

Untersuchungen zur Rolle des Scaffold-Proteins Enigma in Myoblasten

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Patrick Fuchs

aus Herrenberg

Tübingen

2016

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:	14.07.2016
Dekan:	Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Harald Staiger
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VIII
<hr/>	
1 Einleitung	1
1.1 Insulin und die Blutglukosehomöostase	1
1.2 Der Insulinrezeptor	2
1.3 Die Insulinsignalkaskade	4
1.3.1 Übertragung des Insulinsignals mittels Adapterproteine	4
1.3.2 Regulation zellulärer Funktionen durch Akt und Erk1/2	6
1.4 Fehlregulationen im Insulinsignalweg bei Insulinresistenz und Typ-2-Diabetes	9
1.5 Die Enigma-Proteinfamilie	12
1.6 Bekannte Funktionen von Enigma	13
Zielstellung	17
<hr/>	
2 Material und Methoden	18
2.1 Material	18
2.1.1 Geräteliste	18
2.1.2 Chemikalien und Substanzen	18
2.1.3 Kommerzielle Kits	19
2.1.4 Oligonukleotide für die quantitative <i>real time</i> PCR	19
2.1.5 <i>E. coli</i> Stämme	20
2.1.6 Expressionsvektoren	21
2.1.7 Plasmidvektor für RNA-Interferenz	21
2.1.8 Zelllinien	22
2.1.9 Antikörper	23
2.1.10 Software	25
2.2 Lösungen, Puffer und Medien	26
2.2.1 Molekularbiologie	26

Inhaltsverzeichnis

2.2.2	Kulturmedien für Bakterien	26
2.2.3	Zellkulturmedien	27
2.2.4	Transfektionslösung	28
2.2.5	Proteinbiochemie	28
2.3	Methoden	31
2.3.1	Molekularbiologische Methoden	31
2.3.1.1	Transformation von Bakterien mit Plasmiden	31
2.3.1.2	Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien, Konzentrationsbestimmung und Restriktionsverdau	31
2.3.1.3	Auftrennung von DNA mittels Gelelektrophorese	32
2.3.1.4	RNA-Isolation und Konzentrationsbestimmung	32
2.3.1.5	Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	33
2.3.1.6	Quantitative <i>real time</i> PCR (qRT-PCR)	33
2.3.2	Zellkulturtechniken	34
2.3.2.1	Allgemeine Zellkulturtechniken	34
2.3.2.2	Transfektion von Säugerzellen	35
2.3.2.2.1	Generierung stabiler Enigma überexprimierender C2C12 Myoblasten	35
2.3.2.2.2	Generierung von C2C12 Myoblasten mit stabilem Knockdown von Enigma	36
2.3.2.2.3	Transiente Transfektion von Hek293 Zellen	36
2.3.2.3	Einfrieren und Auftauen von Säugerzellen	36
2.3.2.4	Differenzierung von C2C12 Myoblasten	37
2.3.2.5	Stimulierung der Zellen mit Insulin	37
2.3.3	Proteinbiochemische Methoden	37
2.3.3.1	Zellyse mit Triton X-100	37
2.3.3.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	37
2.3.3.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	38
2.3.3.4	Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen und anschließende immunologische Detektion (Western-Blot)	39
2.3.3.5	Immunpräzipitation (IP)	39
2.3.3.6	Immunfluoreszenzfärbung	40
2.3.3.7	TUNEL-Assay	41
2.3.3.8	BrdU-Proliferationsassay	42
2.4	Untersuchungen eines möglichen Einflusses von Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) auf die Insulinsensivität anhand von Patientendaten	42
2.5	Statistische Auswertung	44

3 Ergebnisse	45
3.1 Eine veränderte Expression von Enigma in C2C12 Myoblasten führt zu insulinunabhängigen Änderungen im Phosphorylierungszustand von Akt und Erk1/2	45
3.1.1 Enigma Überexpression führt zu Veränderungen im Aktivierungszustand von IRS1, Akt und Erk1/2, hat aber keinen Einfluss auf den Insulineffekt in C2C12-Zellen	45
3.1.2 Ein stabiler Knockdown von Enigma in C2C12 Myoblasten führt ebenfalls zu veränderter IRS1, Akt und Erk1/2 Aktivierung	48
3.2 Ein verändertes Expressionslevel von Enigma hat Auswirkungen auf die Signalwege downstream von Akt	51
3.3 Mittels Co-Immunpräzipitation kann keine Interaktion zwischen Enigma und dem Insulin-Rezeptor nachgewiesen werden	52
3.4 Die erhöhte Erk1/2 Aktivierung nach Überexpression von Enigma ist MEK-abhängig	54
3.5 Enigma interagiert nicht mit upstream Komponenten des MAPK- Signalweges	54
3.6 Die Akt- und Erk1/2-Aktivierung durch Überexpression von Enigma ist abhängig von einer PI3K-Aktivität	57
3.7 Ein Überexpression bzw. ein Knockdown von Enigma führt zu Veränderungen im Phosphorylierungszustand bei weiteren Mitgliedern des MAPK-Signalweges	58
3.8 Die MAP3K MEKK1 könnte für die Veränderungen in den MAPK-Signalwegen verantwortlich sein	61
3.9 Die Effekte auf die MAPK-Signalwege werden nicht durch Rac1 vermittelt	62
3.10 Intrazelluläre Lokalisation von Enigma	63
3.11 Auswirkungen von Überexpression bzw. Knockdown von Enigma auf Endpunkte der PI3K- und MAPK-Signalwege	65
3.11.1 Überexpression von Enigma resultiert in einer leicht erhöhten Proliferationsrate	65
3.11.2 Enigma hat Einfluss auf die induzierte Apoptose in diesen Zellen	66
3.11.3 Die Expression wichtiger Gene für die mitochondriale Funktion ist dereguliert	68
3.11.4 Eine veränderte Enigma-Expression führt zu einer gestörten Differenzierung der C2C12 Myoblasten zu Myotuben	71
3.12 Variationen im Enigma Gen haben Auswirkungen auf die Insulinsensitivität	76
Supplementary Data	79

4 Diskussion

4.1	Co-Immunpräzipitation zeigt keine Interaktion zwischen Enigma und dem Insulinrezeptor	84
4.2	Die Enigma-Expression reguliert die Aktivierung von Komponenten des Insulinsignalwegs insulinunabhängig	85
4.3	Die Enigma-Expression steht im Zusammenhang mit der Aktivität der MAPK-Signalwege	88
4.4	Eine Überexpression von Enigma führt zu einer leicht erhöhten Proliferation	90
4.5	Eine veränderte Enigma-Expression führt zu erhöhter Lipotoxizität	90
4.6	Enigma beeinflusst die Differenzierung von C2C12 Myoblasten zu Myotuben	93
4.7	SNP-Analysen geben Hinweise auf Effekte von Enigma auf die Insulinsensitivität und den Blutzuckerspiegel im Menschen	95
4.8	Zusammenfassung der Rolle von Enigma in C2C12 Myoblasten in einem schematischen Modell	96

5	Zusammenfassung	99
6	Abkürzungsverzeichnis	101
7	Danksagung	107
8	Literaturverzeichnis	108

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1.1: Posttranslationale Prozessierung des Insulinmoleküls
- Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des Insulinrezeptors
- Abbildung 1.3: Signalweiterleitung über die Adapterproteine IRS und SHC am aktivierten Insulinrezeptor
- Abbildung 1.4: Substrate von Akt und deren Funktion
- Abbildung 1.5: Phosphorylierungsstellen im IRS-1 Protein
- Abbildung 1.6: Die Struktur von Enigma und einer LIM-Domäne
- Abbildung 3.1: Expressionsanalyse der stabil transfizierten C2C12 Myoblasten
- Abbildung 3.2: Eine Überexpression von Enigma führt zu Veränderungen der Phosphorylierungszustände von Komponenten des Insulinsignalweges
- Abbildung 3.3: Eine erhöhte Expression von Enigma hat keinen signifikanten Einfluss auf die Effekte von Insulin
- Abbildung 3.4: Expressionsanalyse von Enigma in den C2C12 Myoblasten mit stabilem Knockdown
- Abbildung 3.5: Ein Knockdown von Enigma führt zu Veränderungen der Phosphorylierungszustände von Komponenten des Insulinsignalweges
- Abbildung 3.6: Ein Enigma-Knockdown hat keinen signifikanten Einfluss auf die Effekte von Insulin auf die Akt- und Erk1/2-Phosphorylierung
- Abbildung 3.7: Auswirkungen der veränderten Enigma-Expression auf die basale Phosphorylierung von downstream Komponenten des PI3K-Signalweges
- Abbildung 3.8: Enigma zeigt keine Interaktion mit dem Insulin Rezeptor via Co-Immunpräzipitation
- Abbildung 3.9: Die Erk1/2 Aktivierung durch Enigma-Überexpression ist MEK1/2 abhängig
- Abbildung 3.10: Enigma zeigt keine Interaktion mit Grb2, Shc1 und c-Raf
- Abbildung 3.11: Die Akt- und Erk1/2-Aktivierung durch Enigma-Überexpression wird über die PI3K vermittelt
- Abbildung 3.12: Eine veränderte Enigma Expression hat auch Auswirkungen auf JNK und die p38 MAPK
- Abbildung 3.13: Die veränderte JNK-Aktivität wird wahrscheinlich durch die MKK4 vermittelt

Tabellenverzeichnis

- Abbildung 3.14: Die Aktivität der MAP3K MEKK1 ist nach Überexpression bzw. Knockdown von Enigma verändert
- Abbildung 3.15: Rac1 hat keinen Einfluss auf die Effekte von Enigma
- Abbildung 3.16: Intrazelluläre Lokalisation von Enigma in parentalen C2C12, sowie nach Überexpression und Knockdown
- Abbildung 3.17: Überexpression von Enigma hat einen leichten Einfluss auf das Zellwachstum
- Abbildung 3.18: Die p53 Expression ist nicht signifikant verändert
- Abbildung 3.19: Eine veränderte Enigma-Expression hat Auswirkungen auf die Stearat-induzierte Apoptose
- Abbildung 3.20: Veränderte mRNA Expression einiger Gene, welche für die mitochondriale Funktion wichtig sind
- Abbildung 3.21: Gestörte Differenzierung zu Myotuben
- Abbildung 3.22: Reduzierte Expression der terminalen Differenzierungsmarkern MyH4 und MyH2
- Abbildung 3.23: mRNA Expression wichtiger Regulatoren der Myogenese an unterschiedlichen Zeitpunkten während des Differenzierungsprozesses
- Abbildung 3.24: Der Verlust der Kontaktinhibierung wird nicht von der FAK vermittelt
- Abbildung 3.25: Der SNP rs234376 ist mit verbesserter Insulinsensitivität assoziiert
- Abbildung 3.26: Der SNP rs230763 ist bei Männern mit verbesserter Insulinsensitivität und niedrigerem Blutzuckerspiegel assoziiert
- Abbildung 3.27: Die Expression von Erk1/2 und Akt ist durch Überexpression bzw. Knockdown von Enigma nicht verändert
- Abbildung 3.28: Die mit den Leervektoren stabil transfizierten C2C12 Myoblasten zeigen keine Effekte auf die Aktivierung von Erk1/2 und JNK
- Abbildung 3.29: Die mit den Leervektoren stabil transfizierten C2C12 Myoblasten zeigen eine normale Differenzierung zu Myotuben
- Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der beobachteten Effekte von Enigma auf Komponenten der PI3K- und MAPK-Signalwege und einige Endpunkte dieser Signalwege

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Assoziation der ausgewählten tagging SNPs mit dem Parameter ISI-Matsuda

Tabelle 3.2: Assoziation der ausgewählten tagging SNPs mit der Plasmaglukosekonzentration

1. Einleitung

1.1 Insulin und die Blutglukosehomöostase

Um den Zellen eines Organismus zu signalisieren, ob Nährstoffe in Form von Glukose vorhanden sind, produziert der Körper Insulin und Glukagon. Beide sind Polypeptidhormone, die von den β -Zellen bzw. den α -Zellen der Langerhans-Inseln der Bauchspeicheldrüse produziert und in den Blutkreislauf abgegeben werden. Dabei wird die Sekretion durch die vorherrschenden Blutglukosekonzentration reguliert. Ist wenig Glukose verfügbar wird vermehrt Glukagon ausgeschüttet, was die Glykogenolyse und die Gluconeogenese stimuliert. Dagegen stimuliert eine Erhöhung der Blutglukose, durch Aufnahme kohlenhydrathaltiger Nahrung, die Insulinausschüttung und bewirkt eine erhöhte Glukoseaufnahme der Zellen (Matschinsky, 1990). Dies ist vor allem in Geweben mit hoher metabolischer Rate wie der Leber, der Skelettmuskulatur und des Fettgewebes der Fall. Diese Zellen können dadurch große Mengen an Glukose aufnehmen und durch Glykolyse in Energie umwandeln oder in Form von Glykogen oder Triglyzeriden speichern. Gleichzeitig hemmt Insulin die Lipolyse und die hepatische Gluconeogenese (Saltiel und Kahn, 2001). Durch die beiden Gegenspieler Insulin und Glukagon wird somit gewährleistet, dass der normale Blutglukosespiegel im menschlichen Körper zwischen 3,9 und 5,5 mmol/l liegt.

Schon vor der Entdeckung des Insulins war bekannt, dass Sekrete der Bauchspeicheldrüse eine Blutzucker senkende Wirkung haben. Im Jahr 1921 konnten Frederick Banting und Charles Best erstmals Insulin (damals als Isletin bezeichnet) aus der Bauchspeicheldrüse gewinnen. Bis in die 1980er Jahre, als es möglich wurde Humaninsulin biotechnologisch herzustellen, wurde das Insulin für medizinische Anwendungen hauptsächlich aus Schweinen und Rindern gewonnen. Dieses unterscheidet sich vom Humaninsulin in einer (bei Schweinen) bzw. drei (bei Rindern) Aminosäuren. Das Insulingen wird von ca. 300 Nukleotiden auf dem kurzen Arm des Chromosoms 11 codiert und enthält 2 Introns und 3 Exons (Owerbach et al., 1980). Die mRNA wird zunächst in ein Vorläufermolekül, das Präproinsulin, translatiert und im endoplasmatischen Retikulum zu Proinsulin prozessiert (Abb. 1.1.). Das Proinsulin wird schließlich in Golgi-Vesikel aufgenommen und in einem Komplex mit Zink als Hexamer gespeichert. Das C-Peptid wird erst unmittelbar vor der Sekretion durch die Proprotein-Convertasen 1 und 2 abgespalten und zusammen mit dem aktiven Insulinmolekül in den Blutkreislauf abgegeben. Das fertige Makromolekül hat ein Molekulargewicht von ca. 5,7 kDa und besteht aus zwei Polypeptiden, der A-Kette und der B-Kette. Anhand des C-Peptids kann bei Diabetikern bestimmt werden, wieviel Insulin der Körper noch selbst produziert, da das gentechnisch hergestellte Insulin für die Behandlung kein C-Peptid enthält.

Einleitung

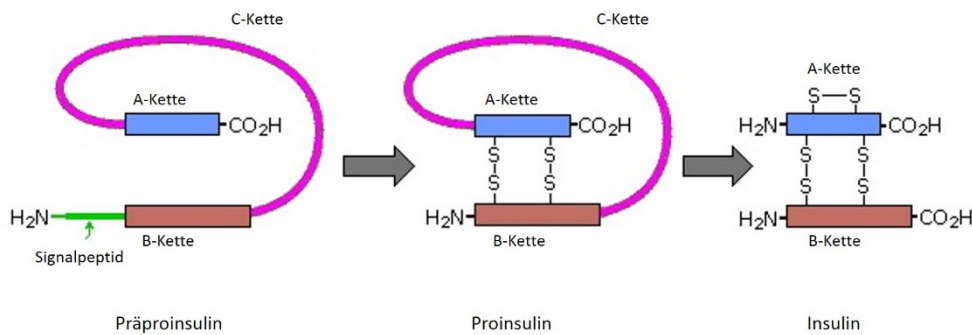


Abbildung 1.1: Posttranslationale Prozessierung des Insulinmoleküls
(angelehnt an Snustad et al., 1997)

Die Translation der mRNA des Insulins führt zu dem inaktiven Vorläufermolekül Präproinsulin. Mittels des N-terminalen Signalpeptids erfolgt eine Translokation in das endoplasmatische Retikulum, wo die Prozessierung zum aktiven Insulinmolekül stattfindet. Dazu wird in einem ersten Schritt zunächst das Signalpeptid proteolytisch abgespalten und Disulfidbrücken zwischen der A-Kette (21 AS) und der B-Kette (30 AS) ausgebildet. In einem weiteren Schritt wird das C-Peptid entfernt. Das prozessierte Insulinmolekül weist in der A-Kette zudem eine intrachainäre Disulfidbrücke auf.

