürmann mit 0,5 µg HA-GLUT8 und HA-GLUT8-(LL/AA) transfiziert sowie mit 0,4 µg HA-GLUT8 und 0,4 µg Dynamin-(K44A) kotransfiziert. Als Transfektionsreagenz diente Fugene (Roche). Nach 48 h sind die Zellen mit Formaldehyd fixiert und 3 x mit PBS/1% BSA gewaschen worden. Danach erfolgte eine Zellinkubation für 20 min mit PBS/0,5% Triton X-100 und eine Zellwäsche (3 x mit PBS/1% BSA). Geblockt wurde für 1 h in PBS/10% Ziegen-Serum (Gibco, Karlsruhe). Die Zellen wurden für 1 h, 37°C mit dem primären Antikörper (1:1000, monoklonaler α -HA-Antikörper oder polyklonales α -GLUT8-Antiserum) inkubiert. Nach erneutem waschen mit PBS/1% BSA folgte die Inkubation mit dem FITC-gekoppeltem α -Maus Antikörper (1:100, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, U.S.A.) für 45 min, 37°C. Die Zellen konnten mit Fluoromount (Biozol, Eching, Deutschland) auf einem Deckglass befestigt und die Fluoreszenz mit einem konfokalen Laser-Analyse-Mikroskop (Leica TCS NT, Leica Microsystems, Heidelberg, Deutschland) detektiert werden. Das FITC wurde bei 488 nm mit einem Argon/Krypton-Laser angeregt und die FITC Fluoreszenz wurde durch einen 530 nm Filter selektiert.

4.3.6.1. Immunodetektion von p19 und p49 in transfizierten Hela-Zellen

Hela-Zellen wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Matsumoto mit *myc*-p19, *myc*-p49 und *myc*-p49-N mittels der Lipofectamin-Methode transfiziert.

Lipofectamin-Methode: 1,75 µl Lipofectamin + 0,25 µg Plasmid wurden für 4 h inkubiert und danach mit 0,25 ml Serum-freiem Medium (DMEM-Medium mit 2mM L-Glutamin, 20mM HEPES und 50 µg/ml Gentamicin) gewaschen. Danach sind die Zellen mit 0,5 ml Kulturmedium (DMEM + 10% fetales Kälberserum) versetzt und für 21-25h bei 37°C, 5%CO₂ kultiviert worden.

Für den immunologischen Nachweis, wurden die Zellen fixiert und mit einem primären monoklonalen α -*myc*-Antikörper und sekundären polyklonalen Texas-rot-konjugierten Affen- α -Maus-Antikörper versetzt. Die Proteinlokalisierung konnte mit dem Nikon Eclipse E800-Fluoreszenzmikroskop detektiert werden.

4.3.6.2. Immunochemische Detektion von p49 in primären Ratten-Adipocyten

Die Adipocyten wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Matsumoto untersucht. Die Ratten-Adipocyten wurden mit *myc*-markiertem p49 (10µg/Küvette) oder p19 (5µg/Küvette) transfiziert und für 16h bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Nach der Zellernte sind die Adipocyten fixiert und 1h mit einem primären α -*myc*-Antikörper sowie 30min mit einem sekundären polyklonalen FITC-fluoreszenzmarkierten Antikörper inkubiert worden. Das *myc*-p49-Expressionsmuster wurde mittels konfokaler Immunofluoreszenzmikroskopie untersucht, wobei *myc*-p49 und *myc*-p19 grün fluoreszenzmarkiert wurden. Verwendetes Mikroskop : Nikon Optiphot-2-Fluoreszenzmikroskop.

4.4. Hefe-Two-Hybrid-System

Als Methode zur Identifizierung möglicher GLUT4-bindender Proteine, wurde das Hefe-Two-Hybrid-System gewählt. Das Hefe-Two-Hybrid-System dient zur Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungen und zum *screening* von cDNA-Bibliotheken in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Es basiert auf der Erkenntnis, dass viele eukaryotische Transkriptionsfaktoren (z.B. Gal4) modular, aus zwei funktionellen Untereinheiten, aufgebaut sind: 1. einer DNA-Bindungsdomäne und 2. einer Aktivierungsdomäne. Beide Untereinheiten können beliebig zu funktionellen Transkriptionsfaktoren in Form von Hybridproteinen fusioniert werden. Das Two-Hybrid-System nutzt die Aktivierung der Expression spezifischer Reportergene, durch den rekonstituierten Transkriptionsfaktor, als Detektor für die Protein-Protein-Wechselwirkungen.

4.4.1. Hefekulturen

Für die Versuche im Hefe-two-Hybrid-System wurde der Sfy526-Hefestamm gewählt.

Hefekultur-Medien:	YPD-Medium:	1% (w/v) Hefeextrakt 2% (w/v) Pepton 2% (w/v) Dextrose (D-Glukose) 0,2% (w/v) Adenin autoklavieren
	YPD-Agar-Platten:	Gleiche Zusammensetzung wie das YPD-Medium + 2% Agar
	SD-TL-Minimal-Medium:	0,67% (w/v) YNB (Yeast Nitrogen Base) 2% (w/v) Glukose 0,01% (w/v) Adenin, Arginin, Cystein, Lysin, Threonin 0,005% (w/v) Aspartat, Histidin, Isoleucin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Tyrosin, Valin, autoklavieren
	SD-TL-Minimal-Platten:	Gleiche Zusammensetzung wie das SD-TL-Minimal-Medium + 2% Agar

4.4.2. Identifizierung des p19-Proteinfragments

Das p19 kDa Proteinfragment wurde von Dr. Al-Hasani unter Verwendung einer cDNA Bank aus primären Ratten-Adipocyten identifiziert und isoliert. Dabei diente der GLUT4-N-Terminus als Köder für mögliche Bindungspartner.

4.4.3. Kotransformation von Wildtyp-GLUT4-NT und drei überlappenden GLUT4-NT-Deletionsmutanten mit p49

Um das p49-Bindungsmotiv im GLUT4-N-Terminus zu identifizieren, wurden drei GLUT4-NT-Deletionsmutanten hergestellt und deren Bindung an das p49-Protein im Hefe-Two-Hybrid-System ermittelt. Es wurde :

- Die GAL4-Bindungsdomäne(BD) mit dem Wildtyp(WT)-GLUT4-N-Terminus und den drei NT-Mutanten fusioniert.
- Inkubation der GLUT4-Konstrukte mit p49.
- Bestimmung der Protein-Protein-Wechselwirkung mittels β -Galaktosidase-Aktivität ($OD_{578}/OD_{600}/min$)

Als Substrat für die β -Galaktosidase-Aktivitätsbestimmung wurde CPRG verwendet. Als negativ Kontrolle wurden Hefezellen mit dem pLAM-Vektor transfiziert. Der Versuch wurde 3 x durchgeführt.

4.4.4. Kotransformation mit Wildtyp-GLUT4-NT, GLUT4-NT-(ED/QN) und p49

Kotransformation der Hefezellen mit:

1. pAS2-1GLUT4-NT + pGAD424p49
2. pAS2-1GLUT4-(ED/QN) + pGAD424p49
3. negativ Kontrolle : pLAM + pGAD424p49
4. positiv Kontrolle : pTD1 + pVA3

Die Transformation der Hefezellen erfolgte während der logarithmischen Wachstumsphase.

Transformationsansätze:

- 240 μ l 50% PEG-3350
- 36 μ l 1M LiAc
- 50 μ l carrier DNA
- 24 μ l Wasser
- 5 μ l Plasmid 1
- 5 μ l Plasmid 2

Der Reaktionsansatz wird für 30 min bei 30°C inkubiert. Danach erfolgt der Hitzeschock für 30 min bei 42°C. Direkt nach dem Hitzeschock wird die Transformationslösung abpipettiert und die Zellen werden 1 x mit 1 ml Wasser gewaschen. Die Zellen werden in 500 μ l Wasser aufgenommen und auf SD-TL-Platten ausplattiert. Die Kultivierung der Hefen erfolgt für 48 h bei 30°C.

4.4.5. β -Galaktosidase-Aktivitätsbestimmung mit CPRG als Substrat

1. Übernachtskultur wird 1:5 in YPD-Puffer verdünnt und 4-5 h bei 30°C 180 rpm geschüttelt
2. Wenn die Hefezellen eine OD von 1-2 bei 600 nm erreicht haben, folgt eine Zentrifugation bei 10.000 rpm für 1 min.
3. Waschen der Zellen in Wasser und Zentrifugation bei 10.000 rpm für 1 min.