1.2 Der Insulinrezeptor

Insulin vermittelt seinen Effekt durch die Aktivierung des Insulinrezeptors (IR). Der Insulinrezeptor ist ein Glykoprotein, das in fast allen Zellen von Wirbeltieren exprimiert wird. Dabei variiert die Anzahl der Rezeptormoleküle pro Zelle von 40 in Erythrozyten bis ca. 200000 in Fett- und Leberzellen (White, 1997). Das humane Rezeptorgen auf dem Chromosom 19 umfasst ca. 150 kb und codiert für 22 Exons (Seino et al., 1990). Der Rezeptor gehört zu der Klasse der Rezeptortyrosinkinasen (RTK) und stellt ein Heterotetramer aus zwei extrazellulären α - und zwei transmembranären β -Untereinheiten dar (Abb. 1.2.). Die beiden Untereinheiten werden durch proteolytische Spaltung eines Pro-Rezeptors generiert. In Säugetieren sind zwei Isoformen des IR beschrieben, welche sich durch das Vorhandensein (IR-B) bzw. Fehlen (IR-A) des Exon 11 in der α -Untereinheit unterscheiden und dadurch eine veränderte Affinität gegenüber dem Insulin-like Growth Factor 2 (IGF-2) aufweisen. Während die IR-B Isoform ausschließlich durch Insulin aktiviert wird und somit hauptsächlich metabolische Effekte vermittelt, führt die Bindung von IGF-2 an die IR-A Isoform zu einem eher wachstumsfördernden Signal. Es konnte gezeigt werden, dass die IR-A Isoform des IR verstärkt pränatal und in Tumorzellen exprimiert ist (Belfiore et al., 2009, Denley et al., 2003). Außerdem können sogenannte Hybridrezeptoren, bestehend aus dem Insulinrezeptor und dem Insulin-like-Growth-Factor 1 Rezeptor (IGF-1R) entstehen. Dies wird durch die ähnliche Struktur dieser beiden Rezeptoren ermöglicht. Solche Hybridrezeptoren weisen eine unterschiedliche Stimulierbarkeit durch Insulin, IGF-1 und IGF-

Einleitung

2 auf, was wahrscheinlich daran liegt, dass die größten strukturellen Unterschiede zwischen dem IR und dem IGFR in den Liganden-bindenden Domänen zu finden sind (Slaaby et al., 2006, Pandini et al., 2002). Der intrazelluläre Teil der β -Untereinheiten kann hauptsächlich in drei Domänen unterteilt werden und weist einige Tyrosinreste auf. Das Exon 16 codiert für die Juxtamembran-Domäne, die an die Transmembran-Domäne anschließt. Hier ist das NPEY-Motiv lokalisiert, welches nach Aktivierung des Rezeptors am Tyrosinrest phosphoryliert vorliegt und dadurch eine Bindestelle für die Phosphotyrosin-Bindedomäne (PTB-Domänen) der IRS-Proteine und SHC darstellt. Den größten Teil der β -Untereinheit nimmt die Tyrosinkinase-Domäne ein. Sie besitzt drei Tyrosinreste, welche nach Bindung des Liganden Insulin trans-autophosphoryliert werden, was zu einer Konformationsänderung führt, wodurch das aktive Zentrum der Tyrosinkinase für Substrate zugänglich wird (Hubbard, 1997). Am C-terminalen Ende befinden sich zwei weitere Tyrosinreste, für die regulatorische Funktionen vermutet werden (Tennagels et al., 2000, Kaliman et al., 1993).

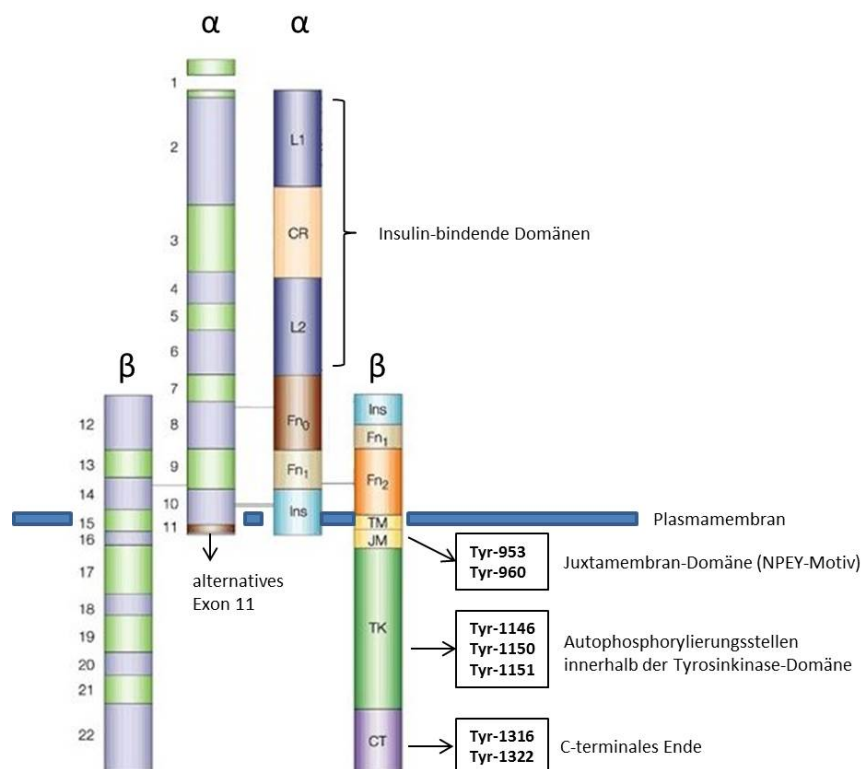


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des Insulinrezeptors (angelehnt an De Meyts und Whittaker, 2002)

Der IR ist aus zwei extrazellulären α -Untereinheiten und zwei transmembranären β -Untereinheiten, die über Disulfidbrücken (graue Striche) miteinander verbunden sind, aufgebaut. Die Tyrosinphosphorylierungsstellen der β -Untereinheit sind dargestellt. Gezeigt ist die IR-B Isoform mit Exon 11. L1 und L2, large domains 1 und 2 (leucine-rich repeats); CR, Cys-reiche Domäne; Fn₀, Fn₁, Fn₂, fibronectin type III domains; Ins, Insert in Fn₁; TM, Transmembrandomäne; JM, Juxtamembran-Domäne; TK, Tyrosinkinase-Domäne; CT, C-terminales Ende

1.3 Die Insulinsignalkaskade

1.3.1 Übertragung des Insulinsignals mittels Adapterproteine

Im nicht-aktivierten Zustand, haben die α -Untereinheiten des Insulinrezeptors eine inhibitorische Wirkung auf die Tyrosinkinaseaktivität. Shoelson et al. (1988) konnten zeigen, dass das Entfernen der α -Untereinheiten zu einer konstitutiven Aktivierung des Insulinrezeptors führt. Die Bindung von Insulin an die α -Untereinheiten des Rezeptors führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptormoleküls, was die Autophosphorylierung verschiedener Tyrosinreste innerhalb der β -Untereinheiten zur Folge hat (Belfiore et al., 2009). Dadurch wird zum einen die Tyrosinkinase aktiviert und es entstehen Bindestellen für verschiedene Docking-Proteine wie die Insulin-Rezeptor-Substrat Proteine (IRS1, 2, 3, 4), aber auch SHC (*Src homology 2 domain containing transforming protein*) oder GAB1 (*Grb2-associated binding protein1*). Nachdem diese Proteine über Phosphotyrosin-Bindedomänen (PTB) an den aktivierten Rezeptor gebunden haben, werden sie vom Insulinrezeptor an Tyrosinresten phosphoryliert. Dies wiederum generiert Bindestellen für Proteine mit SH2-Domänen. SH2-Domänen sind ca. 100 Aminosäuren lang und binden an eine spezifische Sequenz um ein phosphoryliertes Tyrosin (Pawson, 1995). Eines dieser Phosphotyrosin-bindenden Proteine im Insulinsignalweg ist die regulatorische p85-Untereinheit der PI3K (*Phosphatidylinositol-3-kinase*). Die Interaktion zwischen IRS-1 und der p85-Untereinheit führt zu einer Konformationsänderung der PI3K, wodurch die katalytische Untereinheit p110 der PI3K aktiviert wird. Dabei handelt es sich um eine PI3K der Klasse 1A. Diese phosphoryliert membranständiges Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat (PIP₂) an Position 3 des Inositolrings. Dadurch entsteht der second messenger Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat (PIP₃). Auch weitere PI3Ks der Klasse 2 und 3, sowie die PIKfyve können durch Insulin aktiviert werden. PI3Ks der Klasse 2, und deren Produkt Phosphatidylinositol-3-phosphat, werden beispielsweise mit dem Glukosetransport nach Insulinstimulation in Verbindung gebracht (Falasca et al., 2007). Auch für die PIKfyve wird eine Rolle bei der GLUT4-Translokation beschrieben, wobei der exakte Mechanismus nicht bekannt ist (Berwick et al., 2004). Die von den PI3Ks synthetisierten Phosphatidylinositolphosphate dienen, wie bereits erwähnt, als *second messenger*, indem durch sie weitere Komponenten des Insulinsignalweges an die Zellmembran rekrutiert werden. Dazu gehört die Kinase Akt (auch als PKB bezeichnet), die ein zentrales Protein im Insulinsignalweg darstellt und im nächsten Kapitel noch ausführlicher erläutert wird. Akt besitzt eine N-terminale PH-Domäne, durch die eine Lokalisation an membranständiges PIP₃ möglich ist (Alessi et al., 1996). Neben Akt wird auch die *Phosphoinositide-dependent Kinase-1* (PDK1) mittels einer PH-Domäne an die Membran rekrutiert. Infolge dieser Co-lokalisierung wird Akt von der PDK1 an Thr308 innerhalb der Kinasedomäne phosphoryliert und somit aktiviert (Song et al., 2005,

Alessi et al., 1997). Für eine vollständige Aktivierung ist eine zweite Phosphorylierung an einem Serinrest (Ser473) in der hydrophoben Domäne am C-Terminus nötig. Bisher ist noch nicht vollständig geklärt, welche Kinase für diese Phosphorylierung verantwortlich ist. Es wird jedoch vermutet, dass es sich dabei um den mTORC2 (Sarbasov et al., 2005) oder die DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*) (Feng et al., 2004) handelt.

Über die IRS-Proteine kann auch der wachstumsfördernde Signalweg Ras/Erk durch Rekrutierung eines Komplexes aus Grb2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*) und SOS (*Son of Sevenless*) aktiviert werden (Abb.1.3). Hauptsächlich wird dieser Signalweg jedoch über das Adapterprotein SHC aktiviert. Dieses bindet wie die IRS-Proteine über eine PTB-Domäne an den aktivierten Insulinrezeptor und wird von diesem an einem Tyrosinrest phosphoryliert. Nach Bindung des Grb2/SOS-Komplexes kommt es durch die GEF-Funktion (*Guanine nucleotide Exchange Factor*) von SOS zum Austausch von GDP zu GTP im Ras-Protein. Die Familie der Ras-Proteine sind kleine GTPasen, die durch Prenylierung mit der Membran assoziiert sind. Eine Aktivierung von Ras führt schließlich zu der Aktivierung der MAP3K c-Raf, der ersten Kinase der dreistufigen MAPK-Signalkaskade (MAP3K→MAPK2K→MAPK). Über MEK1/2 (zwei MAP2K) werden so die MAPKs Erk1/2 aktiviert, was zur Phosphorylierung/Aktivierung einer Vielzahl von Transkriptionsfaktoren führt. Dadurch werden wichtige zelluläre Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose reguliert.

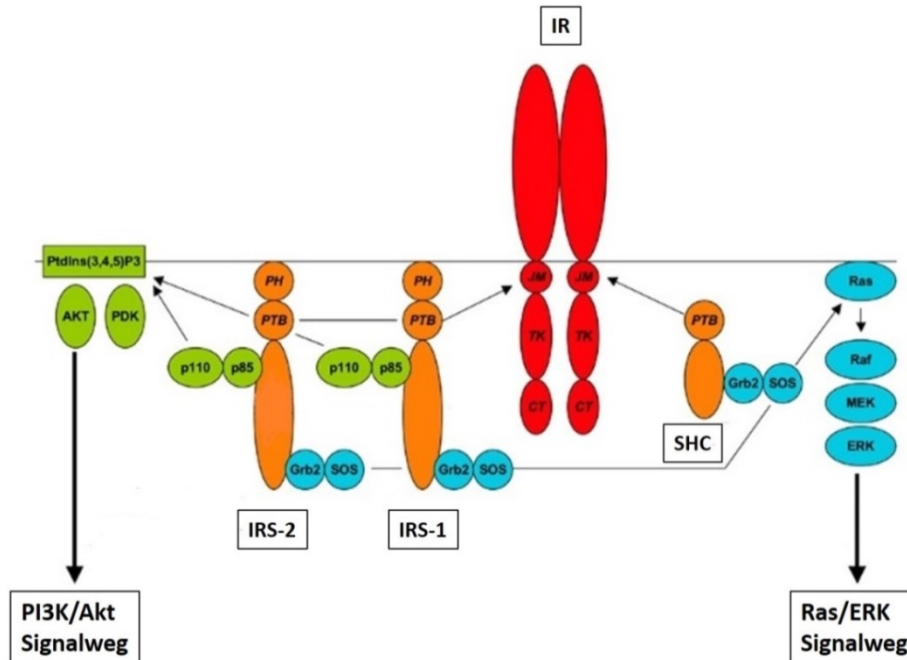


Abbildung 1.3: Signalweiterleitung über die Adapterproteine IRS und SHC am aktivierten Insulinrezeptor (angelehnt an Siddle, 2012)

Die Bindung von Insulin führt zur Autophosphorylierung mehrerer Tyrosinreste in der zytosomatischen β -Untereinheit. Über PTB-Domänen binden die Adapterproteine IRS-1, IRS-2 und SHC an Phosphotyrosin-Motive der JM-Domäne und werden ihrerseits an Tyrosinresten phosphoryliert. Proteine mit SH2-Domänen, wie die regulatorische Untereinheit p85 der PI3K oder Grb2, werden dadurch gebunden und der metabolische Insulinsignalweg über Akt bzw. der eher wachstumsfördernde Signalweg über Ras/Erk aktiviert. CT: C-terminale Domäne, JM: Juxtamembran-Domäne, PTB: Phosphotyrosin-Bindedomäne, PH: Pleckstrin homology domain, TK: Tyrosinkinase-Domäne

1.3.2 Regulation zellulärer Funktionen durch Akt und Erk1/2

Die Serin/Threonin Kinase Akt wurde ursprünglich als retrovirales Onkogen im AKT8 Virus (Bellacosa et al., 1991, Staal, 1987) und als homologes Protein zur Proteinkinase C (Jones et al., 1991) entdeckt. Heute ist bekannt, dass Akt eine zentrale Rolle in verschiedenen intrazellulären Signalwegen einnimmt, und eine Fehlregulation des PI3K/Akt Signalweges mit komplexen Krankheiten wie Typ-2-Diabetes und Krebs in Verbindung steht (Bellacosa et al., 2005, Engelman et al., 2006).

Es existieren drei Isoformen von Akt (Akt1, Akt2, Akt3), die von unterschiedlichen Genen kodiert werden. Trotz der hohen Homologie untereinander, sind auch Isoform-spezifische Funktionen beschrieben. Während ein Knockout von Akt1 zu einer höheren Apoptoserate führt und damit eine Rolle für das Überleben der Zellen einnimmt (Chen et al., 2001), scheint Akt2 hauptsächlich metabolische Funktionen zu haben (Cho et al., 2001). Akt3 wird dagegen eine Rolle bei der Gehirnentwicklung zugeschrieben (Tschopp et al., 2005). Da die Kinase Akt außerdem eine starke Homologie zu den Proteinkinasen A, G und C aufweist, wird sie zur Familie der AGC-Kinasen gezählt (Pearce et al., 2010). Abbildung 1.4 zeigt einige wichtige Substrate von Akt. Das erste beschriebene direkte Substrat von Akt war die Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK3) (Cross et al., 1995). Sind keine Nährstoffe verfügbar, wird die GSK3 nicht von Akt phosphoryliert und bewirkt ihrerseits eine inhibitorische Phosphorylierung der Glykogensynthase. Insulin signalisiert somit den Zellen über Akt und GSK3, dass Nährstoffe für die Speicherung in Glykogen verfügbar sind. Um Glukose zu speichern, muss diese erst aufgenommen werden. Durch die Expression des Glukosetransporters Glut1 kann Glukose unter basalen Bedingungen von Zellen aufgenommen werden (Ciaraldi et al., 2005, Kraegen et al., 1993). Die Menge an aufnehmbarer Glukose ist hierbei jedoch durch die Expression dieses Transporters limitiert. Insulin ermöglicht es den Zellen, durch die Translokation von, in Vesikel gespeicherten, Glut4-Molekülen an die Plasmamembran, in kurzer Zeit große Mengen an Glukose aufzunehmen. Mehrere Arbeiten konnten zeigen, dass dafür eine Phosphorylierung von AS160 (Akt-Substrat 160) durch Akt nötig ist (Eguez et al., 2005, Sano et al., 2003).

Weiterhin hat die Aktivierung von Akt positive Effekte auf das Überleben von Zellen. Dazu inhibiert Akt pro-apoptotische Prozesse oder pro-apoptotische Proteine. Die Phosphorylierung von BAD (*B-cell lymphoma 2 [Bcl2]-associated agonist of cell death*) erzeugt eine Bindestelle für 14-3-3 Proteine, wodurch eine Interaktion von BAD mit seinen Zielproteinen verhindert wird (Datta et al., 2000, del Peso et al., 1997). Außerdem reguliert Akt die Expression weiterer pro-apoptotischer Faktoren durch die Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren FOXO (*Forkhead-box protein O*) und p53. FOXO Transkriptionsfaktoren werden durch Phosphorylierung aus dem Zellkern exportiert und

dadurch inhibiert (Tran et al., 2003). Proapoptotische Zielgene von FOXO, welche für Proteine wie BIM oder den Fas-Ligand kodieren, werden so inhibiert (Dijkers et al., 2002, Brunet et al., 1999). Der negative Effekt von Akt auf p53 wird durch die positive Regulation der E3-Ubiquitin Ligase MDM2 (*Mouse Double Minute 2*) vermittelt. Eine Phosphorylierung von MDM2 durch Akt führt zu einem Import in den Zellkern, was folglich zu Ubiquitinierung und Abbau von p53 führt (Mayo und Donner, 2001, Zhou et al., 2001). Cardone et al. (1998) konnten zudem zeigen, dass die Pro-Caspase-9 ein direktes Substrat von Akt darstellt und eine Phosphorylierung eine verminderte Aktivität dieser pro-apoptotischen Protease zur Folge hat.

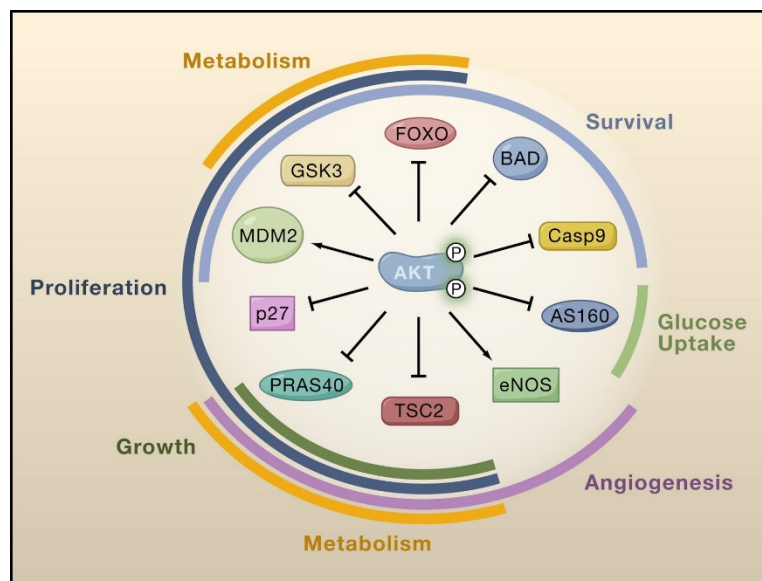


Abbildung 1.4: Substrate von Akt und deren Funktion (Manning und Cantley, 2007)

Die Serin/Threonin Kinase Akt hat durch Phosphorylierung sowohl aktivierende (Pfeile), als auch inhibitorische (geblockte Pfeile) Effekte auf deren Substrate. Dadurch werden zelluläre Prozesse wie Metabolismus, Proliferation, Wachstum, Überleben, Glukoseaufnahme und Gefäßbildung reguliert.

Neben den positiven Effekten auf das Überleben von Zellen, beeinflusst Akt auch deren Proliferation. Zwei wichtige Zellzyklusinhibitoren, p27 und p21, werden durch Akt beeinflusst. Zum einen geschieht dies über die bereits beschriebene Regulierung der Transkriptionsfaktoren FOXO und p53. Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass diese beiden Proteine direkte Substrate von Akt sind. Eine Phosphorylierung führt zu einer vorwiegenden Lokalisierung im Zytoplasma, wodurch die anti-proliferativen Eigenschaften von p27 und p21 unterdrückt werden (Liang et al., 2002, Zhou et al., 2001). Weiterhin reguliert Akt auch Prozesse, die das Zellwachstum, also die Zunahme von Zellmasse, beeinflussen. Hauptsächlich vermittelt Akt dies über die positive Regulation des mTORC1. Der mTORC1 ist ein Multi-Protein-Komplex und beeinflusst durch die Phosphorylierung seiner Substrate S6-Kinase und 4E-BP1 (*eukaryotic translation initiation factor 4E binding*

protein) beispielsweise die Initiation der Translation und die Biogenese von Ribosomen (Wullschleger et al., 2006). Allerdings aktiviert Akt den mTORC1 nicht direkt, sondern über die Phosphorylierung des Heterodimers TSC1/2 (*tuberous sclerosis complex 1/2*) (Inoki et al., 2002, Manning et al., 2002, Potter et al., 2002). Diese Phosphorylierung inhibiert den TSC1/2-Komplex, der einen GTPase-aktivierenden Proteinkomplex darstellt, wodurch dessen Substrat Rheb im GTP-gebundenen Zustand verbleibt und den mTORC1 aktiviert. In den letzten Jahren wurde zudem ein weiterer Mechanismus der mTORC1 Aktivierung durch Akt beschrieben. PRAS40 (*Proline-Rich Akt Substrate of 40kDa*) wurde als negativer Regulator des mTORC1 entdeckt. Die Phosphorylierung durch Akt ermöglicht eine Interaktion mit 14-3-3 Proteinen und unterbindet damit den negativen Einfluss auf den mTORC1 (Vander Haar et al., 2007).

Eine Stimulation von Endothelzellen mit VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) resultiert in einer starken Aktivierung des PI3K-Akt Signalwegs. In diesen Zellen reguliert Akt neben den oben beschriebenen Prozessen auch die *endothelial nitric oxide (NO) synthase* (eNOS) (Dimmeler et al., 1999, Fulton et al., 1999). Somit spielt Akt indirekt, durch das von der eNOS produzierte Stickstoffmonoxid, auch bei der Gefäßerweiterung bzw. der Gefäßneubildung eine Rolle (Morbidelli et al., 2003).

Da der PI3K-Akt Signalweg viele zelluläre Prozesse reguliert, die in Tumorzellen oder bei Typ-2-Diabetes fehlreguliert sind, muss sichergestellt werden, dass die Aktivität von Akt strikt reguliert wird. Wie bereits beschrieben, hängt die Aktivierung von Akt von der Verfügbarkeit von PIP3 ab. Ein Gegenspieler der PI3K ist die Phosphatase PTEN (*Phosphatase and Tensin homolog*) (Song et al., 2012). Durch Dephosphorylierung von PIP3 kann somit die Aktivierung von Akt gesteuert werden. Aber es sind auch Phosphatasen bekannt, die Akt direkt durch Dephosphorylierung hemmen. Dazu zählen die PP2A (*Protein Phosphatase 2A*) und PHLPP (*Pleckstrin Homology domain Leucine-rich repeat Protein Phosphatase*).

Ein weiterer wichtiger Signalweg, der durch Insulin aktiviert wird, ist der MAPK-Signalweg. Im menschlichen Genom wurden vierzehn MAPKs identifiziert. MAPKs sind Serin/Threonin Kinasen und werden in klassische und atypische MAPKs eingeteilt. Atypische MAPKs unterscheiden sich von den Vertretern der klassischen MAPK hinsichtlich der Regulation, der Substratspezifität und ihrer physiologischen Funktionen. Verglichen mit den klassischen MAPKs, wie beispielsweise Erk1/2, ist über diese Signalwege noch relativ wenig bekannt (Coulombe und Meloche, 2007). Neben Erk1/2 existieren noch weitere klassische MAPKs. Zu den ebenfalls gut beschriebenen Vertretern gehören JNK, die p38-MAPK und Erk5. Diese werden jedoch hauptsächlich durch zellulären Stress und Inflammation aktiviert (Kyriakis und Avruch, 2001) und nicht oder kaum durch Insulin und Wachstumsfaktoren beeinflusst (Kayali et al., 2000).

Die MAPKs Erk1/2 sind normalerweise im Zytoplasma lokalisiert. Nach extrazellulärer Stimulation mit Wachstumsfaktoren oder Insulin, kann eine signifikante Menge der aktivierten Kinasen jedoch auch im Zellkern gefunden werden (Zehorai et al., 2010, Lenormand et al., 1993). Erk1/2 kann somit eine große Menge an Substraten phosphorylieren (Yoon und Seger, 2006). Sowohl zytoplasmatische Substrate (TSC2, RSK (*ribosomal S6 kinase*) und MNK (*MAPK iNteracting Kinases*)) als auch Substrate im Zellkern (Elk-1, c-Fos, c-Myc, MEF2 (*myocyte enhancer factor 2*) und STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*)) werden dadurch reguliert. Eine Aktivierung von Erk1/2 beeinflusst daher viele zelluläre Prozesse wie Proliferation, Apoptose und Differenzierung (Meloche und Pouyssegur, 2007, Lu und Xu, 2006).

1.4 Fehlregulationen im Insulinsignalweg bei Insulinresistenz und Typ-2-Diabetes

Bei Typ-2-Diabetes ist der Insulinsignalweg an einer oder gar mehreren Stellen fehlreguliert. Dadurch können die Zielgewebe von Insulin, also hauptsächlich das Fettgewebe, die Leber und der Skelettmuskel nicht mehr ausreichend Nährstoffe in Form von Glukose aufnehmen und es entsteht eine Hyperglykämie. Die Zellen haben eine Insulinresistenz entwickelt.

Die Ursache für eine zelluläre Insulinresistenz kann schon auf Ebene des Insulinrezeptors selbst zu finden sein. Verschiedene Arbeiten konnten eine reduzierte Aktivität der Rezeptortyrosinkinase mit Typ-2-Diabetes in Zusammenhang bringen (Handberg et al., 1993, Caro et al., 1987, Le Marchand-Brustel et al., 1985). Die daraus resultierende reduzierte Tyrosinphosphorylierung von IRS-1, hat eine verminderte Bindung an die regulatorische Untereinheit p85 und somit eine reduzierte PI3K-Aktivierung zur Folge. Strack et al. (2000) konnten zudem zeigen, dass die Tyrosinkinaseaktivität des Insulinrezeptors über Serinphosphorylierungen durch PKCs negativ beeinflusst wird. Die Tyrosinkinaseaktivität des Insulinrezeptors kann auch durch weitere PKC-Isoformen negativ reguliert werden (Kellerer et al., 1998, Bossenmaier et al., 1997).

Viele Arbeiten konnten jedoch auch zeigen, dass IRS-1 durch einige Kinasen, die beispielsweise durch Fettsäuren, Zytokine oder Zellstress aktiviert werden, beeinflusst werden kann. Dabei kann IRS-1 über Phosphorylierung an Serinresten sowohl positiv als auch negativ reguliert werden (Gual et al., 2005). Über 20 solcher Phosphorylierungsstellen sind bekannt. In Abbildung 1.5 sind einige dieser regulatorischen Phosphorylierungsstellen und die entsprechenden Kinasen gezeigt. Manche dieser Phosphorylierungsstellen befinden sich innerhalb der PTB-Domäne, wodurch die Interaktion mit dem Insulinrezeptor beeinflusst werden kann (Moeschel et al., 2004, Aguirre et al., 2002). Über den mTORC1 und der p70-

S6K findet durch Phosphorylierung eine negative Feedback-Regulierung statt, um das Insulinsignal zu reduzieren (Carlson et al., 2004). Außerdem ist bekannt, dass auch die Aktivierung verschiedener PKC-Isoformen zu einer inhibierenden Phosphorylierung im IRS-1 Protein führen kann (Müssig et al., 2005). Eine Aktivierung von JNK kann IRS-1 ebenfalls negativ beeinflussen (Müssig et al., 2005, Aguirre et al., 2000) und stellt somit eine mögliche Verbindung zwischen Inflammation bzw. Zellstress und der Entstehung von Typ-2-Diabetes dar (Hotamisligil, 2005). Andere Phosphorylierungen, beispielsweise durch MAPKs oder mTOR, können zu einer verminderten Interaktion mit p85 führen (Gual et al., 2003). Lange Zeit galt eine Serinphosphorylierung von IRS-1 als ein Mechanismus zur negativen Regulierung. Einige Arbeiten beschreiben jedoch auch positive Effekte solcher Phosphorylierungen (Luo et al., 2005, Gual et al., 2005). Auch ein Zusammenspiel verschiedener Serinphosphorylierungen kann Effekte auf das Insulinsignal haben (Weigert et al., 2008).

Auf Ebene der PI3K kann es ebenfalls zu einer Fehlregulation des Insulinsignals kommen. Die meisten Arbeiten bezüglich der PI3K konzentrierten sich auf die PI3Ks der Klasse 1.

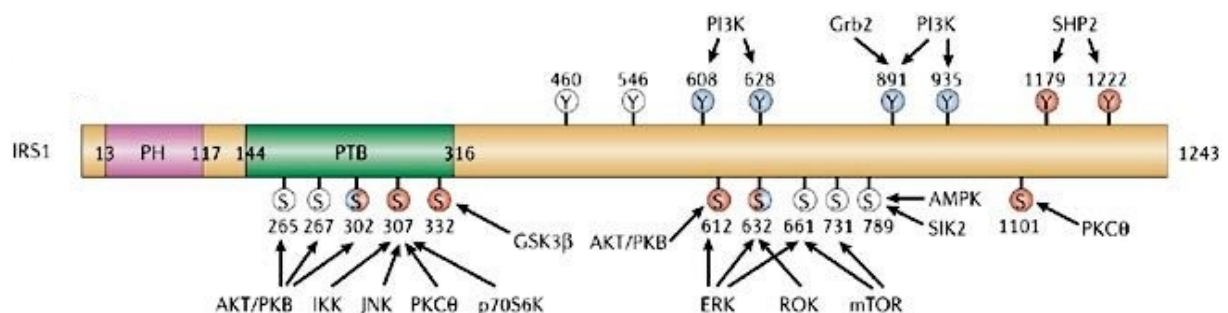


Abbildung 1.5: Phosphorylierungsstellen im IRS-1 Protein (nach Taniguchi et al., 2006)

Gezeigt sind einige der Phosphorylierungsstellen und Interaktionspartner des IRS-1 Proteins der Maus. Tyrosinphosphorylierung an verschiedenen Stellen führt zur Bindung von Proteinen, die das Insulinsignal weiterleiten. Über die Phosphorylierung von Serinresten kann die Funktion von IRS-1 sowohl positiv als auch negativ beeinflusst werden.