4. Überstand verwerfen und vortexen der Hefen in 100 µl CPRG-Puffer (5,95 g (178,5 mM) Hepes, 2,25 g (67,5 mM) NaCl, 0,15 g (4,5 mM) L-Aspartat, 2,5 g (75 mM) BSA, 0,125 g (3,75 mM) Tween-20, 0,562 g (2,25 mM) Mg Cl₂, 250 ml Wasser, 1,36 mg/ml CPRG, pH 7,3)
5. Hefezellen werden 4 x abwechselnd bei 37°C und mit flüssigem Stickstoff inkubiert.
6. Pro Probe werden 700 µl CPRG-Puffer hinzugefügt.
7. Proben werden für 1 min – 3 h (bis sich eine Farbänderung zeigt) bei 37°C inkubiert.
8. Zentrifugation der Proben bei 14.000 x g für 1 min.
9. Messung der Absorption bei 578 nm.

5. Material

5.1. Zellen, Plasmide und cDNAs

<i>Escherichia. coli</i> DH5 α	Dr. Stabel, Max-Dellbrück-Laboratorien, Köln
<i>Escherichia. coli</i> BL21 (RIL)	Dr. Stabel, Max-Dellbrück-Laboratorien, Köln
CHO(Chinese Hamster Ovary)-Zellen	Dr. Samuel Cushman, <i>National Institute of Health</i> (NIH), Maryland, U.S.A.
COS-7-Zellen	Prof. Dr. Joost, Dife, Bergholz-Rehbrücke
Ratten Adipozyten (männliche Tiere)	CD strain, Charles River Laboratories, Wilmington, MA, U.S.A.
pGEX-3X	Pharmacia, Freiburg
pBluescript II KS (+/-)	Stratagene, La Jolla, CA, U.S.A.
pcDNA3	Invitrogen, San Diego, U.S.A.
pUC18/19	Pharmacia, Freiburg
pcMV-HA	Clontech, Bedford, MA, U.S.A.
pcMV-Myc	Clontech, Bedford, MA, U.S.A.
pEGFP-C1	Clontech, Bedford, MA, U.S.A.
pGED424	Clontech, Bedford, MA, U.S.A.
pAS2-1	Clontech, Bedford, MA, U.S.A.
pCIS	Genen Tech.
cDNA zur Klonierung von p49	Dr. M. Coleman, Institut für Genetik, Köln
cDNA-GenBank aus Ratten-Adipozyten	Dr. Al-Hasani, Dife, Bergholz-Rehbrücke
5.2. Zellkultur-Medien	
LB-Agar, LB-Broth Base	Life Technologies, Eggenstein

Dulbecco's Modified Eagle –Medium	GibcoBRL, Life Technologies, Karlsruhe
Trypsin-EDTA (1x)	GibcoBRL, Life Technologies, Karlsruhe
PenicilinStreptomycin	GibcoBRL, Life Technologies, Karlsruhe
LipofectAMIN- Reagents	GibcoBRL, Life Technologies, Karlsruhe
Geneticin (G418)	GibcoBRL, Life Technologies, Karlsruhe
Fetales Kälberserum	GibcoBRL, Life Technologies, Karlsruhe

5.3. Medien für das Hefe-Two-Hybrid-System

Select Agar	GibcoBRL, Life Technologies, Paisley/Scotland
Select Pepton 140	GibcoBRL, Life Technologies, Paisley/Scotland
Select Yeast Extract	GibcoBRL, Life Technologies, Paisley/Scotland
YPD-Agar (YEPD)	Serva, Heidelberg
Yeast Extract Peptone Dextrose Medium (YPD)	Bio 101, Inc., Vista, CA, U.S.A.
Yeast Nitrogen Base (YNB)	Bio 101, Inc., Vista, CA, U.S.A.
CSM	Bio 101, Inc., Vista, CA, U.S.A.

5.4. Antikörper, Enzyme und Proteine

α -HA: monoklonaler Antikörper gegen HA-Epitop aus Maus (Berkeley, Antibody, Co., Richmond, CA, U.S.A.)

α -Myc: monoklonaler Antikörper gegen Myc-Epitop aus Maus

¹²⁵I-gekoppelter Schafs α -Maus Antikörper (Dupont, Boston, MA, U.S.A.)

α -GLUT4: polyklonaler Antikörper gegen GLUT4 aus Kaninchen (Dr. Al-Hasani)

α -GST: polyklonaler Antikörper gegen GST aus Kaninchen (Sigma)

α -GST-CT: polyklonaler Antikörper gegen GST-Fusionsprotein aus Kaninchen (Dr. Al-Hasani (1995))

α -Akt: polyklonaler Antikörper gegen Akt-CT aus Kaninchen (Bio-Rad)

G α R-AP: polyklonaler Antikörper gegen Kaninchen-IgG aus Ziege, gekoppelt mit Alkalischer Phosphatase (Boehringer Mannheim)

α -Calnexin: polyklonaler Antikörper gegen ein synthetisches Peptid aus Kaninchen (Stressgen Biotechnologies Corp.)

Alle benutzten Restriktionsendonukleasen waren von Boehringer Mannheim und MBI Fermentas.

T4-DNA-Ligase, Klenow-Polymerase, T4-Polynukleotidkinase, Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP)	Boehringer, Mannheim
Pfu-DNA-Polymerase	Stratagen, La Jolla, CA, U.S.A.
Rinderserumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg
Trypsin (sequencing grade)	Merck, Darmstadt
Insulin	Dr. Samuel Cushman, <i>National Institute of Health</i> (NIH), Maryland, U.S.A.
<i>Prestained</i> SDS-PAGE-Standards (Protein Molecular Weight Marker)	MBI, Fermentas, St.Leon-Rot
SDS-PAGE-Standards (Protein Molecular Weight Marker)	MBI, Fermentas, St.Leon-Rot
MassRuler, DNA Ladder, Mix	MBI, Fermentas, St.Leon-Rot

5.5 Chemikalien

Acetonitril, gradient grade	Merck, Darmstadt
Acrylamid, p.a.	Serva, Heidelberg
Adenosin-5'-triphosphat (ATP)	Boehringer Mannheim
Agarose, electrophorese grade	Seakem, Hameln
Ampicillin, Natriumsalz	Fluka, Buchs/Schweiz
Ammoniumacetat	Fluka, Buchs/ Schweiz
Ammoniumcarbonat	Merck, Darmstadt
Ammoniumhydroxid	Fluka, Buchs/ Schweiz
Ammoniumper(oxodi)sulfat (APS), analytical grade	Serva, Heidelberg
Ammoniumsulfat, p.a.	Merck, Darmstadt
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP)	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau (BPB), Natriumsalz	Serva, Heidelberg
(Coomassie Brilliant) Blue G-250	Serva, Heidelberg
(Coomassie Brilliant) Blue R-250	Serva, Heidelberg

Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure, > 97%, p.a.	Roth, Karlsruhe
Ethanol absolut, p.a.	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA), p.a.	Merck, Darmstadt
Glycerol (Glycerin)	ICN, Aurora/Ohio/U.S.A.
Glutathion, reduziert	Boehringer, Mannheim
Glutathion-Sepharose-4B	Pharmacia Biotech, Freiburg
Glycin, electrophoresis grade	ICN, Aurora/Ohio/U.S.A.
Isopropanol, p.a.	Merck, Darmstadt
Isopropyl- β -D-thiogalaktosid (IPTG)	Biomol, Hamburg
Kaliumchlorid-hexahydrat, p.a.	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat, p.a.	Merck, Darmstadt
Di-Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat, p.a.	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid, Plättchen	Merck, Darmstadt
Leupeptin	Sigma, Deisenhofen
Magnesiumchlorid-Hexahydrat, p.a.	Merck, Darmstadt
Methanol, p.a.	Roth, Karlsruhe
N, N'-Methylenbisacrylamid, research grade	Serva, Heidelberg
Natriumacetat, wasserfrei, p.a.	Merck, Darmstadt
Natriumazid, reinst	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid, p.a.	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat, p.a.	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg

Natriumhydroxid, Plättchen	Merck, Darmstadt
Neutralrot (3-Amin-7-dimethylamino-2-Methylphenazin-hydrochlorid)	Sigma, Deisenhofen
Ninhydrin, p.a.	Merck, Darmstadt
Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)	Sigma, Deisenhofen
PCR-Nukleotidmix	Boehringer, Mannheim
Perchlorsäure, 70%	Merck, Darmstadt
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Deisenhofen
Polyethylenglykol 35000 (PEG-35000)	Serva, Heidelberg
Complete Proteaseinhibitor-Cocktailtabletten	Boehringer, Mannheim
Pyridin, p.a.	Merck, Darmstadt
D(+)-Saccharose, kristallin, p.a.	Roth, Karlsruhe
Salzsäure, 37%	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure, 98%	Merck, Darmstadt
N, N, N', N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
Trichloressigsäure (TCA), kristallin	Sigma, Deisenhofen
Triton-X-100, p.a.	Boehringer, Mannheim
Tris[hydroxymethyl]aminomethan (TRIS)	Sigma, Deisenhofen
Tween-20 (Polyoxyethylensorbitmonolaureat)	Bio-Rad, München
Xylencyanol FF (XC)	Sigma, Deisenhofen
5.7. Kit-Systeme	
Nucleobond-Plasmid Kit AX	Macherey & Nagel, Düren
QIAquick-PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
UltraClean 15 DNA Purification Kit	MoBio, Hamburg
Wizard Plus SV Minipreps (DNA Purification System)	Promega, Madison, WI, U.S.A.

ECL (Western blotting analysis system)	Pharmacia Biotech, Freiburg
QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Heidelberg

5.8. Sonstige Materialien

Bayol F Siliconöl	Serva, Heidelberg
Centricon C10-Mikrokonzentrat	Amicon, Witten/ Ruhr
DC-Plastikfolien (Cellulose)	Merck, Darmstadt
PVDF-Membran Immobilon P (0,22 µm)	Millipore, Bedford, U.S.A.
Multischalen (Nunc) 6-well	Fisher Scientific, Chicago, U.S.A
Zellkulturschalen (Nunc)	Fisher Scientific, Chicago, U.S.A.
Gewebekulturschalen	Falcon, Heidelberg

5.9. Filmmaterial

BIOMAX MS (Kodak)	Amersham, Braunschweig
X-Omat AR-Film (Kodak)	Amersham, Braunschweig
GBX-Developer (Kodak)	Amersham, Braunschweig
GBX-Fixer (Kodak)	Amersham, Braunschweig

5.10. Laborausstattung

Autoklaviergeräte

Tischautoklav tuttner 2540 EL	Tuttner, Jerusalem/ Israel
Varioklav Dampfsterilisator	H+P Labortechnik, München

Blot-Apparatur

2117 Multiphor II Electrophoresis unit + Novablot Elektrophoresis transfer kit	LKB/Pharmacia, Freiburg
---	-------------------------

Brutschränke

E/B 28 und FD 53	WTB Binder, Tuttlingen
wtb binder	WTB Binder, Tuttlingen

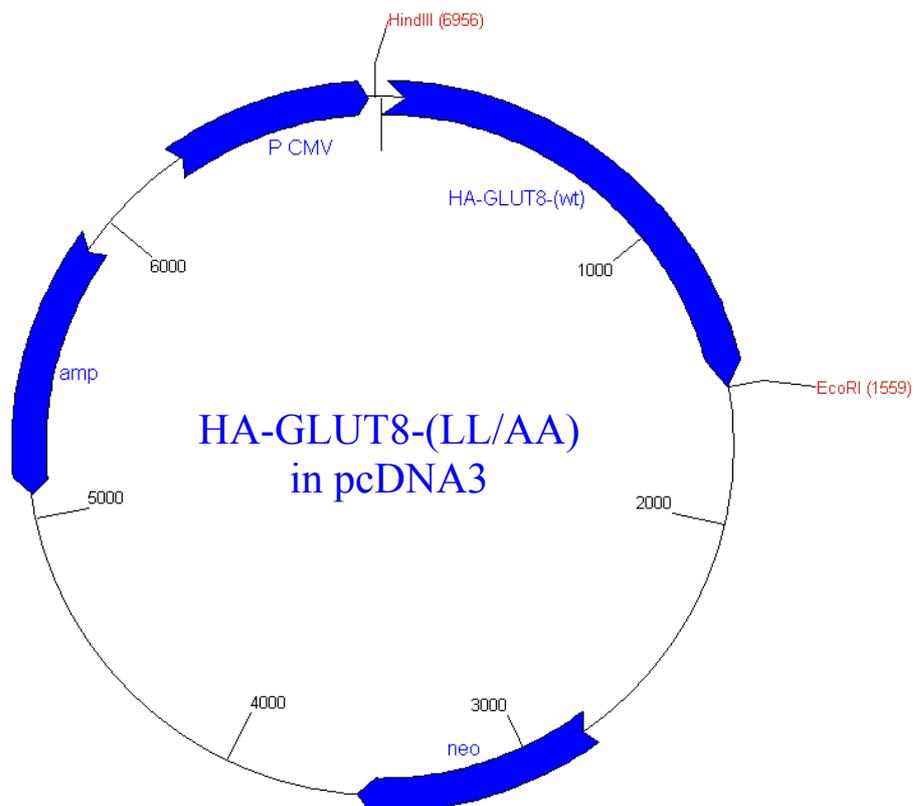
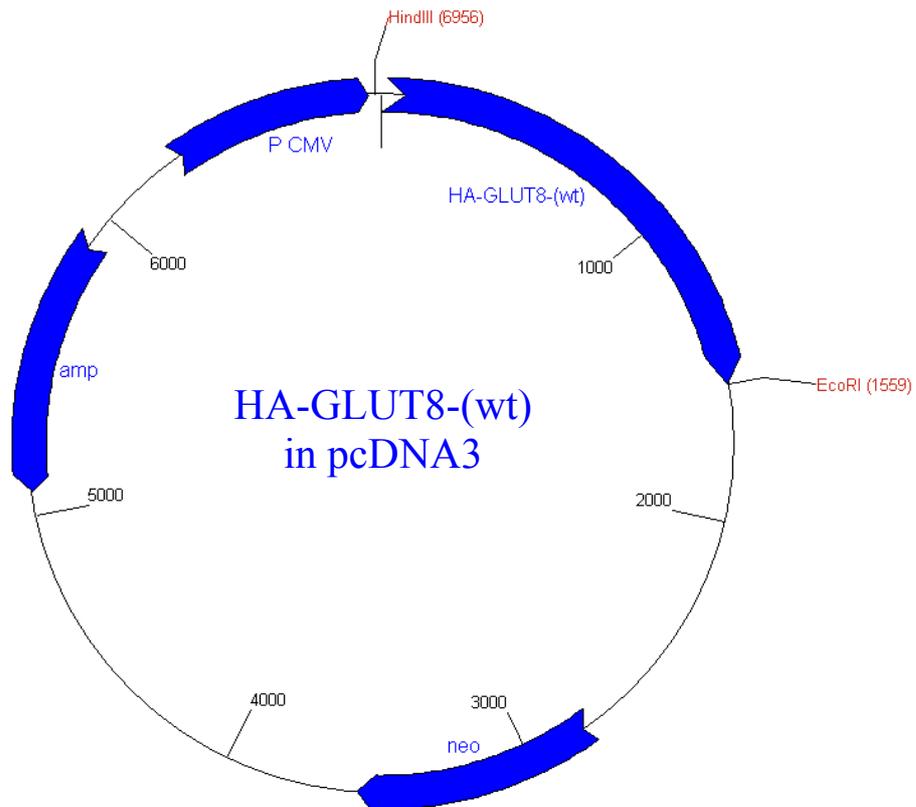
Brutkühlschrank	Heraeus, Düsseldorf
<u>Elektrophorese-Apparaturen</u>	
GNA-100	Pharmacia Biotech, Freiburg
Mighty-Small II	Hoefer, San Francisco, U.S.A.
Mupid-2	Cosmo Bio Co.
Novex X Cell II	Novex, San Diego, CA, U.S.A.
Pharmacia LKB Macrohor	Pharmacia, Freiburg
Protean	Bio-Rad, München
Elektroporator 2510	Eppendorf, Hamburg
Elektro Cell Manipulator ECM 600	BTX, San Diego, CA, U.S.A.
Geltrockner 543	Bio-Rad, München
Heizblock, HB-130	Unitek
<u>Kamerasysteme</u>	
Bio-Rad GelDoc 1000	Bio-Rad, München
MP4 Land Kamera	Polaroid Co., U.S.A.
<u>Lyophilisationssysteme</u>	
RVT 4104 (Refrigerated Vapor Trap)	Savant, Farmingdale, U.S.A.
Speed Vac SC 100	Savant, Farmingdale, U.S.A.
Vakuumpumpe RC-4	Vacuubrand, Wertheim
Mastercycler 5330	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop Wilovert S	Hund, Wetzlar
pH-Meter 671 Calimatic	Knick, Berlin
<u>Phosphoimager</u>	
GS-363 Molecular Imager System	Bio-Rad, München
GS-505 Sample Exposure Platform	Bio-Rad, München

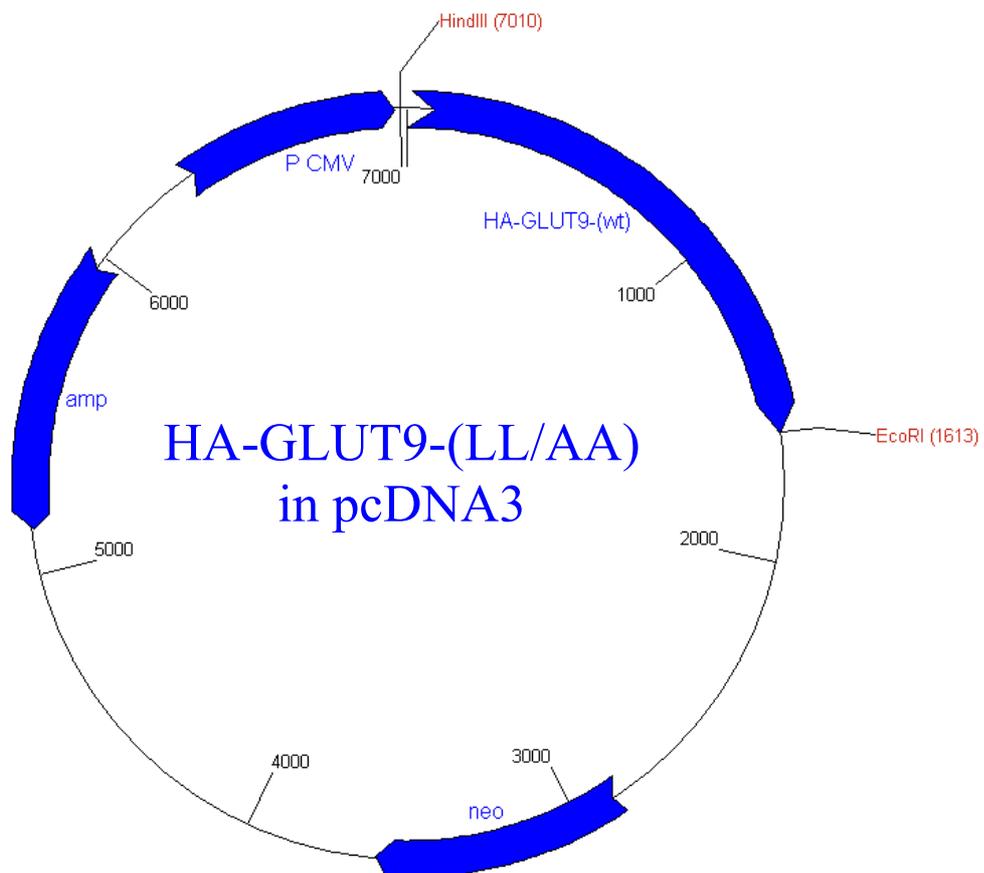
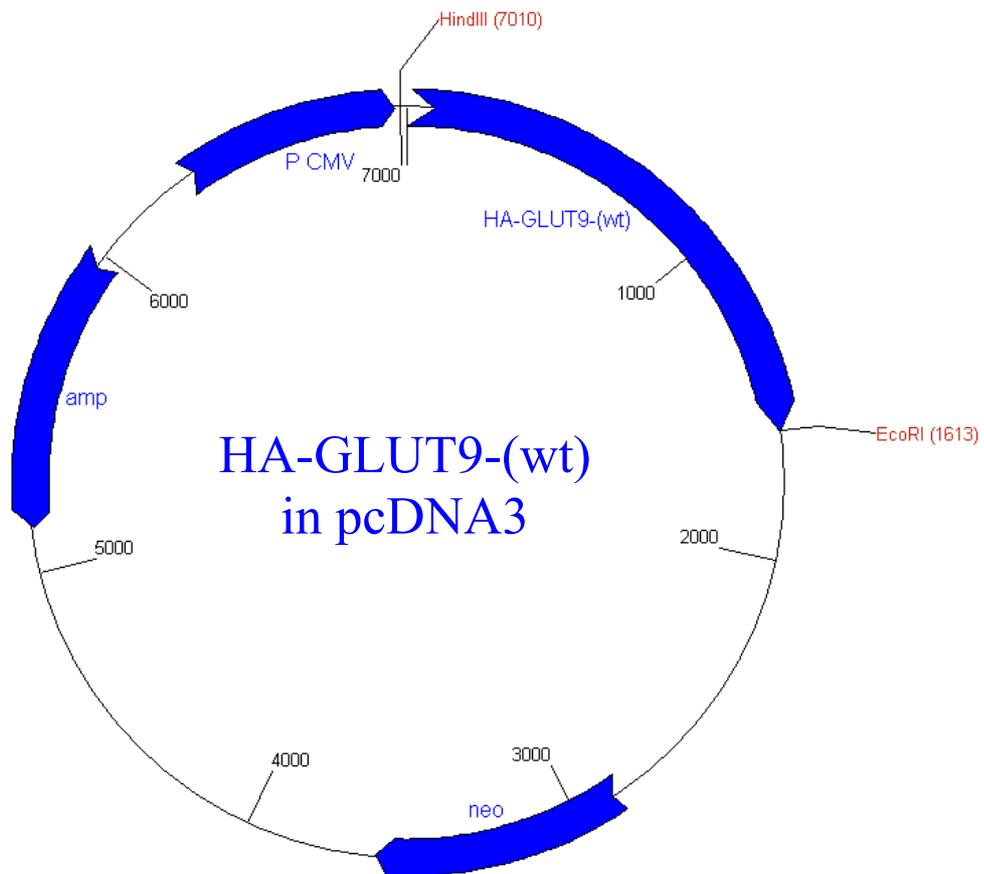
GS-505 Screen Eraser	Bio-Rad, München
Molecular Imager Screen-BI	Bio-Rad, München
Molecular Imager Screen-CS	Bio-Rad, München
<u>Photometer</u>	
Photometer DU 7400	Beckman, München
<u>Rühr- Schüttel- und Mischgeräte</u>	
Ikamag Magnetrührer mit Heizplatte	Janke & Kunkel, Staufen
Magnetrührer Reverstir Model RS 8	Toyo Kagaku Sangyo Co./ Japan
Rolleninkubator RM-5 Assistent	Braun Melsungen
Incubator Shaker innova 4000	New Brunswick Sci.,Ed.,U.S.A
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
<u>Rotoren</u>	
HFA 12.500, 22.50	Heraeus, Düsseldorf
Ti 45, Ti 70	Beckman, München
<u>Sterilbänke</u>	
Holten Lamin Air Model 1,2	Heto-Holten A/S, Allerød/ Denmark
LB 48 C Lamin Air	Heraeus, Düsseldorf
Teflon-Glas-Homogenisator	Braun, Melsungen
Ultraschallgerät + Branson Sonifier Power Supply	Branson Instruments, Danbury, U.S.A.
Ultra Turrax	Janke & Kunkel, Staufen
UV-Tisch	Benda, Wiesloch
Vakuubrand, Membranvakuumpumpe	Vakuubrand, Wertheim
<u>Waagen</u>	
Analysewaage	Sartorius, Leichlingen