Die Rollen der Klasse 2 und 3 PI3Ks sind weniger gut erforscht. Es gibt allerdings Hinweise, die eine Fehlregulation dieser Enzyme mit einer Insulinresistenz in Verbindung bringen (Falasca et al., 2007, Brown et al., 1999). Eine verringerte PIP3-Produktion kann zu einer reduzierten Aktivierung von Akt führen. Daher wird eine Akt-Phosphorylierung oft als Indikator des Insulinsignals verwendet. Eine verringerte Phosphorylierung von Akt in Adipozyten von Typ-2-Diabetikern konnte nachgewiesen werden (Carvalho et al., 2000, Rondinone et al., 1999). Obwohl hauptsächlich die Isoform Akt2 mit metabolischen Effekten in Verbindung steht und eine hohe Expression im Skelettmuskel zeigt, könnten auch

isoformspezifische Funktionen bei der Entstehung von Insulinresistenz bzw. Typ-2-Diabetes eine Rolle spielen (Cozzone et al., 2008, Brozinick et al., 2003, Krook et al., 1998).

Weiterhin kann eine reduzierte Aktivität von atypischen PKCs (aPKCs) bei insulinresistenten Patienten und Typ-2-Diabetikern beobachtet werden. Die insulinstimulierte Aktivierung von PKCzeta ist beispielsweise in Myotuben und Adipozyten von Typ-2-Diabetikern gestört (Sajan et al., 2004, Beeson et al., 2003). Dies kann Auswirkungen auf den Glukosetransport haben (Farese et al., 2005, Bandyopadhyay et al., 2002). Weyrich et al. (2007) brachten zudem die Interaktion zwischen einer atypischen PKC und dem *partitioning defective protein-6α* (Par6α) mit einer inhibitorischen Phosphorylierung von Akt1 an Thr34 innerhalb der PH-Domäne in Verbindung. Übergewicht kann zu einer erhöhten intrazellulären Lipidkonzentration im Muskel führen. Dadurch wird vermehrt Diacylglycerol (DAG) gebildet. In diesem Zusammenhang konnten erhöhte Mengen an klassischen und den sogenannten *novel* PKCs an der Membran gefunden werden. Diese werden im Gegensatz zu den atypischen PKCs durch DAG und/oder Calcium aktiviert. Mehrere Arbeiten konnten nachweisen, dass eine verstärkte Aktivität dieser PKCs einen inhibierenden Effekt auf einzelne Komponenten des Insulinsignalwegs hat (Erion und Shulman, 2010, Itani et al., 2002). So kann eine erhöhte Aktivität von PKCs beispielsweise zu einer Serinphosphorylierung von IRS-Proteinen führen (Yu et al., 2002). Auch eine Interaktion von PKCε mit dem Insulinrezeptor kann in einem abgeschwächten Insulinsignal resultieren (Samuel et al., 2007, Hribal et al., 2001).

Die MAPK-Signalwege sind im Hinblick auf Insulinresistenz weniger gut erforscht und bei den wenigen verfügbaren Publikationen gehen die Meinungen auseinander. Während einige Ergebnisse auf keine Beteiligung dieser Signalwege bei Insulinresistenz bzw. T2D schließen lassen (Cusi et al., 2000), konnte in Untersuchungen einiger Arbeitsgruppen jedoch eine erhöhte basale Phosphorylierung/Aktivierung einiger MAPKs bei T2D nachgewiesen werden (Zhang et al., 2011, Bandyopadhyay et al., 2005, Carlson et al., 2003, Koistinen et al., 2003). Auch Auswirkungen von konstitutiv aktiven MAPKs auf andere Komponenten des Insulinsignalwegs, wie dem IR und den IRS-Proteinen, wurden beschrieben (Fujishiro et al., 2003).

Zusammenfassend zeigen die verfügbaren Publikationen, dass für eine zelluläre Insulinresistenz nicht eine bestimmte Fehlregulation verantwortlich gemacht werden kann. Vielmehr können, durch die Komplexität der Insulinsignalwege, die Ursachen, die eine Insulinresistenz bedingen, auf Fehlregulationen verschiedener Komponenten zurückzuführen sein.

1.5 Die Enigma-Proteinfamilie

Enigma, auch als PDLIM7 (*PDZ and LIM domain protein 7*) oder LMP (*Lim Mineralization Protein*) bezeichnet, ist hauptsächlich als ein mit dem Zytoskelett assoziiertes Adapterprotein beschrieben und zeigt eine hohe Expression im Skelettmuskel. Es wurde 1994 zum ersten Mal mit Hilfe eines Hefe-2-Hybrid Systems als Interaktionspartner des Insulinrezeptors beschrieben (Wu und Gill, 1994). In Säugetieren sind insgesamt zehn Proteine, die sowohl eine PDZ-Domäne als auch eine oder mehrere LIM-Domänen besitzen, bekannt. Zusammen mit den Proteinen ENH (*Enigma Homolog*) und ZASP (*Z-band alternatively Spliced PDZ-motif Protein*) bildet Enigma die Enigma-Proteinfamilie, die durch das Vorhandensein einer PDZ-Domäne und drei LIM-Domänen gekennzeichnet ist (te Velthuis und Bagowski, 2007). Enigma und ENH weisen eine Homologie von 69 % in der PDZ-Domäne und 51 % (LIM1), 59 % (LIM2) bzw. 70 % (LIM3) in den LIM-Domänen auf (Guy et al., 1999). Daher kann angenommen werden, dass diese Proteine eine unterschiedliche Lokalisation bzw. unterschiedliche Funktionen aufweisen. Die Mitglieder der Enigma-Proteinfamilie wurden mit verschiedenen Krankheitsbildern assoziiert. In früheren Arbeiten wurde eine erhöhte Expression von ENH im Gehirn mit Schizophrenie, bipolarer Störung und Depression in Verbindung gebracht (Horiuchi et al., 2013, Horiuchi et al., 2006, Kato et al., 2005). Mutationen im ZASP-Gen sind im Zusammenhang mit Kardiomyopathie (Arimura et al., 2004, Vatta et al., 2003) und Muskeldystrophie (Selcen und Engel, 2005) beschrieben. Krcmery et al. (2013) zeigten, dass Enigma (-/-)-Mäuse an Herzfehler und Blutgerinnungsstörungen leiden.

Im menschlichen Genom liegt das Enigma-Gen auf dem Chromosom 5 (5q35.3) und umfasst 14 kbp, die für 15 Exons kodieren. Bisher sind beim Menschen sechs Isoformen bekannt, die durch alternatives Splicen gebildet werden (UniProtKB ID: Q9NR12). Das Volllängenprotein besteht aus 457 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von ca. 50 kDa. Die anderen humanen Isoformen, außer Isoform 2, sind deutlich kürzer und besitzen keine LIM-Domänen. Die PDZ-Domäne befindet sich am N-Terminus und ist 85 Aminosäuren lang (Abb. 1.5A). Benannt wurde sie nach den Proteinen PSD95, Discs large und Zonula occludentes-1, in denen diese Domäne zuerst entdeckt wurde. PDZ-Domänen sind Proteininteraktionsdomänen, die meist an kurze Peptide am carboxyterminalen Ende der Zielproteine binden (Lee und Zheng, 2010). Auch Interaktionen zwischen PDZ-Domänen zweier Proteine sind möglich. Viele Gerüstproteine, die Proteinkomplexe an spezifischen zellulären Strukturen ausbilden, enthalten solche Domänen (Ranganathan und Ross, 1997). Beispielsweise bildet in den Photorezeptoren von *Drosophila* das Gerüstprotein INAD (Inactivation No Afterpotential D) mit seinen fünf PDZ-Domänen einen Komplex mit mehreren Signalkomponenten und organisiert somit die Signalweiterleitung an Licht-aktivierten Kanälen. Dabei ist INAD auch für die richtige intrazelluläre Lokalisation dieses

Komplexes wichtig (Tsunoda et al., 2001). Auch das an der Namensgebung der PDZ-Domänen beteiligte Gerüstprotein PSD-95 nimmt eine wichtige Rolle in der Organisation eines Signalkomplexes in Synapsen ein (Chen et al., 2011). Es wird zu der MAGUK-Proteinfamilie (*Membrane-Associated Guanylat-Kinase*) gezählt. Neben den drei PDZ-Domänen besitzt PSD-95 außerdem eine SH3-Domäne sowie die Guanylatkinase-Domäne, die jedoch keine enzymatische Aktivität besitzt, sondern ebenfalls als Protein-Interaktionsdomäne fungiert (Fan und Zhang, 2002). Am C-Terminus von Enigma befinden sich die drei LIM-Domänen (Abb. 1.6A). Wie auch bei der PDZ-Domäne steht LIM für die Proteine, in denen die Domäne erstmals beschrieben wurde (**L**in11, **I**sl-1 und **M**ec-3). LIM-Domänen vermitteln ebenfalls Interaktionen zwischen Proteinen und kommen in Proteinen mit unterschiedlichsten Funktionen, wie Kinasen, Transkriptionsregulatoren oder Adapterproteinen vor. Einige Proteine, welche eine oder mehrere LIM-Domänen enthalten, sind mit dem Zytoskelett assoziiert und an intrazellulären Signaltransduktionen beteiligt (Khurana et al., 2002). Jede der drei LIM-Domänen im Enigma-Protein besteht aus einer 59 bzw. 60 Aminosäuren langen Cystein und Histidin reichen Sequenz mit zwei koordiniert gebundenen Zinkatomen. Diese bildet zwei Zink-Finger Strukturen, die über einen hydrophoben Linker aus zwei Aminosäuren verbunden sind, aus (Bach, 2000) (Abb. 1.6B). Zink-Finger-Motive sind DNA-bindende Strukturen (Klug und Schwabe, 1995, Clemens et al., 1993, Klug und Rhodes, 1987). Für Enigma ist bisher jedoch keine solche Funktion bekannt.

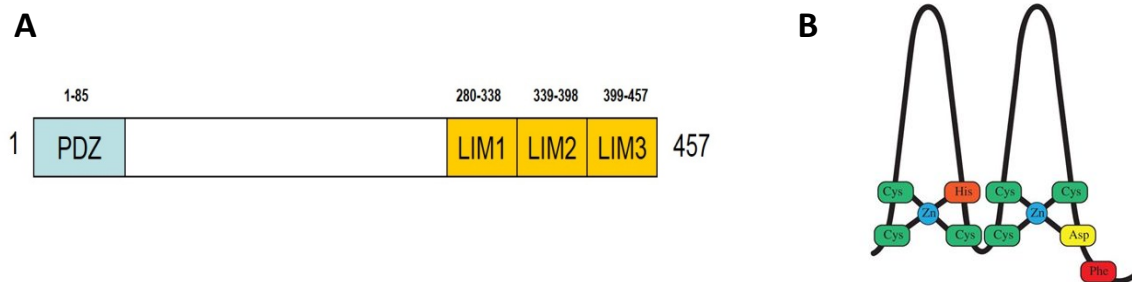


Abbildung 1.6: Die Struktur von Enigma und einer LIM-Domäne

(A) Enigma ist ein 457 Aminosäuren langes Multidomänenprotein. Aminoterminale befindet sich eine PDZ-Domäne. Carboxyterminale besitzt Enigma drei LIM-Domänen. (B) Schematische Darstellung der Zinkfingerstruktur einer LIM-Domäne (aus Chambers und Rabbits, 2015)

1.6 Bekannte Funktionen von Enigma

Eine generelle Funktion von Enigma in Zellen konnte bisher nicht beschrieben werden. Vielmehr scheint es, als ob dieses Protein verschiedene und teils zelltypspezifische Funktionen besitzt. Wie bereits erwähnt, sind viele der PDZ-LIM Proteine mit dem Zytoskelett

assoziiert. Auch für Enigma ist dies der Fall. Über eine Interaktion mit β -Tropomyosin ist es mit Aktinfilamenten assoziiert. Die Interaktion erfolgt dabei über die PDZ-Domäne, welche an eine Sequenz am carboxyterminalen Ende von β -Tropomyosin bindet (Guy et al., 1999). Die Autoren beschreiben allerdings keine direkte Funktion dieser Interaktion, spekulieren jedoch, dass Enigma hierbei als Adapterprotein fungiert, wodurch weitere LIM-bindende Proteine am Aktinzytoskelett lokalisiert werden.

Weiterhin sind Interaktionen mit zwei RTKs beschrieben. Die im Hinblick auf den Insulinsignalweg interessanteste Entdeckung ist die von Wu und Gill 1994 beschriebene Interaktion mit dem Insulinrezeptor. Auf der Suche nach Interaktionspartnern des Exon 16 des Insulinrezeptors, entdeckten sie mittels Hefe-2-Hybrid-Systemen und GST-Pulldown-Experimenten das damals noch unbekanntes Enigma-Protein. Exon 16 befindet sich in der Juxtamembran-Domäne und beinhaltet die zwei Motive NPEY und GPLY, welche nach Aktivierung des Rezeptors an den Tyrosinresten phosphoryliert vorliegen und sogenannte „*tyrosine containing tight turn motifs*“ ausbilden. Enigma interagiert mit diesen beiden Motiven und nimmt dadurch eine Rolle bei der Rezeptorinternalisierung ein. Erstaunlicherweise wurde diese interessante Interaktion jedoch seither nicht durch weiterführende Experimente bestätigt oder von anderen Gruppen reproduziert. Ob diese Interaktion auch *in vivo* oder in einem zellulären System stattfindet ist daher unklar. Der RET (*rearranged during transfection*)-Rezeptor ist eine weitere Rezeptortyrosinkinase, die als Interaktionspartner von Enigma beschrieben ist. Auch diese Interaktion wurde von Wu et al. (1996) erstmals gezeigt. Sie konnten außerdem zeigen, dass das wachstumsfördernde Signal dieses Rezeptors von einer Assoziation mit Enigma abhängig ist (Durick et al., 1996). In weiterführenden Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Enigma dabei an eine Sequenz um Tyr586 des RET-Rezeptors bindet (Durick et al., 1998). Interessanterweise bindet auch SHC an diese Stelle. Borrello et al. (2002) entdeckten später, dass Enigma hauptsächlich mit der kurzen Isoform des RET-Rezeptors interagiert. Diese Arbeiten deuten auf eine Rolle von Enigma in Signaltransduktionen via RTKs hin.

Eine weitere Arbeit bringt Enigma mit der insulin-induzierten GLUT4-Translokation in 3T3-L1 Adipozyten in Zusammenhang (Barrès et al., 2006). Enigma hat hier, durch Interaktion mit APS (*Adaptor protein with PH and SH2 domains*), einen inhibitorischen Effekt auf die Translokation des Glukosetransporters nach Insulinstimulation. Verantwortlich dafür ist eine durch den APS-Enigma-Komplex ausgelöste Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts (Barrès et al., 2005). Eine Mutation der Bindestelle im APS-Protein führte zu einer erhöhten GLUT4-Translokation, während die Überexpression von Enigma den gegenteiligen Effekt hatte. Eine Studie zur Expression von Enigma im Fettgewebe zeigte außerdem, dass Enigma bei

übergewichtigen Diabetikern um das ca. 5-fache überexprimiert ist (Barrès et al., 2006). Allerdings war die Anzahl der Patienten für diese Studie (n=7) eher klein und die statistische Aussagekraft somit relativ gering.

Weitere Hefe-2-Hybrid-Screenings führten zur Entdeckung von ENH und Enigma als neue Interaktionspartner einiger klassischer PKCs (Kuroda et al., 1996). Für alle drei LIM-Domänen von Enigma konnte solch eine Interaktion gezeigt werden. ENH und Enigma wiesen außerdem unterschiedliche Spezifitäten gegenüber den einzelnen PKC-Isoformen auf. Auswirkungen dieser Interaktionen auf zelluläre Prozesse wurden jedoch nicht weiter untersucht.

Eine 2010 erschienene Publikation zeigte, dass Enigma auch die Apoptose über p53 regulieren kann (Jung et al., 2010). Das Tumorsuppressorprotein p53 wird oft auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet, da es als Transkriptionsfaktor eine Reihe von Genen reguliert, die an der Induktion von Apoptose und der Zellzykluskontrolle beteiligt sind (Harris, 1996). In vielen Tumorzellen konnte eine Mutation des p53-Gens nachgewiesen werden, wodurch diese eine erhöhte Proliferation aufweisen und dem programmierten Zelltod entgehen (Rivlin et al., 2011). Wie bereits in Kapitel 1.3.2. erwähnt, ist die E3-Ubiquitin Ligase Mdm2 ein wichtiger negativer Regulator von p53. Für Enigma konnte gezeigt werden, dass es mit Mdm2 interagiert und dadurch eine Selbstubiquitinierung verhindert, was wiederum zu einer Stabilisierung dieser Ubiquitin-Ligase führt. Das hat eine erhöhte Ubiquitinierung und proteasomalen Abbau von p53 zur Folge. Die meisten E3 Ligasen besitzen eine RING Domäne, über die sie an Thioester-Bindungen in E2 Ubiquitin-Carrier binden und dadurch den Transfer von Ubiquitin bewirken (Deshaies und Joazeiro, 2009). Die Autoren vermuten, dass die Interaktion mit Enigma an dieser RING Domäne stattfindet, und dass dies die Selbst-Ubiquitinierung von Mdm2 inhibiert.