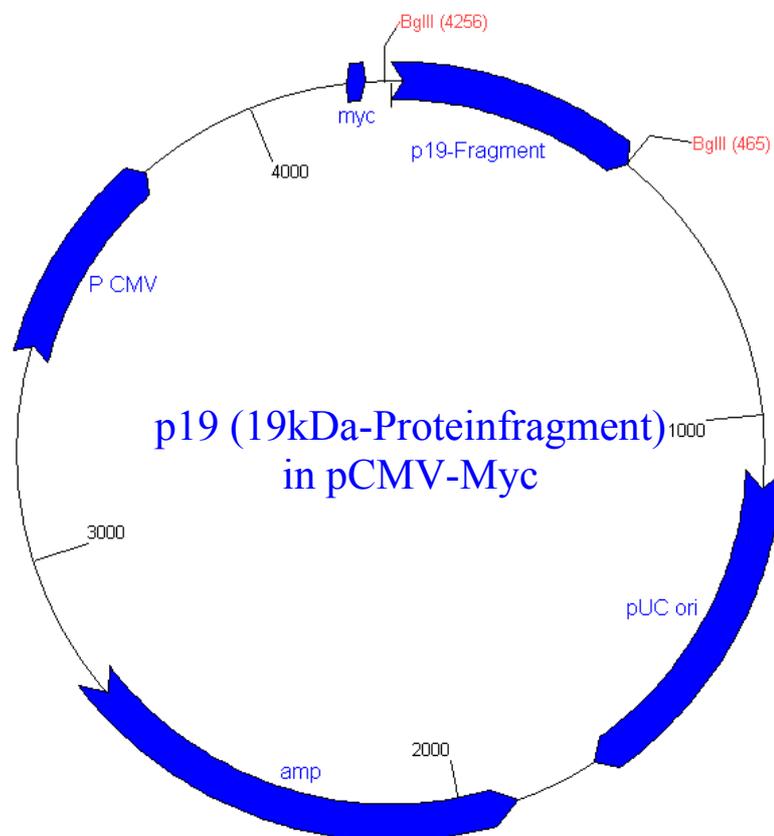
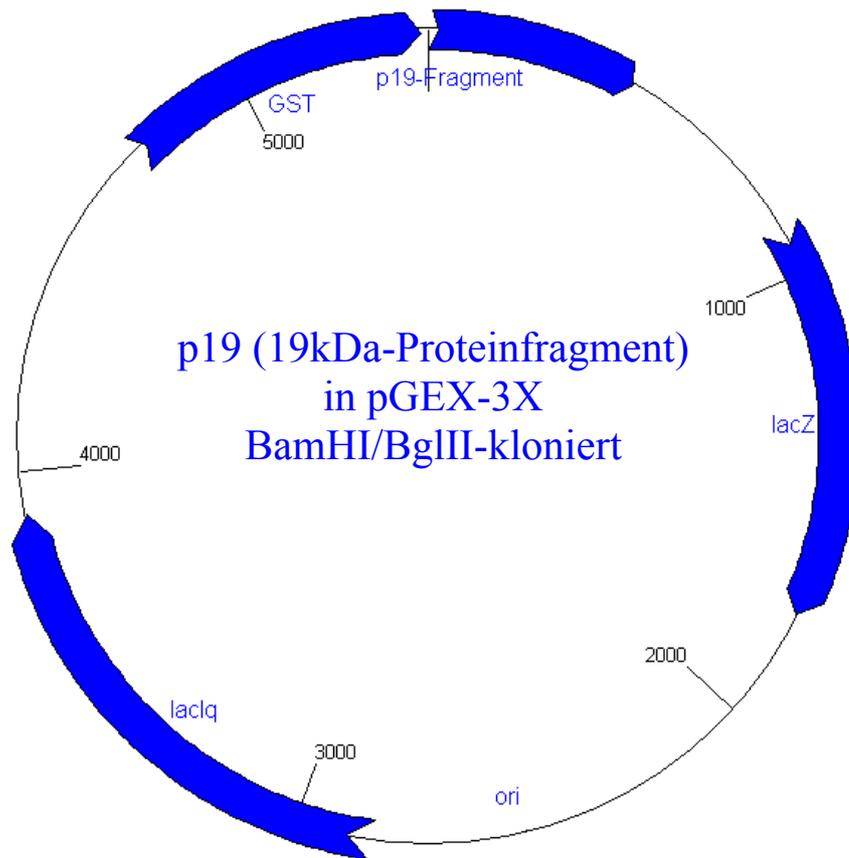
Feinwaage	Sartorius, Leichlingen
Waring Blender	Snijckers, Tilburg, Niederlande
Wasseraufbereitungsanlage Milli-Q Plus	Millipore, Bedford, U.S.A.
<u>Zentrifugen</u>	
Centrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Centrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg
Hettich Universal 30 RF, EBA 12 R	Hettich, Tuttlingen
Variofuge 20 RS, 3,0 RS, Biofuge B	Heraeus, Düsseldorf

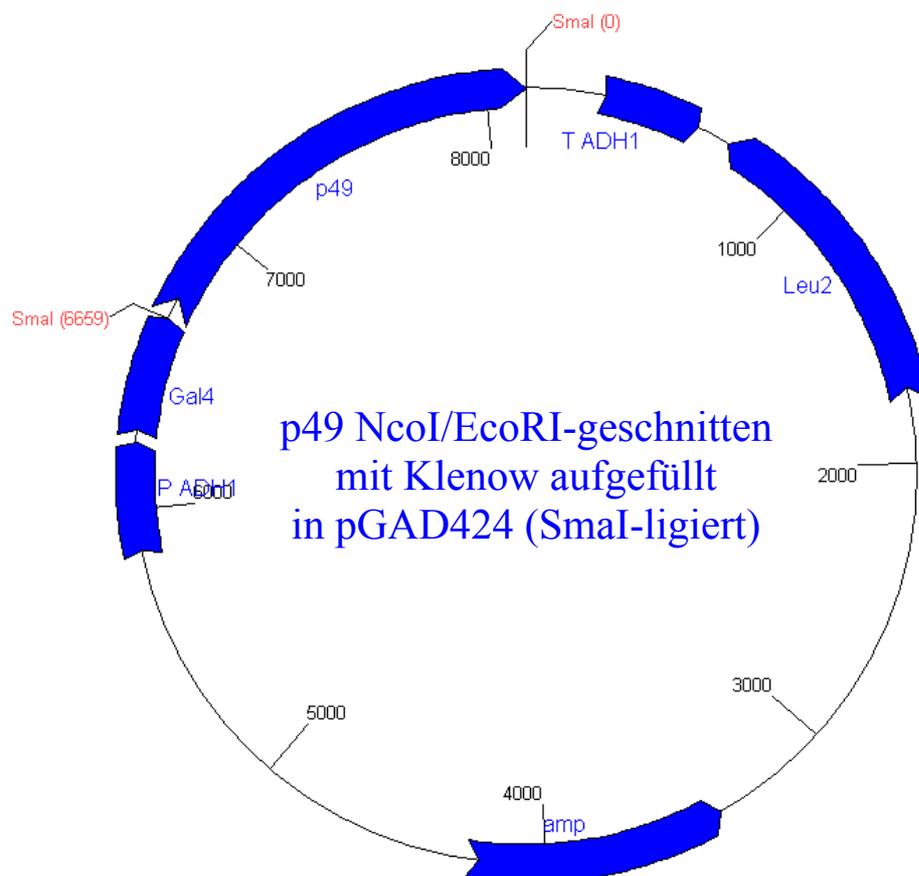
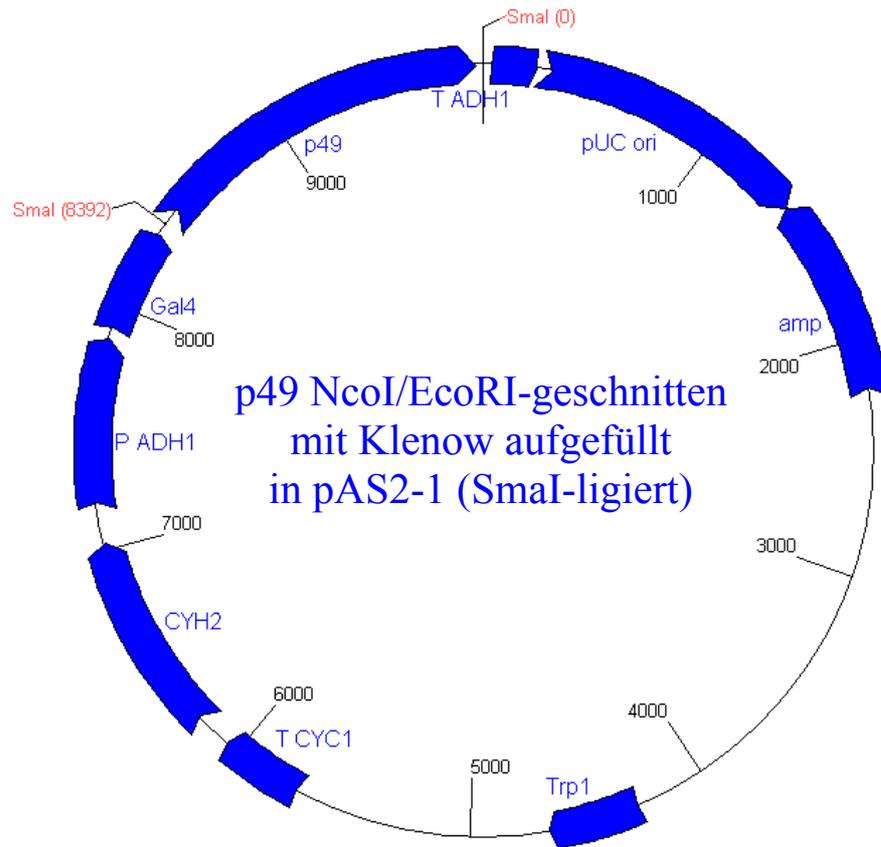
6. Anhang

6.1. Plasmidkarten









6.2. Tabellen

MW/insulinx100-pcis	basal	Insulin
GLUT4	17,4438549	87,0289972
GLUT4+ISO/ADA		9,42809669
GLUT4+Ins/ISO/ADA		52,9238356
GLUT8(wt)+ISO/ADA	3,09267299	2,35300423
GLUT8(LL/AA)+ISO/ADA	77,0354291	83,0733773
GLUT9(wt)+ISO/ADA	0,82542745	3,97705955
GLUT9(LL/AA)+ISO/ADA	116,993622	99,5336871

MW/insulinx100-pcis	basal	Oxytosin
GLUT4	30,3111763	83,7324862
GLUT4+Oxytosin		44,1756272
GLUT8(wt)+Oxytosin	6,10133594	4,8305637
GLUT9(wt)+Oxytosin	10,6630824	5,48224177

MW/insulinx100	basal	Stimuli
GLUT4	68,8219663	100
GLUT4+GTP γ S	101,860053	119,574845
GLUT8(wt)+GTP γ S	37,8210806	34,809566
GLUT9(wt)+GTP γ S	44,5527015	34,1895483

MW/insulinx100-pcis	basal	Stimuli
GLUT4	35,9517153	91,0442462
GLUT8(wt)+Vasopressin	11,7072738	8,69169662
GLUT8(LL/AA)+Vasopressin	141,936271	120,534327
GLUT9(wt)+Vasopressin	22,9374695	13,5645498
GLUT9(LL/AA)+Vasopressin	216,387077	137,689167
GLUT8(wt)+Mannose	13,6377757	10,2094706
GLUT8(LL/AA)+Mannose	126,971553	104,983802
GLUT9(wt)+Mannose	21,0735366	17,3789553
GLUT9(LL/AA)+Mannose	198,253672	150,197488

Literaturverzeichnis

Al-Hasani H, Hinck CS, Cushman SW (1998) *J Biol Chem*, **273**, 17504-10

Al-Hasani H, Kunamneni RK, Dawson K, Hinck CS, Muller-Wieland D, Cushman SW (2002) *J Cell Sci*, **115**, 131-40

Al-Hasani H, Yver DR, Cushman SW (1999) *FEBS Lett*, **460**, 338-42

Allan BB, Moyer BD, Balch WE (2000) *Science*, **289**, 444-8

Anderson RG (1993) *Curr Opin Cell Biol*, **5**, 647-52

Anderson RG (1993) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 10909-13

Araki S, Yang J, Hashiramoto M, Tamori Y, Kasuga M, Holman GD (1996) *Biochem J*, **315**, 153-9

Bannykh SI, Nishimura N, Balch WE (1998) *Trends Cell Biol*, **8**, 21-5

Barlowe C (1997) *J Cell Biol*, **139**, 1097-108

Barlowe C, Orci L, Yeung T, Hosobuchi M, Hamamoto S, Salama N, Rexach MF, Ravazzola M, Amherdt M, Schekman R (1994) *Cell*, **77**, 895-907

Baumann CA, Saltiel AR (2001) *Bioessays*, **23**, 215-22

Bonifacino JS, Dell'Angelica EC (1999) *J Cell Biol*, **145**, 923-6

Bose A, Guilherme A, Robida SI, Nicolero SM, Zhou QL, Jiang ZY, Pomerleau DP, Czech MP (2002) *Nature*, **420**, 821-4

Bryant NJ, Govers R, James DE (2002) *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 267-77

Campbell JL, Schekman R (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 837-42

Cao TT, Mays RW, von Zastrow M (1998) *J Biol Chem*, **273**, 24592-602

Carayannopoulos MO, Chi MM, Cui Y, Pingsterhaus JM, McKnight RA, Mueckler M, Devaskar SU, Moley KH (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 7313-8

Chamberlain LH, Burgoyne RD, Gould GW (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 5619-24

Chamberlain LH, Gould GW (2002) *J Biol Chem*, **277**, 49750-4

Chen D, Elmendorf JS, Olson AL, Li X, Earp HS, Pessin JE (1997) *J Biol Chem*, **272**, 27401-10

- Chiang SH, Baumann CA, Kanzaki M, Thurmond DC, Watson RT, Neudauer CL, Macara IG, Pessin JE, Saltiel AR (2001) *Nature*, **410**, 944-8**
- Collawn JF, Bhayani H, Paterson Y (1989) *Mol Immunol*, **26**, 1069-79**
- Collawn JF, Lai A, Domingo D, Fitch M, Hatton S, Trowbridge IS (1993) *J Biol Chem*, **268**, 21686-92**
- Cong LN, Chen H, Li Y, Zhou L, McGibbon MA, Taylor SI, Quon MJ (1997) *Mol Endocrinol*, **11**, 1881-90**
- Corvera S, Chawla A, Chakrabarti R, Joly M, Buxton J, Czech MP (1994) *J Cell Biol*, **126**, 979-89**
- Cosson P, Letourneur F (1997) *Curr Opin Cell Biol*, **9**, 484-7**
- Czech MP, Corvera S (1999) *J Biol Chem*, **274**, 1865-8**
- Damke H, Baba T, Warnock DE, Schmid SL (1994) *J Cell Biol*, **127**, 915-34**
- Dauterive R, Laroux S, Bunn RC, Chaisson A, Sanson T, Reed BC (1996) *J Biol Chem*, **271**, 11414-21**
- Davis RJ, Corvera S, Czech MP (1986) *J Biol Chem*, **261**, 8708-11**
- Diaz E, Pfeffer SR (1998) *Cell*, **93**, 433-43**
- Doege H, Bocianski A, Joost HG, Schurmann A (2000) *Biochem J*, **350**, 771-6**
- Doege H, Bocianski A, Scheepers A, Axer H, Eckel J, Joost HG, Schurmann A (2001) *Biochem J*, **359**, 443-9**
- Doege H, Schurmann A, Bahrenberg G, Brauers A, Joost HG (2000) *J Biol Chem*, **275**, 16275-80**
- Doege H, Schurmann A, Ohnimus H, Monser V, Holman GD, Joost HG (1998) *Biochem J*, **329**, 289-93**
- Dransfeld O, Rakatzi I, Sasson S, Gruzman A, Schmitt M, Haussinger D, Eckel J (2001) *Biochem J*, **359**, 47-54**
- Drucker DJ (1999) *Trends Endocrinol Metab*, **10**, 153-156**
- Duckworth WC, Bennett RG, Hamel FG (1998) *Biochem Biophys Res Commun*, **244**, 390-4**
- Elmendorf JS, Chen D, Pessin JE (1998) *J Biol Chem*, **273**, 13289-96**
- Ferrara CM, Cushman SW (1999) *Biochem J*, **343**, 571-7**
- Friedman JM (2000) *Nature*, **404**, 632-4**