Weitere Arbeiten bringen Enigma mit der Knochenbildung in Zusammenhang. Dabei zeigte sich, dass eine Überexpression von Enigma einen positiven Effekt auf die Differenzierung von Osteoblasten hat. Enigma-Überexpression führt in diesen Zellen zu einer erhöhten Expression verschiedener *Bone Morphogenetic Proteins* (BMPs) (Minamide et al., 2003). BMPs sind Zytokine, die an spezifische Rezeptoren (BMPRs) auf der Zelloberfläche binden und intrazelluläre Signalwege über SMAD-Proteine aktivieren. Die BMPs werden daher zur *Transforming-Growth-Factor-beta* (TGF- β) Familie gezählt (Chen et al., 2004). Jedoch scheint Enigma die Knochenbildung nicht allein durch die Expression von BMPs zu beeinflussen. Auch eine Inhibierung der E3-Ligase Smurf1 (Smad ubiquitin regulatory factor 1) durch Enigma ist beschrieben, wodurch der Abbau von SMADs verhindert und die Funktion der BMPs verstärkt wird (Sangadala et al., 2006). Eine erst kürzlich erschienene Publikation beschreibt, dass der Effekt von Enigma auf die Expression und Funktion von

Einleitung

BMP-2 durch eine Aktivierung der MAPKs Erk1/2 vermittelt wird (Pan et al., 2015). Schon Liu et al. (2010) beschrieben eine Regulation verschiedener MAPK-Signalwege durch Enigma in RAW 264.7 Prä-Osteoklasten. Außerdem scheint eine Interaktion mit dem Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-6 an der Differenzierung von Osteoblasten beteiligt zu sein (Strohbach et al., 2008).

Zusammenfassend zeigen die verfügbaren Publikationen, dass Enigma über die PDZ-Domäne bzw. den LIM-Domänen mit verschiedenen Proteinen interagiert. Viele dieser Interaktionen bzw. deren Auswirkungen wurden jedoch nicht weiter untersucht. Ein direkter Effekt auf zelluläre Prozesse ist somit bislang meist nicht bekannt.

Zielstellung

Enigma ist ein Multidomänenprotein mit vier beschriebenen Proteininteraktionsdomänen (1 PDZ, 3 LIM). Einige, meist unabhängige, Funktionen bzw. Interaktionen sind bekannt. Eine eindeutige zelluläre Funktion konnte jedoch noch nicht identifiziert werden.

Bisherige Arbeiten lassen eine Rolle von Enigma im Insulinsignalweg, und daher möglicherweise auch im Hinblick auf Typ-2-Diabetes, vermuten. Bei der Entdeckung im Jahr 1994 wurde Enigma als Interaktionspartner des Insulinrezeptors beschrieben (Wu und Gill, 1994). Weiterhin ist ein Zusammenhang mit der Insulin-induzierten GLUT4-Translokation bekannt. Auch eine erhöhte Expression im Fettgewebe übergewichtiger Typ-2-Diabetes Patienten wurde festgestellt (Barrès et al., 2006, 2005). Trotz dieser Eigenschaften sind keine Informationen über einen möglichen Einfluss auf den Insulinsignalweg vorhanden.

Daher sollten in dieser Arbeit die Auswirkungen einer veränderten Expression von Enigma auf die Insulinsignalwege untersucht werden. Da der Skelettmuskel eines der wichtigsten Zielgewebe des Insulins ist, wurde dazu die Skelettmuskelvorläufer-Zelllinie C2C12 gewählt. Es sollten stabile Zelllinien mit Überexpression und shRNA-Knockdown von Enigma hergestellt werden und der Einfluss auf wichtige Komponenten der Insulinsignalwege mit Hilfe von Protein- und Phosphopeptid-spezifischen Antikörpern in Western-Blot Analysen untersucht werden. In weiterführenden Experimenten sollten zudem mögliche Effekte auf verschiedene Endpunkte dieser Signalwege, wie Zellüberleben, Proliferation und Differenzierungsfähigkeit, beschrieben werden.

Zudem war es von Interesse, anhand von verfügbaren Patientendaten aus der humanen TÜF-Studie, eventuelle Auswirkungen von Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) im Enigma-Gen auf wichtige Parameter im Hinblick auf Typ-2-Diabetes zu untersuchen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräteliste

AxioObserver Z1	Zeiss, Jena, Deutschland
Axiovert 25 Mikroskop	Zeiss, Jena, Deutschland
Laser Scan Mikroskop	Leica Microsystems, Wetzlar
Light Cycler 480	Roche, Mannheim, Deutschland
Veriti 96well Thermal Cycler	Applied Biosystems, Waltham, USA
BioMate 3 Spektrophotometer	Thermo Scientific, Waltham, USA
SPECTRA III ELISA Reader	Tecan, Männedorf, Schweiz
NanoDrop 2000	Thermo Scientific, Waltham, USA

2.1.2 Chemikalien und Substanzen

Soweit nicht anderweitig aufgeführt, wurden alle Chemikalien und Verbrauchsmaterialien von den Firmen Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Steinheim), Merck (Darmstadt) oder Fluka (Neu-Ulm) in p.a.-Qualität bezogen.

Bradford-Reagenz	Bio-Rad
Cex-Marker (DNA-Größenmarker)	AG Lammers
Dapi (4',6-Diamidin-2'-Phenylindol-Dihydrochlorid)	Invitrogen
Pierce ECL WB Substrate	Thermo Scientific
Insulin (Humulin)	Eli Lilly
Nitrocellulose Hybond ECL (0,45 mm)	Amersham
Oligo(dT) Primer	TIB MolBiol
Random Hexamer Primer	Roche
Parafilm	Bemis
Protein G-Sepharose 4B	Invitrogen
Restriktionsenzyme	New England Biolabs

Substanzen:

Substanz	Funktion	eingesetzte Konzentration	Bezugsquelle
PD98059	MEK1-Inhibitor	50 µM	Enzo Life Science
NSC23766	Rac1-Inhibitor	100 µM	Tocris
LY294002	PI3K-Inhibitor	20 – 40 µM	Sigma-Aldrich
Puromycin	Selektion der stabilen Transfektionen	10 µg/ml	InvivoGen
G418 (Geneticin)	Selektion der stabilen Transfektionen	1 mg/ml	Sigma-Aldrich

2.1.1. Kommerzielle Kits

LC480 Probes Master	Roche, Mannheim, Deutschland
First strand cDNA-Synthesekit	Roche, Mannheim, Deutschland
In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein	Roche, Mannheim, Deutschland
Cell Proliferation ELISA, BrdU, colorimetric	Roche, Mannheim, Deutschland
Plasmid Plus Midi Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
QIAshredder	Qiagen, Venlo, Niederlande

2.1.2. Oligonukleotide für die quantitative *real time* PCR

Primer	Sequenz 5` - 3`
Myf5 up	CTGCTCTGAGCCCACCAG
Myf5 down	GACAGGGCTGTTACATTCAGG
MyH4 up	GCAGCTCCAGGTTCAAGC
MyH4 down	TGGATTTTGGTTTTGATCAGC
MYOG up	CTACAGGCCTTGCTCAGCTC

MYOG down	CGCTGTGGGAGTTGCATT
p21 up p21 down	TCCACAGCGATATCCAGACA GGCACACTTTGCTCCTGTG
PPARGC1a up PPARGC1a down	CAGTCGCAACATGCTCAAG TGGGGTCATTTGGTGACTCT
Rps13 up Rps13 down	TGCTCCCACCTAATTGGAAA CTTGTGCACACAACAGCATTT
SOD2 up SOD2 down	GACCCATTGCAAGGAACAA GTAGTAAGCGTGCTCCCACAC
TFAM up TFAM down	AGACCTCGTTCAGCATATAACATTT AGCCTCATTTACAAGCTTCAATTT
UCP2 up UCP2 down	ACAGCCTTCTGCACTCCTG GGCTGGGAGACGAAACACT
NRF1 up NRF1 down	GCAGACACGTTTGCTTCG GGTGAGATGCAGAGTACAATCG
CPT1b up CPT1b down	GCCCATGTGCTCCTACCA CTCTGAGAGGTGCTGTAGCAAG
PPAR delta up PPAR delta down	ATGGGGGACAGAACACAC GGAGGAATTCTGGGAGAGGT

2.1.3. *E. coli* Stämme

Name	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> 298 F'	F+, <i>kanr</i> , <i>1r</i> , <i>recA</i> -, <i>tonA</i> -, <i>LacI</i> -; aus MM 294	Genentech (San Francisco, US)
<i>E. coli</i> DH5α	F-, <i>o80dlacZΔM15</i> , $\Delta(lacZYA-argF)U169$, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , <i>1</i> -, <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	New England Biolabs (Schwalbach/Taunus)

2.1.4. Expressionsvektoren

Plasmidname	Eigenschaften	Referenz
pRKrs-Enigma	Expressionsvektor für humanes Enigma	AG Lammers
pRK-IR	Expressionsvektor für humanen Insulin Rezeptor	AG Lammers
pCMV6-Raf1	Expressionsvektor für humanes Raf1	Origene
pCMV6-Grb2	Expressionsvektor für humanes Grb2	Origene
pCMV6-Shc1	Expressionsvektor für humanes Shc1	Origene

2.1.5. Plasmidvektor für RNA-Interferenz

Für den shRNA-vermittelten Knockdown von murinem Enigma wurde ein pLKO1-Vektor gewählt. Fünf Konstrukte, welche jeweils für eine unterschiedliche shRNA-Sequenz codieren, wurden verwendet um eine möglichst hohe Knockdown-Effizienz zu erreichen. Alle fünf shRNAs sind dabei gegen Bereiche der Protein-codierenden Sequenz gerichtet. Die shRNA-Konstrukte wurden, kloniert in den Expressionsvektor pLKO.1-puro, von Sigma Aldrich in Form von bakteriellen Glycerinstocks kommerziell erworben. Diese Glycerinstocks wurden nach Erhalt kultiviert um das Expressionsplasmid in ausreichenden Mengen isolieren zu können. Die Sequenzen, die für die shRNAs codieren, sind in der Tabelle aufgeführt.

Sequenz	Region	Expressionsvektor
CCGGGGAGACTGGGTAATATTCTCGAGAATA TTCAGTACCCAGTCTCCTTTTTG	CDS	pLKO1-puro
CCGGAGCTACAGAGCCCACGCTATACTCGAGTATA GCGTGGGCTCTGTAGCTTTTTTG	CDS	pLKO1-puro
CCGGCTGATGGAGGATACCGAAGACCTCGAGGTC TTCGGTATCCTCCATCAGTTTTTG	CDS	pLKO1-puro
CCGGCAGACCTCTGACAAACAGTTGCTCGAGCAAC TGTTTGTCAGAGGTCTGTTTTTTG	CDS	pLKO1-puro
CCGGGCAGACCTCTGACAAACAGTTCTCGAGAACT GTTTGTCAGAGGTCTGCTTTTTTG	CDS	pLKO1-puro

2.1.6. Zelllinien

Hek293	Humane embryonale Nierenzellen, die mit den Adenovirus Genen E1A und E1B transfiziert sind	ATCC CRL-1573 (Graham et al., 1977)
C2C12	Maus-Myoblasten	ATCC, CRL-1772 (Yaffe et al., 1977)
C2C12 ÜE	Maus-Myoblasten, die Enigma stabil überexprimieren	diese Arbeit
C2C12 KD	Maus-Myoblasten mit einem stabilen Enigma-Knockdown	diese Arbeit
C2C12 pSV2Neo	Maus-Myoblasten stabil mit dem Selektionsplasmid pSV2Neo transfiziert als Leervektorkontrolle	diese Arbeit
C2C12 pLKO1-puro	Maus-Myoblasten stabil mit dem Expressionsplasmid pLKO1 transfiziert als Leervektorkontrolle	diese Arbeit

2.1.7. Antikörper

Primärantikörper

Antikörper	Polyklonal / Monoklonal	Form des Immunogens	Referenz- nummer	Bezugsquell e	eingesetzt e Verdünnun g
Enigma	polyklonal	Peptid AS 184-293	sc-98370	Santa Cruz	1:1000
Enigma	monoklonal	Volllängen- protein	H000092 60-M01	Abnova	1:1000
Enigma	polyklonal	Peptid AS 125-175	ab86065	Abcam	0,5µg/IP
MYH2	monoklonal	Volllängen- protein	sc-53095	Santa Cruz	1:1000
p-p70 S6K (T389)	monoklonal	Phosphopepti d	#9206	Cell Signaling	1:1000
p-c-Jun (S63)	polyklonal	Phosphopepti d	#9261S	Cell Signaling	1:1000
p-p38 MAPK (T180/Y182)	polyklonal	Phosphopepti d	#9211	Cell Signaling	1:1000
p-GSK3α/β (S21/9)	polyklonal	Phosphopepti d	#9331	Cell Signaling	1:1000
Anti-IRS-1	polyklonal	Peptid AS YASINFQKQP EDRQ	#06-248	Millipore/Ups tate	1:1000
JNK	polyklonal	Volllängen- protein	#9252	Cell Signaling	1:1000
p-JNK (T183/Y185)	monoklonal	Phosphopepti d	#9255L	Cell Signaling	1:1000
p-MKK7 (S271/T275)	polyklonal	Phosphopepti d	#4171S	Cell Signaling	1:500
p-MKK4	polyklonal	Phosphopepti	#9156S	Cell	1:1000

Material und Methoden

(S257/T261)		d			Signaling	
p-Akt (T308)	polyklonal	Phosphopeptid	#9275L	Cell	Signaling	1:1000
p-p44/42 MAPK (Erk1/2)	monoklonal	Phosphopeptid	#9106	Cell	Signaling	1:1000
p44/42 MAPK (Erk1/2)	polyklonal	Peptid (C-terminal)	#9102	Cell	Signaling	1:1000
α/β -Tubulin	polyklonal	Peptid	#2148	Cell	Signaling	1:1000
Insulin Rezeptor beta	monoklonal	Peptid um Y999	#3025S	Cell	Signaling	1:1000
p53	polyklonal	Volllängen-Protein	sc-6243	Santa Cruz		1:1000
Insulin Rezeptor 8314	monoklonal			AG Lammers		
p-MEKK1 (T1381)	polyklonal	Phosphopeptid	ab138662	Abcam		1:1000
p-IRS (Y989)	polyklonal	Phosphopeptid	sc-17200	Santa Cruz		1:1000
c-myc	monoklonal	Peptid AS 408-439	13-2500	Invitrogen		1:1000
p-FAK (Y397)	polyklonal	Phosphopeptid	#3283	Cell	Signaling	1:1000

Sekundärantikörper

Antikörper	Referenznummer	Bezugsquelle	eingesetzte Verdünnung
goat-anti-rabbit IgG-HRP	sc-2004	Santa Cruz	1:5000
goat-anti-mouse IgG-HRP	sc-2005	Santa Cruz	1:5000
donkey-anti-goat IgG-HRP	sc-2020	Santa Cruz	1:5000
Alexa Fluor 488 goat-anti-rabbit	A11008	Life Technologies	1:400

2.1.10. Software

ImageJ

Wayne Rasband

JMP 11

SAS Institute, USA

Microsoft Office 2010

Microsoft Corp., Redmond, USA

2.2. Lösungen, Puffer und Medien

2.2.1. Molekularbiologie

6x DNA-Ladepuffer	0,05 % (w/v)	Bromphenolblau
	0,05 % (w/v)	Xylencyanol
	30 % (v/v)	Glycerin
	100 mM	EDTA (pH 8)
10x TAE	400 mM	Tris-Acetat (pH 8)
	50 mM	Natriumacetat
	10 mM	EDTA
1x TE	10 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	0,1 mM	EDTA