- Garcia JC, Strube M, Leingang K, Keller K, Mueckler MM** (1992) *J Biol Chem*, **267**, 7770-6
- Gillingham AK, Koumanov F, Pryor PR, Reaves BJ, Holman GD** (1999) *J Cell Sci*, **112**, 4793-800
- Ginsberg HN** (2000) *J Clin Invest*, **106**, 453-8
- Griffiths G, Simons K** (1986) *Science*, **234**, 438-43
- Gorovits N, Cui L, Busik JV, Ranalletta M, De-Mouzon SH, Charron MJ** (2003) *Endocrinology*, **5**, 1703-1711
- Grusovin JM, Macaulay SL** (2003) *Front Biosci*, **8**, 620-41
- Hancock J.K, Paterson H, Marshall C** (1990) *Cell*, **63**, 133-139
- Hajduch E, Alessi DR, Hemmings BA, Hundal HS** (1998) *Diabetes*, **47**, 1006-13
- Harbury PB, Kim PS, Alber T** (1994) *Nature*, **371**, 80-3
- Harbury PB, Zhang T, Kim PS, Alber T** (1993) *Science*, **262**, 1401-7
- Hashiramoto M, Kadowaki T, Clark AE, Muraoka A, Momomura K, Sakura H, Tobe K, Akanuma Y, Yazaki Y, Holman GD, et al** (1992) *J Biol Chem*, **267**, 17502-7
- Hayashi T, Hirshman MF, Kurth EJ, Winder WW, Goodyear LJ** (1998) *Diabetes*, **47**, 1369-73
- Heilker R, Spiess M, Crottet P** (1999) *Bioessays*, **21**, 558-67
- Henley JR, Cao H, McNiven MA** (1999) *FASEB J*, **13**, 243-7
- Hill MM, Clark SF, Tucker DF, Birnbaum MJ, James DE, Macaulay SL** (1999) *Mol Cell Biol*, **19**, 7771-81
- Holman GD, Cushman SW** (1994) *Bioessays*, **16**, 753-9
- Hong W** (1998) *J Cell Sci*, **111**, 2831-9
- Hopkins CR** (1983) *Nature*, **304**, 684-5
- Ibberson M, Uldry M, Thorens B** (2000) *J Biol Chem*, **275**, 4607-12
- James, D.E., Piper, R.C. und Slot, J.W.** (1993) *J Cell. Sci*, **104**, 607-612
- Jiang ZY, Chawla A, Bose A, Way M, Czech MP** (2002) *J Biol Chem*, **277**, 509-15
- Jones SM, Howell KE, Henley JR, Cao H, McNiven MA** (1998) *Science*, **279**, 573-7
- Joost HG, Thorens B** (2001) *Mol Membr Biol*, **18**, 247-56
- Kahn CR** (1995) *Nature*, **373**, 384-5

- Kahn CR, Vicent D, Doria A** (1996) *Annu Rev Med*, **47**, 509-31
- Kahn SE, Leonetti DL, Prigeon RL, Boyko EJ, Bergstrom RW, Fujimoto WY** (1996) *Diabet Med*, **13**, 63-6
- Kahn SE, Leonetti DL, Prigeon RL, Boyko EJ, Bergstrom RW, Fujimoto WY** (1995) *J Clin Endocrinol Metab*, **80**, 1399-406
- Kahn SE, Leonetti DL, Prigeon RL, Boyko EJ, Bergstrom RW, Fujimoto WY** (1995) *Diabetes*, **44**, 173-9
- Kao AW, Ceresa BP, Santeler SR, Pessin JE** (1998) *J Biol Chem*, **273**, 25450-7
- Katz EB, Stenbit AE, Hatton K, DePinho R, Charron MJ** (1995) *Nature*, **377**, 151-5
- Kim YB, Nikoulina SE, Ciaraldi TP, Henry RR, Kahn BB** (1999) *J Clin Invest*, **104**, 733-41
- Kimura A, Baumann CA, Chiang SH, Saltiel AR** (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 9098-103
- Kirchhausen T, Bonifacino JS, Riezman H** (1997) *Curr Opin Cell Biol*, **9**, 488-95
- Kishi K, Hayashi H, Wang L, Kamohara S, Tamaoka K, Shimizu T, Ushikubi F, Narumiya S, Ebina Y** (1996) *J Biol Chem*, **271**, 26561-8
- Kjos SL, Buchanan TA** (1999) *N Engl J Med*, **341**, 1749-56
- Kohn AD, Summers SA, Birnbaum MJ, Roth RA** (1996) *J Biol Chem*, **271**, 31372-8
- Kohn WD, Kay CM, Hodges RS** (1995) *Protein Sci*, **4**, 237-50
- Kohn WD, Monera OD, Kay CM, Hodges RS** (1995) *J Biol Chem*, **270**, 25495-506
- Lang T, Bruns D, Wenzel D, Riedel D, Holroyd P, Thiele C, Jahn R** (2001) *EMBO J*, **20**, 2202-13
- Levitzki**, (1994) *Eur J Biochem*, **226**, 1-13
- Lin RC, Scheller RH** (1997) *Neuron*, **19**, 1087-94
- Lisinski I, Schurmann A, Joost HG, Cushman SW, Al-Hasani H** (2001) *Biochem J*, **358**, 517-22
- Lodish HF** (1988) *Trends Biochem Sci*, **13**, 332-4
- Malide D, St-Denis JF, Keller SR, Cushman SW** (1997) *FEBS Lett*, **409**, 468-8
- Marsh BJ, Alm RA, McIntosh SR, James DE** (1995) *J Cell Biol*, **130**, 1081-91
- Marsh M, Bolzau E, White J, Helenius A** (1983) *J Cell Biol*, **96**, 455-61
- Marsh M, Helenius A, Matlin K, Simons K** (1983) *Methods Enzymol*, **98**, 260-6

- McNew JA, Parlati F, Fukuda R, Johnston RJ, Paz K, Paumet F, Sollner TH, Rothman JE (2000) *Nature*, **407**, 153-9
- Mellman I (1996) *Annu Rev Cell Dev Biol*, **12**, 575-625
- Mellman I, Simons K (1992) *Cell*, **68**, 829-40
- Mori H, Hashiramoto M, Clark AE, Yang J, Muraoka A, Tamori Y, Kasuga M, Holman GD (1994) *J Biol Chem*, **269**, 11578-83
- Mueckler M, Weng W, Kruse M (1994) *J Biol Chem*, **269**, 20533-8
- Nakajima H, Hirata A, Ogawa Y, Yonehara T, Yoda K, Yamasaki M (1991) *J Cell Biol*, **113**, 245-60
- Nishimura N, Balch WE (1997) *Science*, **277**, 556-8
- Novick P, Zerial M (1997) *Curr Opin Cell Biol*, **9**, 496-504
- Obar RA, Collins CA, Hammarback JA, Shpetner HS, Vallee RB (1990) *Nature*, **347**, 256-61
- Ohneda K, Ee H, German M (2000) *Semin Cell Dev Biol*, **11**, 227-33
- Oka MS, Landers RA, Bridges CD (1984) *Exp Cell Res*, **154**, 537-47
- Omata W, Shibata H, Li L, Takata K, Kojima I (2000) *Biochem J*, **346**, 321-8
- Orsel JG, Sincock PM, Krise JP, Pfeffer SR (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 9047-51
- Palade G (1975) *Science*, **189**, 347-58
- Patki V, Buxton J, Chawla A, Lifshitz L, Fogarty K, Carrington W, Tuft R, Corvera S (2001) *Mol Biol Cell*, **12**, 129-41
- Peraldi P, Spiegelman B (1998) *Mol Cell Biochem*, **182**, 169-75
- Pessin JE, Thurmond DC, Elmendorf JS, Coker KJ, Okada S (1999) *J Biol Chem*, **274**, 2593-6
- Peters KR, Carley WW, Palade GE (1985) *J Cell Biol*, **101**, 2233-8
- Rea S, James DE (1997) *Diabetes*, **46**, 1667-77
- Ross SR, Schofield JJ, Farr CJ, Bucan M (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 12386-90
- Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, Anderson RG (1992) *Cell*, **68**, 673-82
- Ryder JW, Kawano Y, Chibalin AV, Rincon J, Tsao TS, Stenbit AE, Combatsiaris T, Yang J, Holman GD, Charron MJ, Zierath JR (1999) *Biochem J*, **342**, 321-8