2.2.2. Kulturmedien für Bakterien

LB-Medium	1 % (w/v)	Trypton
	0,5 % (w/v)	Hefeextrakt
	1 % (w/v)	NaCl
	pH 7,2 (HCl)	
LB-Nährböden	LB-Medium + 1,5 % Agar	
Antibiotikakonzentrationen	100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin	
KCM	0,5 M	KCl
	0,15 M	CaCl ₂
	0,25 M	MgCl ₂

Material und Methoden

TSB	LB-Medium	
	10 % (v/v)	PEG 3350
	5 % (v/v)	DMSO
	10 mM	MgCl ₂
	10 mM	MgSO ₄

2.2.3. Zellkulturmedien

Zellkulturmedium (Hek293 und C2C12)	Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (DMEM) 4,5 g/l Glukose, 2 mM L-Glutamin Lonza (Basel)
Differenzierungsmedium (C2C12)	DMEM, 4,5 g/l Glukose, 2 mM L-Glutamin + 0,5 % FCS
Medienzusätze	L-Glutamin (Lonza) 10 % oder 0,5 % (v/v) FCS (Thermo Fisher) G418 (1 mg/ml) Puromycin (10 µg/ml)
Trypsin/EDTA	200 mg/l EDTA 500 mg/l Trypsin (Lonza)
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	154 mM NaCl 5,5 mM Na ₂ HPO ₄ 1 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,5 (Lonza)
Einfriermedium	FCS 10 % DMSO

2.2.4. Transfektionslösung

2x BBS Puffer	50 mM	BES (pH 6,96)
	280 mM	NaCl
	1,5 mM	Na ₂ HPO ₄

2.2.5. Proteinbiochemie

Lysepuffer	10% (v/v)	Glycerin
	1 % (v/v)	Triton X-100
	50 mM	Hepes, pH 7,5
	1,5 mM	MgCl ₂
	150 mM	NaCl
	1 mM	EGTA
	100 mM	NaF
	10 mM	Na ₄ P ₂ O ₇
	frisch zugeben:	
	1 mM	Na ₃ VO ₄
	1 mM	PMSF
	10 µg/ml	Aprotinin
HNTG	20 mM	Hepes (pH 7,5)
	150 mM	NaCl
	0,1% (v/v)	Triton X-100
	10 %	Glycerin
	10 mM	NaF
	1 mM	Na ₃ VO ₄

Material und Methoden

3x Lämmli Puffer	3 % (w/v)	SDS
	3 % (v/v)	β-Mercaptoethanol
	10 mM	EDTA (pH 8)
	20 % (v/v)	Glycerin
	0,05 % (w/v)	Bromphenolblau
10x Tris-Glycin (TG)	248 mM	Tris
	1918 mM	Glycin
	35 mM	SDS
Upper Tris (4x)	0,5 M	Tris Base (pH 6,8)
	0,4 % (w/v)	SDS
Lower Tris (4x)	1,5 M	Tris Base (pH 8,8)
	0,4 % (w/v)	SDS
Rotiphorese 30 Gelmix	29,22 % (w/v)	Acrylamid
	0,78 % (w/v)	Bisacrylamid
Sammelgel (4%)	13,3 % (v/v)	Rotiphorese 30 Gelmix
	25 % (v/v)	Upper Tris (4x)
	61,7 % (v/v)	H ₂ O
	0,17 % (v/v)	TEMED (Tetramethylethyldiamin)
	1 % (v/v)	APS (10%)
Trenngel (8%)	26,5 % (v/v)	Rotiphorese 30 Gelmix
	25 % (v/v)	Lower Tris (4x)
	48,5 % (v/v)	H ₂ O
	0,17 % (v/v)	TEMED

Material und Methoden

	0,68 % (v/v)	APS (10%)
Trenngel (10%)	33,25 % (v/v)	Rotiphorese 30 Gelmix
	25 % (v/v)	Lower Tris (4x)
	41,5 % (v/v)	H ₂ O
	0,17 % (v/v)	TEMED
	0,68 % (v/v)	APS (10%)
Trenngel (12%)	40 % (v/v)	Rotiphorese 30 Gelmix
	25 % (v/v)	Lower Tris (4x)
	35 % (v/v)	H ₂ O
	0,17 % (v/v)	TEMED
	0,68 % (v/v)	APS (10%)
Transblot Puffer	48 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	39 mM	Glycin
	20 % (v/v)	Methanol
	0,004 % (w/v)	SDS
Ponceau-S Färbelösung	0,2 %	Ponceau-S
	2%	Trichloressigsäure
NET (10x)	1,5 M	NaCl
	50 mM	EDTA (pH 8)
	0,5 M	Tris-HCl (pH 7,5)
	0,5 % (v/v)	Triton X-100
NET-Gelatine	1x NET	

Material und Methoden

	0,25 % (w/v)	Gelatine
Mowiol	16,6% (w/v)	Mowiol (Polyvinylalkohol)
	66% (v/v)	100 mM Tris pH = 8,0
	33% (v/v)	Glycerin

2.3. Methoden

2.3.1. Molekularbiologische Methoden

2.3.1.1. Transformation von Bakterien mit Plasmiden

Um ausreichende Mengen der kommerziell erworbenen Plasmide für die Experimente zu erhalten, war eine Transformation kompetenter Bakterien mit diesen Plasmiden erforderlich. Bei einer Transformation wird DNA in lebende Bakterien eingeführt. In dieser Arbeit wurden Plasmide in kompetente DH5 α *E.coli*-Stämme eingebracht. Die Herstellung der kompetenten Bakterien erfolgte nach der Methode von Chung und Miller (Chung and Miller 1988). Hierfür wurden die Bakterien ca. 2-4 h bis zur logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600} = 0,3 - 0,5$) bei 37 °C in LB-Medium kultiviert. Anschließend wurde die Kultur abzentrifugiert und sofort in eiskaltem TSB resuspendiert. Die aliquotierten Bakterien (110 μ l) wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur Verwendung gelagert. Für die Transformation wurden die kompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut und 100 μ l kompetente Bakterien mit einem Gemisch aus 10 ng Plasmid-DNA, 20 μ l KCM und 80 μ l H₂O versetzt. Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis folgte ein Hitzeschock für 40 s bei 42 °C und eine erneute Inkubation auf Eis für 1 min. Anschließend wurden 800 μ l LB-Medium zugegeben und für 50 min bei 37 °C inkubiert. Die Transformationen wurden dann auf entsprechenden antibiotikahaltigen Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Kolonien wurden in 50 ml antibiotikahaltigem LB-Medium aufgenommen und über Nacht auf dem Schüttler (150 rpm) bei 37 °C kultiviert, bevor die Bakterien lysiert und die Plasmid-DNA aufgereinigt wurde.

2.3.1.2. Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien, Konzentrationsbestimmung und Restriktionsverdau

Für die Präparation der Plasmid-DNA wurde das Plasmid Plus Midi-Kit von Qiagen verwendet. Dazu wurden die transformierten Bakterienkulturen aus 2.3.1.1. für 15 min bei

6000 g und 4 °C abzentrifugiert, in einem Tris-EDTA-Puffer resuspendiert und mit einer Lösung aus 0,2 M SDS und 1 % NaOH lysiert. Diese Lösung wurde neutralisiert und anschließend filtriert (Qiafilter Cartridge) um die Plasmid-DNA von genomischer DNA und Proteinen zu trennen. Die Plasmid-DNA wurde dann an eine Silikamatrixsäule gebunden, gewaschen und mit TE oder H₂O eluiert. Die Konzentration der gewonnenen DNA wurde in einem Photometer bestimmt. Dazu wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm gemessen. DNA und RNA absorbieren Licht bei 260 nm während mögliche Kontaminationen wie Proteine ihr Absorptionsmaximum bei 280 nm haben. Der Quotient aus beiden Messwerten (OD_{260}/OD_{280}) gibt daher Aufschluss über die Qualität der aufgereinigten DNA und sollte zwischen 1,8 und 2 liegen. Die Konzentration kann aus dem Messwert bei 260 nm errechnet werden: Messwert x Verdünnung x 50 µg/ml [1 OD = 50 µg/ml]. Die Identität des Plasmids wurde zudem mit einem Restriktionsverdau kontrolliert.

2.3.1.3 Auftrennung von DNA mittels Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden über horizontale Gelelektrophorese aufgetrennt. Hierzu wurden 0,9 %ige Agarosegele verwendet. Entsprechende Mengen Agarose wurden in 1x TAE-Puffer aufgekocht und 0,1 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben. Das flüssige Gel wurde in eine Kammer gegossen und mit einem Kamm für die Probenaschen versehen. Das erhärtete Gel wurde in der Elektrophoresekammer mit 1x TAE-Puffer überschichtet und anschließend die mit Ladepuffer versehenen Proben aufgetragen. Bei einer Spannung von ca. 70 V wandert die durch die Phosphatgruppen negativ geladene DNA in Richtung des positiven Pols. Durch die Porenstruktur des Agarosegels werden die DNA-Fragmente dabei ihrer Größe entsprechend aufgetrennt. Als Längenstandard diente der Cex-Marker.

Das Ethidiumbromid interkaliert zwischen den Basenpaaren, wodurch die aufgetrennten DNA-Fragmente unter UV-Licht sichtbar gemacht werden können.

2.3.1.4. RNA-Isolation und Konzentrationsbestimmung

Die RNA aus murinen C2C12 Zellen wurde unter Verwendung des RNeasy Kits von Qiagen isoliert. Dabei wird die RNA spezifisch an eine Silikamatrixsäule gebunden und durch mehrere Waschschriffe von anderen Bestandteilen, wie DNA und Proteinen, gereinigt. Im Anschluss wurde die RNA mit RNase freiem H₂O eluiert und bei -80 °C gelagert. Alle Arbeitsschritte wurden nach Angaben des Herstellerprotokolls durchgeführt. Dem RLT-Lysepuffer des Kits wurde β-Mercaptoethanol in einer Konzentration von 10 µl/ml zugefügt. Die Homogenisierung der Zelllysate erfolgte mittels QIAshredder Säulen. Die Konzentration der isolierten RNA wurde mit Hilfe eines NanoDrop™ 2000 Spektralphotometer bestimmt.

2.3.1.5. Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Bevor die RNA für Genexpressionsanalysen genutzt werden konnte, wurde sie in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Dazu wurde das First Strand cDNA Synthese Kit mit den Random Hexamer Primer verwendet (Roche Diagnostics). Die reverse Transkriptasereaktion wurde in einem Reaktionsvolumen von 20 µl durchgeführt. Hierfür wurden zunächst 1 µg RNA mit PCR-grade H₂O auf 11 µl verdünnt und für 10 min bei 65 °C in einem Thermocycler denaturiert. Der Ansatz wurde dann auf Eis gestellt und 9 µl des Reaktionsmixes (4 µl 5x Puffer, 2 µl dNTPs, 2 µl Random Hexamer Primer, 0,5 µl Transcriptor RT und 0,5 µl RNase Inhibitor) zugegeben. Nach der reversen Transkription wurden die cDNAs auf 100 µl verdünnt und gleich für die qRT-PCR verwendet oder bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert.

Reaktionsmix:

Menge [µl]	Ingredienzien
2	Random Hexamer Primer
2	dNTPs
4	5x Reaktionspuffer
0,5	Reverse Transkriptase
0,5	RNase-Inhibitor

Dauer [min]	Temperatur [°C]
10	25
30	55

2.3.1.6 Quantitative *real time* PCR (qRT-PCR)

Mittels qRT-PCR kann die in einer Probe enthaltene mRNA Menge bestimmt werden. Die Analyse erfolgte hier indirekt anhand der zuvor umgeschriebenen cDNA. Die Quantifizierung der amplifizierten DNA erfolgte mittels Fluoreszenz-gekoppelter Sonden in einem LC480 System von Roche. Die verwendeten Primer und Sonden wurden im Universal Probe Library Assay Design Center gewählt und die Primer bei TIB MolBiol bestellt. Die Sequenzen der verwendeten Primerpaare sind in 2.1.4. aufgeführt. Die Sonden wurden so gewählt, dass sie 3' des up-Primers auf der Zielsequenz binden. Ein Dark Quencher Dye am 3'-Ende der Sonde verhindert ein Signal eines am 5'-Ende gekoppelten Fluorophors. Während der Elongation des Primers während der PCR wird durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase der Fluorophor freigesetzt. Der Farbstoff kann folglich detektiert werden.

Die Farbstoffintensität korreliert dabei mit der synthetisierten Menge an DNA. Übersteigt die Intensität einen Schwellenwert, kann über den CT-Wert (Cycle-Threshold) auf die anfänglich in der Probe vorhandenen cDNA Menge zurückgerechnet werden. Eine Qualitätskontrolle durch die Ermittlung einer Schmelzkurve ist bei dieser Methode nicht notwendig. Die Quantifizierung der mRNA-Expression erfolgte mittels der $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ Methode. Die Genexpressionen wurden auf das Haushaltsgen *rps13* (*ribosomal protein S13*) normalisiert. Als Kontrolle diente je Primerpaar eine Probe mit Wasser. Die qRT-PCR wurde in einem Gesamtvolumen von 20 μ l durchgeführt:

Menge	Ingredienzien
10 μ l	2x Lightcycler Probes Master 480
3,8 μ l	H ₂ O
0,5 μ M	Primer up
0,5 μ M	Primer down
50 ng	cDNA
0,2 μ M	Sonde

PCR-Bedingungen:

Denaturierung:		95 °C; 5 min
(45 Zyklen)	Amplifikation: Denaturierung	95 °C; 10 s
	Hybridisierung	60 °C; 30 s (bei allen Primerpaaren gleich)
	Elongation	72 °C; 1 s

2.3.2 Zellkulturtechniken

2.3.2.1. Allgemeine Zellkulturtechniken

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in Sterilbänken durchgeführt. Die Zellen wurden in Zellkulturmedium bei 37 °C in einem CO₂-Inkubator (7 % CO₂) kultiviert. Vor Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mittels Trypsin von der Kulturschale gelöst. Die abgelösten Zellen wurden in frisches Kulturmedium aufgenommen und ein Teil der Zellen für die Weiterführung der Kultur verwendet (1:10 verdünnt). Für die einzelnen Versuche wurden die Zellen vor dem Aussäen in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die spezifischen Zellzahlen für die einzelnen Experimente sind in den

entsprechenden Abschnitten angegeben. Für Stimulationsversuche mit Insulin wurden die Zellen zuvor über Nacht auf 0,5 % FCS im Zellkulturmedium (sog. Hungermedium) gesetzt. Alle Zelllinien wurden in regelmäßigen Abständen auf eine Kontamination mit Mykoplasmen untersucht. Dazu wurden mykoplasmenfreie Zellen auf Glasplättchen ausplattiert. Wenn die Zellen auf dem Glasplättchen angewachsen waren, wurden sie mit dem Kulturüberstand der zu untersuchenden Zelllinie für weitere 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf den Glasplättchen mit Methanol für 20 min bei -20 °C fixiert, mit PBS gewaschen und mindestens 20 min mit DAPI (1 µg/ml in PBS) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurden die Glasplättchen mit Permafluor auf einem Objektträger fixiert. Mit einem Fluoreszenzmikroskop können Mykoplasmen anhand der Färbung ihrer DNA als verstreute Punkte im Zytoplasma der Zellen identifiziert werden.

2.3.2.2. Transfektion von Säugerzellen

Um Säugerzellen zu transfizieren gibt es mehrere Möglichkeiten. DNA kann dabei mechanisch oder durch Elektroporation in die Zellen gebracht werden, oder die DNA wird in Form von Präzipitaten oder Lipidvesikeln phagozytotisch von den Zellen aufgenommen. In dieser Arbeit wurden die Zellen mittels der Kalzium-Phosphat-Methode transfiziert (Chen und Okayama, 1987). Dabei bildet sich ein schwerlösliches Präzipitat welches die DNA einschließt und von den Zellen mittels Endozytose aufgenommen wird. Die aufgenommene DNA liegt in den Zellen meist als Transgenom vor und geht im Laufe weniger Tage verloren. Es kommt allerdings auch vor, dass die aufgenommene DNA mittels homologer Rekombination ins Genom der Zelle eingebaut wird. Handelt es sich bei der eingeschleusten DNA um ein Plasmid mit einem Selektionsmarker für eukaryotische Zellen, oder wird ein zweites Plasmid mit Selektionsmarker co-transfiziert, können Zellen, welche die gewünschte DNA stabil ins Genom integriert haben, selektiert werden.