- Ryder JW, Kawano Y, Galuska D, Fahlman R, Wallberg-Henriksson H, Charron MJ, Zierath JR (1999) *FASEB J*, **13**, 2246-56
- Saltiel AR (2001) *Cell*, **104**, 517-29
- Sapperstein SK, Lupashin VV, Schmitt HD, Waters MG (1996) *J Cell Biol*, **132**, 755-67
- Scaife RM, Margolis RL (1997) *Cell Signal*, **9**, 395-401
- Schekman R, Mellman I (1997) *Cell*, **90**, 197-200
- Schekman R, Orci L (1996) *Science*, **271**, 1526-33
- Schmid SL (1997) *Annu Rev Biochem*, **66**, 511-48
- Schuldiner M, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, Melton DA, Benvenisty N (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 11307-12
- Schürmann A, Doege H, Ohnimus H, Monser V, Buchs A, Joost HG (1997) *Biochemistry*, **36**, 12897-902
- Schürmann A, Keller K, Monden I, Brown FM, Wandel S, Shanahan MF, Joost HG (1993) *Biochem J*, **290**, 497-501
- Segev N (2001) *Science*, **292**, 1313-4
- Shah P, Vella A, Basu A, Basu R, Schwenk WF, Rizza RA (2000) *J Clin Endocrinol Metab*, **85**, 4053-9
- Shaywitz DA, Espenshade PJ, Gimeno RE, Kaiser CA (1997) *J Biol Chem*, **272**, 25413-6
- Shpetner HS, Herskovits JS, Vallee RB (1996) *J Biol Chem*, **271**, 13-6
- Shupliakov O, Low P, Grabs D, Gad H, Chen H, David C, Takei K, De Camilli P, Brodin L (1997) *Science*, **276**, 259-63
- Simpson F, Whitehead JP, James DE (2001) *Traffic*, **2**, 2-11
- Stenbit AE, Burcelin R, Katz EB, Tsao TS, Gautier N, Charron MJ, Le Marchand-Brustel Y (1996) *J Clin Invest*, **98**, 629-34
- Strack AM, Bradbury MJ, Dallman MF (1995) *Am J Physiol*, **268**, 183-91
- Strack AM, Horsley CJ, Sebastian RJ, Akana SF, Dallman MF (1995) *Am J Physiol*, **268**, 1209-16
- Sutton RB, Fasshauer D, Jahn R, Brunger AT (1998) *Nature*, **395**, 347-53
- Sweitzer SM, Hinshaw JE (1998) *Cell*, **93**, 1021-9
- Tanner LI, Lienhard GE (1987) *J Biol Chem*, **262**, 8975-80

- Thurmond DC, Pessin JE** (2001) *Mol Membr Biol*, **18**, 237-45
- Thorens B, Flier JS, Lodish HF, Kahn BB** (1990) *Diabetes*, **39**, 712-719
- Tikkanen R, Obermuller S, Denzer K, Pungitore R, Geuze HJ, von Figura K, Honing S** (2000) *Traffic*, **1**, 631-40
- Todaka M, Hayashi H, Imanaka T, Mitani Y, Kamohara S, Kishi K, Tamaoka K, Kanai F, Shichiri M, Morii N, Narumiya S, Ebina Y** (1996) *Biochem J*, **315**, 875-82
- Troussard AA, Mawji NN, Ong C, Mui A, St Arnaud R, Dedhar S** (2003) *J Biol Chem*, (im Druck)
- Ueki K, Yamamoto-Honda R, Kaburagi Y, Yamauchi T, Tobe K, Burgering BM, Coffey PJ, Komuro I, Akanuma Y, Yazaki Y, Kadowaki T** (1998) *J Biol Chem*, **273**, 5315-22
- Urrutia R, Henley JR, Cook T, McNiven MA** (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 377-84
- van der Blik AM, Redelmeier TE, Damke H, Tisdale EJ, Meyerowitz EM, Schmid SL** (1993) *J Cell Biol*, **122**, 553-63
- van der Sluijs JP, van den Bos C, Baert MR, van Beurden CA, Ploemacher RE** (1993) *Leukemia*, **7**, 725-32
- Verhey, K.J., Yeh, J.I. und Birnbaum, M.J.** (1995) *J Cell Biol*, **130**, 1071-1079
- Vieira AV, Lamaze C, Schmid SL** (1996) *Science*, **274**, 2086-9
- Voet D, Voet J.G** (1994) *Biochemie*, Wiley-VCH, Weinheim, 940-943
- von Muhlen CA, Chan EK, Angles-Cano E, Mamula MJ, Garcia-De La Torre I, Fritzler MJ** (1998) *Lupus*, **7**, 507-14
- Wandel S, Schürmann A, Becker W, Summers SA, Shanahan MF, Joost HG** (1994) *FEBS Lett*, **348**, 114-8
- Wang Q, Khayat Z, Kishi K, Ebina Y, Klip A** (1998) *FEBS Lett*, **427**, 193-7
- Wang Q, Somwar R, Bilan PJ, Liu Z, Jin J, Woodgett JR, Klip A** (1999) *Mol Cell Biol*, **19**, 4008-18
- Wardzala LJ, Simpson IA, Rechler MM, Cushman SW** (1984) *J Biol Chem*, **259**, 8378-83
- Warnock DE, Schmid SL** (1996) *Bioessays*, **18**, 885-93
- White MF** (1997) *Diabetologia*, **40**, 2-17
- White S, Hatton SR, Siddiqui MA, Parker CD, Trowbridge IS, Collawn JF** (1998) *J Biol Chem*, **273**, 14355-62

Whitney JA, Gomez M, Sheff D, Kreis TE, Mellman I (1995) *Cell*, **83**, 703-13

Wingender, (1996) Diplomarbeit

Wood SI, Trayhurn P (2003) *Br J Nutr*, **89**, 3-9

Yamashiro DJ, Tycko B, Fluss SR, Maxfield FR (1984) *Cell*, **37**, 789-800

Zhang F.L, Casey P.J (1996) *Ann Rev Biochem*, **65**, 241-269

Erklärung :

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen noch nicht veröffentlicht worden ist sowie; dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Helmut W. Klein betreut worden.

Teilpublikationen:

Targeting of GLUT6 (formerly GLUT9) and GLUT8 in rat adipose cells.

Ivonne Lisinski, Annette Schürmann, Hans-George Joost, Samuel W. Cushman and Hadi Al-Hasani
Biochem. J. (2001) **358**, 517-522

In Vorbereitung:

Isolation and characterization of a Novel GLUT4-binding Protein.

Ivonne Lisinski, Hideko Matsumoto, Samuel W. Cushman and Hadi Al-Hasani

Lebenslauf:

15.03.1974	Geboren in Langendorf
1980-1984	Grundschule in Leverkusen
1993	Abitur in Leverkusen
1993 – 1999	Studium der Biologie an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen-Fakultät der Universität zu Köln. Abschluss : Diplom-Biologin
02.Oktober 1996	Diplom Vorprüfung
14.Oktober 1999	Diplom
18.01.1999 – 18.10.1999	Diplomarbeit in der Botanik. Diplomthema : Der Einfluss von Temperatur und Bodenfeuchte auf die Photosyntheseleistung und das Seneszenzverhalten von <i>Brownanthus pseudoschlichtianus</i> . Durchführung an der botanischen Fakultät der Universität zu Köln unter Leitung von Herrn Dr. Weidner.
Mai/2000 – Juli/2003	Durchführung der Dissertationsarbeit an der biochemischen Fakultät der Universität zu Köln unter Leitung von Herrn Prof. Dr. H.W. Klein Dissertationstitel : Untersuchungen zum Recycling der Glucosetransporter GLUT4, GLUT6, und GLUT8 in Adipocyten.
01.10.00-31.10.00	DAAD-Kurzstipendium für Doktoranden
24.06.02-23.09.02	DAAD-Aufstockungsstipendium
01.05.01-30.04.03	Graduiertenstipendium der Universität zu Köln
01.10.00-01.12.00	<i>Ph.D.-research studies at the National Institute of Health, Bethesda.</i>
24.06.02-24.09.02	<i>Ph.D.-research studies at the National Institute of Health, Bethesda.</i>