2.3.2.2.1. Generierung stabiler Enigma überexprimierender C2C12 Myoblasten

Für die Generierung der stabilen überexprimierenden Zelllinien dieser Arbeit wurden 7×10^4 Zellen pro 35 mm Schale in 2 ml Medium ausgesät und 24 h später transfiziert. Zu diesem Zweck wurden unter sterilen Bedingungen 86 µl H₂O, 10 µl CaCl₂ (2,5 M), 2 µg pRKrs-Enigma und 0,2 µg pSV2-neo (für die Selektion) gemischt, bevor 100 µl BBS zugegeben wurden. Diese Lösung wurde 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und tropfend in das Kulturmedium der Zellen pipettiert. Die Zellen wurden 15-18 h bei 37 °C und 3 % CO₂ inkubiert, anschließend einmal mit Kulturmedium gewaschen und für ca. 30 h bei 37 °C und 7 % CO₂ weiter inkubiert. In dieser Zeit exprimieren die Zellen das transfizierte Protein und das Selektionsgen. Um einzelne stabil transfizierte Zellen zu selektieren wurden die Zellen

für ca. 2 Wochen mit 1 mg/ml G418 in Zellkulturmedium kultiviert. Einzelne Kolonien wurden isoliert, expandiert und auf Expression getestet.

2.3.2.2.2. Generierung von C2C12 Myoblasten mit stabilem Knockdown von Enigma

Die Generierung der Zellen mit stabilem Knockdown erfolgte ebenfalls mittels Kalzium-Phosphat-Methode. Als Expressionsplasmide für die shRNA-Sequenzen dienten pLKO Plasmide mit den fünf unterschiedlichen shRNA Target-Sequenzen. Ein ausreichender Knockdown konnte nur bei paralleler Transfektion aller shRNA-Konstrukten erreicht werden. Die Transfektion erfolgte analog zu der in 2.3.2.2.1. beschriebenen Methode. Da das pLKO-Expressionsplasmid bereits ein Puromycin-Resistenzgen enthält wurde kein Selektionsplasmid co-transfiziert und die Zellen mittels 10µg/ml Puromycin selektiert. Einzelne Kolonien wurden ebenfalls isoliert, expandiert und auf Expression getestet.

2.3.2.2.3. Transiente Transfektion von Hek293 Zellen

Für die Co-Immunpräzitationsversuche mit Enigma und dem Insulinrezeptor, Grb2, Shc1 bzw. Raf1 wurden Hek293 Zellen mit den entsprechenden Expressionsplasmiden (siehe 2.1.6.) co-transfiziert. Auch hier wurde die Kalzium-Phosphat-Methode verwendet. Dazu wurden 2×10^5 Zellen in einer 35 mm Schale ausgesät. 24 h später erfolgte die Transfektion mit 1-2 µg DNA wie in 2.3.2.2.1. beschrieben. Nach 15-18 h wurden die Zellen mit Kulturmedium gewaschen, das Medium gewechselt und die Zellen für weitere 24 h bei 7 % CO₂ inkubiert, bevor sie lysiert wurden.

2.3.2.3. Einfrieren und Auftauen von Säugerzellen

Durch das Einfrieren können Zelllinien langfristig gelagert werden. Dazu wurden die Zellen mit Trypsin von der Kulturschale abgelöst, in Einfriermedium resuspendiert und in Kryoröhrchen pipettiert. Die Zellen wurden dann für mindestens 48 h bei -80 °C gelagert, bevor sie in den Tank mit flüssigem Stickstoff überführt wurden. So gelagerte Zellen sind über Jahre haltbar.

Um die Zellen wieder in Kultur zu bringen, wurden die Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und die Zellen in eine Zellkulturschale mit frischem Kulturmedium überführt. Um das restliche DMSO aus der Kultur zu entfernen wurde nach 24 h ein Medienwechsel durchgeführt. Die weitere Kultur der Zellen erfolgte wie in 2.3.2.1. beschrieben.

2.3.2.4. Differenzierung von C2C12 Myoblasten

C2C12 Zellen sind undifferenzierte Myoblasten, die nach Serumentzug zu kontraktile Myotuben differenzieren. Diese zeigen eine charakteristische Produktion von muskelspezifischen Proteinen. Für die myogene Differenzierung wurden die Zellen in dieser Arbeit mit einer Dichte von 1×10^5 pro 6-Loch ausgesät und nach Erreichen von ca. 70 %iger Konfluenz auf 0,5 % FCS haltiges Kulturmedium gesetzt. Dieses wurde jeden zweiten Tag gewechselt bis die Differenzierung zu Myotuben nach 6-8 Tagen abgeschlossen war.

2.3.2.5. Stimulierung der Zellen mit Insulin

Die Zellen wurden wie in 2.3.2.1. kultiviert und für die Versuche ausgesät. Wenn die Zellen ca. 80 % konfluent waren, wurde am Tag vor der Stimulierung ein Medienwechsel auf Hungermedium (DMEM + 0,5 % FCS) durchgeführt. Die Stimulierung mit 10 nM Insulin für 15 min erfolgte bei 37 °C.

2.3.3. Proteinbiochemische Methoden

2.3.3.1. Zellyse mit Triton X-100

Die Zellen wurden mit dem Detergenz Triton X-100 lysiert, wobei zytoplasmatische und membranständige Proteine in Lösung gebracht werden. Der Zellkern und Teile des Zytoskeletts waren in diesem Lysepuffer jedoch unlöslich. Das Kulturmedium wurde abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit Lysepuffer (200 µl / 6-Loch, bzw. 1 ml / 10cm-Schale) versetzt und für 5 min auf Eis inkubiert. Die Lysate wurden in vorgekühlte Reaktionsgefäße überführt und für 20 min bei 13.000 rpm ($16.060 \times g$) und 4 °C abzentrifugiert um das Lysat von möglichen Zelltrümmern zu trennen. Es folgte eine Konzentrationsbestimmung der Proteine (siehe 2.3.3.2.) oder die Lysate wurden bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.3.3.2. Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Messung der Proteinkonzentration der Lysate erfolgte über die Bradford-Methode (Bradford, 1976). Diese Methode nutzt den Umstand, dass die Bindung von hauptsächlich aromatischen und basischen Aminosäuren, insbesondere Arginin, an Coomassie Brilliant Blue G-250 zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm zu 595 nm führt. Dazu wurden die Lysate 1:1000 in der Bradford-Lösung (1:5) verdünnt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurde die Absorption bei 595 nm im UV-Spektrometer gemessen.

Die Konzentration der im Lysat enthaltenen Proteine wurde mit Hilfe einer BSA-Standardreihe bekannter Konzentrationen (0,5 – 1,5 µg/µl) errechnet.

2.3.3.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteingemischen für die Detektion mittels Western-Blot erfolgte durch SDS-PAGE. Dabei werden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. In dieser Arbeit wurden alle Proteine unter reduzierenden und denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Das β-Mercaptoethanol im Lämmli-Puffer reduziert vorhandene Disulfidbrücken der Proteine. Das SDS bindet an die Proteine, wodurch diese denaturiert werden und negativ geladene SDS-Protein-Komplexe entstehen. Dabei ist die Masse der an das Protein gebundenen Dodecylsulfat-Ionen proportional zur Proteinmasse. Somit können Proteine allein anhand ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden. Die Laufstrecke der Proteine hängt von der Dichte des SDS-Gels ab. Abhängig vom Molekulargewicht der zu untersuchenden Proteine wurden daher 8- bzw. 12 %ige SDS-Polyacrylamidgele als Trenngele verwendet und mit einem 4 %igen Sammelgel überschichtet. Durch das Auftragen der Proben auf ein vorgeschaltetes Sammelgel kann die Trennschärfe erhöht werden. Die Proteine werden hierbei zwischen Leitonen (Chloridionen) und Folgeionen (Glycin) durch sogenanntes „Stacking“ aufkonzentriert. Die SDS-Protein-Komplexe besitzen im Vergleich zu den Leitonen (hohe Mobilität) und den Folgeionen (niedrige Mobilität) eine mittlere Mobilität. Somit wandern die Proteine als scharfe Bande mit gleicher Geschwindigkeit zum Trenngel. Im Trenngel erhöht sich die negative Ladung des Glycins durch den höheren pH-Wert, sodass es die Proteine „überholt“ und das „Stacking“ beendet wird. Ab hier werden die Proteine wie bereits beschrieben ihrer Größe nach aufgetrennt. Das Molekulargewicht der aufgetrennten Proteine konnte mit Hilfe eines Standards (HMWM), welcher zusätzlich mit aufgetragen wurde, identifiziert werden. Dieser Standard bestand aus folgenden Proteinen:

Myosin	200 kDa
B-Galactosidase	116 kDa
Phosphorylase b	97 kDa
Rinderserumalbumin	66 kDa
Ovalbumin	43 kDa
Carboanhydrase	31 kDa
Trypsin-Inhibitor	21 kDa
Lysozym	14 kDa

2.3.3.4. Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen und anschließende immunologische Detektion (Western-Blot)

Um die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine mit Antikörpern detektieren zu können, müssen die Proteine vom Acrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen werden. In dieser Arbeit wurden die Proteine in einem Semi-dry Blot Verfahren elektrophoretisch transferiert. Es wurden drei Lagen in Transblot-Puffer getränkte Filterpapiere auf die Anode gelegt. Darauf wurde eine ebenfalls in Transblot-Puffer benetzte Nitrozellulosemembran gelegt. Das SDS-Gel wurde dann luftblasenfrei auf diese platziert und mit drei weiteren Filterpapieren bedeckt. Der Transfer erfolgte bei 4 °C für 3 h mit 0,24 mA/cm². Um den Transfer zu überprüfen und die Banden des Molekulargewichtsstandards zu markieren wurde die Nitrozellulosemembran im Anschluss an den Transfer mit Ponceau S gefärbt. Eine Inkubation in NET-G Puffer für mindestens 1 h diente zur Blockierung unspezifischer Bindestellen der Antikörper an Proteine und Membran.

Die Detektion der auf der Nitrozellulosemembran immobilisierten Proteine mit spezifischen Antikörpern erfolgte über Nacht bei 4 °C. Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper und Antikörperkonzentrationen sind in 2.1.2. gelistet. Die Membranen wurden anschließend dreimal für 10 min mit NET-Puffer gewaschen und dann mit entsprechenden an Meerrettichperoxidase gekoppelten sekundären Antikörpern für 1 h inkubiert. Im Anschluss wurden die Membranen erneut dreimal für 10 min in NET-Puffer gewaschen und dann mit ECL-Lösung beschichtet. Das in der ECL-Lösung enthaltene Luminol wird von der Meerrettichperoxidase oxidiert. Die dabei entstehende Chemilumineszenz wurde durch Auflegen eines Röntgenfilms detektiert. Für die Auswertung wurden die Filme eingescannt und bei Bedarf densitometrisch ausgewertet.

2.3.3.5. Immunpräzipitation (IP)

Durch eine Immunpräzipitation können bestimmte Proteine aus dem Zelllysat mit Hilfe spezifischer Antikörper angereichert werden. Dazu wurden in dieser Arbeit Protein-G-Sepharose 4B Kügelchen in Kombination mit spezifischen Antikörpern verwendet. Das Protein-G bindet an den konstanten Teil (Fc-Teil) der IgG-Klasse von Immunglobulinen. Mittels Zentrifugation kann somit ein Komplex aus Protein-G-Sepharose, Immunglobulin und dem gebundenen Zielprotein vom Zelllysat getrennt und aufgereinigt werden. Auch an das Zielprotein gebundene Proteine und Interaktionspartner können so co-präzipitiert (Co-IP) werden. Die Zellen wurden wie in 2.3.3.1. lysiert und das Zelllysat mit 0,5 – 2 µg Antikörper und Protein-G-Sepharosekügelchen für 3 h bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 1 min bei 3000 g abzentrifugiert und dreimal mit HNTG gewaschen. Die IPs wurden dann in Lämmli-Puffer aufgenommen und 5 min bei 95 °C

aufgekocht, um die gebundenen Proteine von den Protein-G-Sepharose Kügelchen zu trennen. Die weitere Detektion der angereicherten Proteine erfolgte mittels Western-Blot wie in 2.3.3.3. und 2.3.3.4. beschrieben.

2.3.3.6. Immunfluoreszenzfärbung

Mittels Immunfluoreszenz ist es möglich bestimmte Proteine innerhalb von Zellen zu detektieren und somit deren Lokalisation zu bestimmen. Die Zellen müssen dazu fixiert und deren Membranen permeabilisiert werden, damit spezifische Antikörper eindringen und an das Zielprotein binden können. Durch Farbstoff-gekoppelte sekundäre Antikörper können die an das Protein gebundenen primären Antikörper nachgewiesen und im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden.

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden 1×10^5 Zellen auf sterilen Glasplättchen in einer 35 mm Schale ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium abgezogen und die Zellen sofort mit 4 % Paraformaldehyd für 30 min bei Raumtemperatur fixiert. Im Anschluss wurde zweimal mit PBS gewaschen und die Zellen für 2 min mit frisch hergestellter eiskalter 0,2 %iger TritonX100-PBS-Lösung auf Eis inkubiert, um die Membranen zu permeabilisieren. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden für 45 Minuten mit 10 %iger FCS-PBS-Lösung unspezifische Bindestellen bei Raumtemperatur abgesättigt. Es folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper in 10 %iger FCS-PBS-Lösung. Der Enigma H110 Antikörper wurde dabei 1:50 verdünnt eingesetzt. Um den Antikörper sparsam einzusetzen, wurden ca. 40 μ l des verdünnten Antikörpers auf einen Parafilm pipettiert und das Glasplättchen umgedreht auf diesen Tropfen gelegt. Zum Schutz vor Verdunstung wurde dies in Petrischalen durchgeführt, in welche zusätzlich eine mit Wasser befeuchtete Filtermembran eingelegt wurde. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurden die Glasplättchen wieder in 35 mm Schalen überführt und dreimal mit 10 %iger FCS-PBS-Lösung für 10 min bei Raumtemperatur gewaschen. Es folgte eine einstündige Inkubation mit dem sekundären Antikörper (1:400 verdünnt in 10 % FCS-PBS) bei Raumtemperatur, die ebenfalls auf Parafilm durchgeführt wurde. Da hier ein sekundärer Antikörper verwendet wurde, der mit lichtempfindlichem Alexa Fluor gekoppelt ist, fand die Inkubation im Dunkeln statt. Für die Enigma Färbung wurde ein mit Alexa Fluor 488 gekoppelter anti-Kaninchen-IgG gewählt. Alexa Fluor 488 (FITC; fluorescein isothiocyanate) hat ein Extinktionsmaximum von 495 nm und emittiert mit einem Emissionsmaximum von 519 nm grünes Licht. Nach einmaligem Waschen mit 10 %iger FCS-PBS-Lösung wurde Aktin-Zytoskelett mittels Rhodamin-Phalloidin-Färbung angefärbt (1:40 verdünnt in 10 % FCS-PBS). Das Extinktionsmaximum liegt hier bei 540 nm und das Emissionsmaximum bei 565 nm. Nach einem finalen Waschschriff mit 10 %iger FCS-PBS-Lösung wurden die

Glasplättchen mit einer Mowiol-Lösung auf Objektträgern fixiert. Dafür wurde ein Tropfen Mowiol auf den Objektträger gegeben und das Glasplättchen vorsichtig frei von Lufteinschlüssen festgedrückt. Bis zur Mikroskopie mit einem konfokalen Laserscan-Mikroskop wurden die Objektträger in einer Dunkelkammer bei 4 °C gelagert.

2.3.3.7. TUNEL-Assay

Zum Nachweis apoptotischer Zellen wurde ein TUNEL-Assay (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) angewendet. Wenn eine Zelle einen apoptotischen Prozess durchläuft, kommt es u.a. zur Fragmentierung der genomischen DNA. Dabei entstehen freie 3'-OH-Enden an den DNA-Strängen, die im Assay durch das Enzym Terminal deoxynucleotidyl Transferase (TdT) mit Fluorescein markierten Nucleotiden versehen werden. Ist eine Zelle apoptotisch, so kann das Fluorescein mit einer Wellenlänge von 450-500 nm angeregt werden und grünes Licht einer Wellenlänge von 480 nm wird emittiert. Dadurch erscheinen die Zellkerne apoptotischer Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop grün. Mittels einer Co-Färbung mit DAPI ist es so möglich die Anzahl apoptotischer Zellen zu quantifizieren. Für den TUNEL-Assay wurden 8×10^4 Zellen auf Glasplättchen in 35 mm Schalen ausgesät und nach 24 h für 24 h mit 500 μ M Stearat (an BSA gekoppelt) behandelt. Danach wurde das Medium abgezogen und die Zellen sofort mit 4 % Paraformaldehyd fixiert. Der Nachweis der DNA-Strangbrüche erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers (Roche). Nach einmaligem Waschen in PBS wurden die Glasplättchen anschließend für 30 min mit 0,1 μ g/ml DAPI-PBS bei Dunkelheit und Raumtemperatur inkubiert, um die Zellkerne anzufärben. Die Glasplättchen wurden erneut mit PBS gewaschen bevor sie mit Mowiol auf einem Objektträger fixiert wurden. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) unter 20-facher Vergrößerung. Zur Quantifizierung wurden die apoptotischen, grün markierten Zellkerne gezählt und ins Verhältnis zur Gesamtzahl der Zellkerne gesetzt.

2.3.3.8. BrdU-Proliferationsassay

Um die Proliferationsrate der C2C12 Zellen zu messen, wurde in dieser Arbeit das *Cell Proliferation ELISA BrdU Kit* von Roche verwendet. Dieser Assay basiert auf der Inkorporation von Bromdesoxyuridin (BrdU) während der DNA-Synthese in replizierenden Zellen. BrdU ist ein Analogon des Nukleosids Thymidin und entsteht durch die Verbindung von Desoxyribose mit der Nukleobase 5-Bromuracil. Während der S-Phase des Zellzyklus kann das BrdU in phosphorylierter Form anstelle von Desoxythymidintriphosphat (dTTP) in die neu synthetisierte DNA eingebaut werden. Mit Hilfe spezifischer, mit einer Peroxidase gekoppelter Antikörper gegen BrdU und einem Substrat kann eine erfolgte DNA-Synthese nachgewiesen und quantifiziert werden.

Für den Assay wurden für jeden Messwert 300 Zellen pro well in 100 µl Kulturmedium in einer 96-Loch Schale ausgesät. Für jeden Messwert wurde dabei eine Dreifachbestimmung durchgeführt und für jeden Zeitpunkt (24 h, 48 h, 72 h) eine separate 96-Loch Schale verwendet. Zusätzlich wurde für jeden Zeitpunkt eine Referenz (100 µl Kulturmedium) gemessen. Nach 24 h, 48 h und 72 h wurden 10 µl BrdU-Labeling Lösung pro well für 3 h zugegeben. Die weitere Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellerprotokolls. Die Messung erfolgte im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge: 690 nm). Für die quantitative Auswertung wurden die Messwerte nach 48 h und 72 h auf den Messwert von 24 h bezogen.

2.4. Untersuchungen eines möglichen Einflusses von Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) auf die Insulinsensitivität anhand von Patientendaten

In dieser Arbeit wurde eine mögliche Auswirkung von Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) im Enigma-Gen auf verschiedene Phänotypen untersucht. Basierend auf öffentlich zugänglichen Daten des 1000 Genomes Projects (<http://browser.1000genomes.org/index.html>) einer zentraleuropäischen Population (CEU) wurde in silico ein genomischer Bereich auf dem humanen Chromosom 5q35.3, welcher das gesamte Enigma-Gen (14,21 kb) enthält, sowie den Bereich 2kb upstream, nach SNPs untersucht. Basierend auf diesen Analysen wurden 4 SNPs mit einer MAF $\geq 0,05$ (rs163203, rs234376, 2306763, 55743355) als sogenannte tagging-SNPs, welche repräsentativ für die meisten der in diesem genomischen Abschnitt vorkommenden häufigen SNPs sind, ausgewählt.

Die TUF umfasst derzeit mehr als 2300 Teilnehmer, die ein erhöhtes Risiko für Typ 2 Diabetes aufweisen (Nicht-Diabetiker mit familiärem Hintergrund und/oder mit einer Diagnose gestörter Nüchterglukose) und stellt somit eine ausreichend große Datenbank dar, mit der ein Einfluss von SNPs auf Diabetes-relevante Phänotypen untersucht werden kann.

Diese Teilnehmer wurden für die vier SNPs genotypisiert und anschließend anhand der verfügbaren Patientendaten mögliche Zusammenhänge der SNPs mit den Parameter für die Nüchtern-Plasmakonzentration freier Fettsäuren, HOMA-IR (homeostasis model assessment of insulin resistance), ISI-Matsuda (insulin sensitivity index nach Matsuda), ISI-joined (insulin sensitivity index), VO2MAX (maximale Sauerstoffaufnahme), HPA (habitual physical activity) und Blutzucker analysiert.

Die Parameter für die Nüchtern-Plasmakonzentration freier Fettsäuren und dem Blutzucker werden direkt aus dem Blutplasma bestimmt. Die Konzentration der freien Fettsäuren wird in $\mu\text{mol/L}$ angegeben. Die Blutzuckerwerte wurden im Verlauf eines OGTT (oraler Glukosetoleranztest) zu den Zeitpunkten 0 (nüchtern), 30, 60, 90 und 120 Minuten nach Verabreichung von 75g Glukose bestimmt. Der HOMA-IR ist ein Maß für die Insulinresistenz und wird mittels der Plasmakonzentrationen von Glukose und Insulin bestimmt (Matthews et al., 1985). ISI-Matsuda (auch als ISI-OGTT bezeichnet) ist ein Schätzwert zur Insulinsensitivität, welcher mit der untenstehenden Formel nach einem OGTT errechnet werden kann (Matsuda und DeFronzo, 1999). Ein weiterer Index der Insulinsensitivität ist der ISI-joined Parameter. Dieser wird auch als ISI-clamp bezeichnet, da er während eines hyperinsulinämischen-euglykämischen Clamps bestimmt wird. Dabei erhalten die Probanden eine Insulininfusion ($40 \text{ mU} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$) für 120 Minuten, bevor anschließend die Glukoseinfusionsrate, die benötigt wird um eine Plasmaglukosekonzentration von $5,5 \text{ mmol/L}$ beizubehalten, bestimmt wird. Die Plasmaglukosekonzentration wird dabei in 5-Minuten Intervallen, die Plasmainsulinkonzentration zu Beginn und während des Clamps (Infusion) bestimmt. Der VO2MAX-Wert gibt die maximale Sauerstoffaufnahme an und kann mittels des Fickschen-Prinzips (Formel siehe unten) errechnet werden. Ein HPA-Parameter gibt Auskunft über den allgemeinen Fitnesszustand. Dieser wurde per Fragebogen erhoben.

Formeln für die Berechnung der Parameter:

HOMA-IR (Matthews et al., 1985):

$$\text{HOMA-IR} = \{c(\text{Glukose}[\text{mmol/L}])_0 * c(\text{Insulin}[\text{mU/L}])_0\} / 22,5$$

ISI-Mats (Matsuda und DeFronzo, 1999):

$$\text{ISI-Mats} = 10000 / \{c(\text{Glukose}[\text{mmol/L}])_0 * c(\text{Insulin}[\text{pmol/L}])_0 * c(\text{Glukose}[\text{mmol/L}])_{\text{mean}} * c(\text{Insulin}[\text{pmol/L}])_{\text{mean}}\}^{1/2}$$

ISI-joined:

Glukoseinfusionsrate um die Euglykämie während der letzten 20 Minuten des Clamps (steady state) ($\text{mmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) aufrechtzuerhalten geteilt durch die Insulinkonzentration (steady-state) (pmol/L)

VO2MAX (Ficksches Prinzip) :

$$\text{VO}_2\text{max} = Q \text{ (Herzzeitvolumen)} * \{C_a\text{O}_2 \text{ (arterielle O}_2\text{-Menge)} - C_v\text{O}_2 \text{ (venöse O}_2\text{-Menge)}\}$$

2.5. Statistische Auswertung

Die Daten wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Die Anzahl der unabhängigen Experimente, die in die Auswertung miteinbezogen wurden ist mit 'n' angegeben. Alle Daten wurden mittels eines Student's t-test auf Signifikanz untersucht. Ein p-Wert $<0,05$ wurde als statistisch signifikant bewertet.

Mögliche Zusammenhänge der in 2.4. beschriebenen SNPs des Enigma-Gens mit Diabetes-relevanten Parametern wurden durch multiple lineare Regressionsmodelle untersucht. Dazu wurde die Methode der kleinsten Quadrate angewendet. Der zu untersuchende Parameter wurde als Zielvariable gewählt. Der SNP-Genotyp diene als unabhängige Variable, während Geschlecht, Alter und *body mass index* (BMI) als mögliche Störvariablen behandelt wurden. Für diese Analysen wurde die Statistiksoftware JMP 10.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA) verwendet. Ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet. Die Effektgröße wurde als standardisiertes Beta angegeben.

3. Ergebnisse

3.1. Eine veränderte Expression von Enigma in C2C12 Myoblasten führt zu insulinunabhängigen Änderungen im Phosphorylierungszustand von Akt und Erk1/2

3.1.1. Enigma Überexpression führt zu Veränderungen im Aktivierungszustand von IRS1, Akt und Erk1/2, hat aber keinen Einfluss auf den Insulineffekt in C2C12-Zellen

Um zu untersuchen ob die beschriebene Interaktion von Enigma mit dem Insulinrezeptor (Wu and Gill 1994) einen Einfluss auf das Insulinsignal hat, wurde Enigma in C2C12 Myoblasten überexprimiert. Damit bei allen Experimenten eine stets gleichmäßige Expression gewährleistet ist und um Transfektionsartefakte zu vermeiden, welche bei transienten Transfektionen auftreten können, wurden in dieser Arbeit C2C12 Myoblasten stabil mit humanem Enigma transfiziert (siehe 2.3.2.2.1.). Es konnten drei Zelllinien mit stabiler Überexpression isoliert und kultiviert werden (im Folgenden als C2C12 ÜE bezeichnet). Densitometrische Analysen von Western-Blots der Gesamtzelllysate ergaben eine ca. 5-, 10-, bzw. 11-fach erhöhte Expression von Enigma in diesen Zelllinien im Vergleich zu den parentalen C2C12-Zellen (Abbildung 3.1). Diese Zelllinien wurden zur Untersuchung eines möglichen Einflusses von Enigma auf das Insulinsignal verwendet. Im Laufe dieser Arbeit hat Klon ÜE3 die Enigma-Überexpression wieder verloren und diese konnte auch nach erneuter Selektion mit G418 nicht wieder erreicht werden. Somit wurden nur die Ergebnisse der Klone ÜE1 und ÜE2 verwendet und ausgewertet.

Die Zellen wurden über Nacht gehungert, am nächsten Tag mit 10 nM Insulin stimuliert und im Anschluss, mittels Western-Blot Analysen, der Phosphorylierungsstatus von wichtigen Komponenten des Insulinsignalweges untersucht. Zuerst wurde mit der Akt-Kinase, welche im Insulinsignalweg eine zentrale Rolle spielt, der distale IR-Signalweg betrachtet. Dabei zeigte sich bei den beiden Zelllinien mit der Überexpression, dass eine erhöhte Expression von Enigma zu einer gesteigerten Aktivierung von Akt führt (Abb. 3.2 A+B). Die Akt-Phosphorylierung an T308 war hierbei bis zu 1,5-fach im Vergleich zu den parentalen Zellen erhöht. Dieser Effekt war jedoch nicht erst nach Insulinstimulation zu beobachten, sondern auch im basalen unstimulierten Zustand. Da bekannt ist, dass IRS1, welches an Y989 phosphoryliert ist, an SH2-Domänen in der p85-Untereinheit der PI3K bindet und die p110-Untereinheit der PI3K dadurch aktiviert wird, wurde dies als möglicher Weg der Akt-Aktivierung untersucht. Interessanterweise ließ sich die verstärkte Akt-Phosphorylierung nicht auf eine ebenfalls erhöhte Tyrosin-Phosphorylierung im IRS1-Protein zurückführen

(Abb. 3.2 C+D). Die IRS1-Phosphorylierung an Y989 war bei den Überexprimierten sowohl im stimulierten als auch im basalen Zustand stark reduziert, was auf eine IRS1-unabhängige Aktivierung von Akt in diesen Zellen hindeutet.

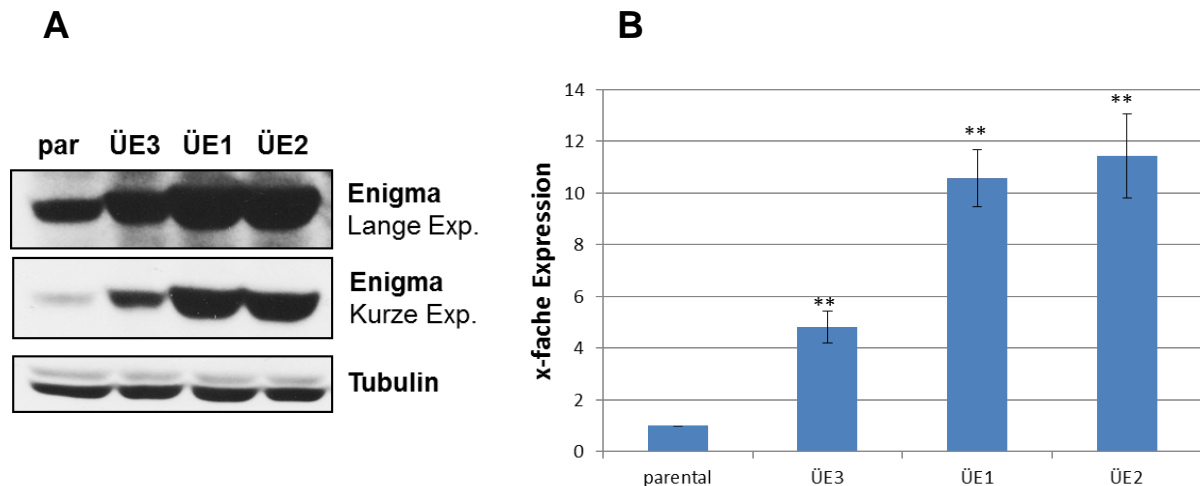


Abbildung 3.1: Expressionsanalyse der stabil transfizierten C2C12 Myoblasten

(A) Repräsentativer Western-Blot von Gesamtzelllysaten der Überexprimierten im Vergleich zu parentalen Zellen. (B) Densitometrische Auswertung von Western-Blots zur quantitativen Bestimmung der Enigma-Proteinexpression. Die Werte wurden auf Tubulin normalisiert (n=3). **p<0,01 bezeichnet eine Signifikanz zur Kontrolle (parentale C2C12)

Neben dem klassischen PI3K-Signalweg wurde als Vertreter des wachstumsfördernden Insulin-Signalwegs auch Erk1/2 untersucht. Auch hier zeigte sich eine erhöhte Aktivierung von Erk1/2 in den Enigma-überexprimierenden Zellen, sowohl unter basalen als auch unter stimulierten Bedingungen. Verglichen mit den parentalen Zellen war die Erk1/2 Phosphorylierung an T202/Y204 um das bis zu 2-fache erhöht (Abb. 3.2 E+F). Um zu untersuchen ob die erhöhte Enigma Expression einen Einfluss auf den Insulinsignal hat oder ob die Effekte allein durch die veränderte Enigma-Expression hervorgerufen werden, wurde der Insulineffekt berechnet. Dazu wurde das Verhältnis zwischen stimuliertem und basalem Phosphorylierungszustand von IRS1 Y989, Akt T308 und Erk1/2 T202/Y204 bestimmt (Abb. 3.3). Tatsächlich waren keine signifikanten Veränderungen des Insulineffekts durch eine erhöhte Enigma Expression festzustellen. Da die Proteinmenge von Akt und Erk1/2 durch die Überexpression von Enigma nicht beeinflusst war (siehe Supplementary Abb. 3.27), lässt sich daraus schließen, dass eine Überexpression von Enigma zwar zu verstärkter Aktivierung von Akt und Erk1/2 führt, dies jedoch erstens IRS1-unabhängig vermittelt wird, und zweitens nicht durch Insulin beeinflusst wird.

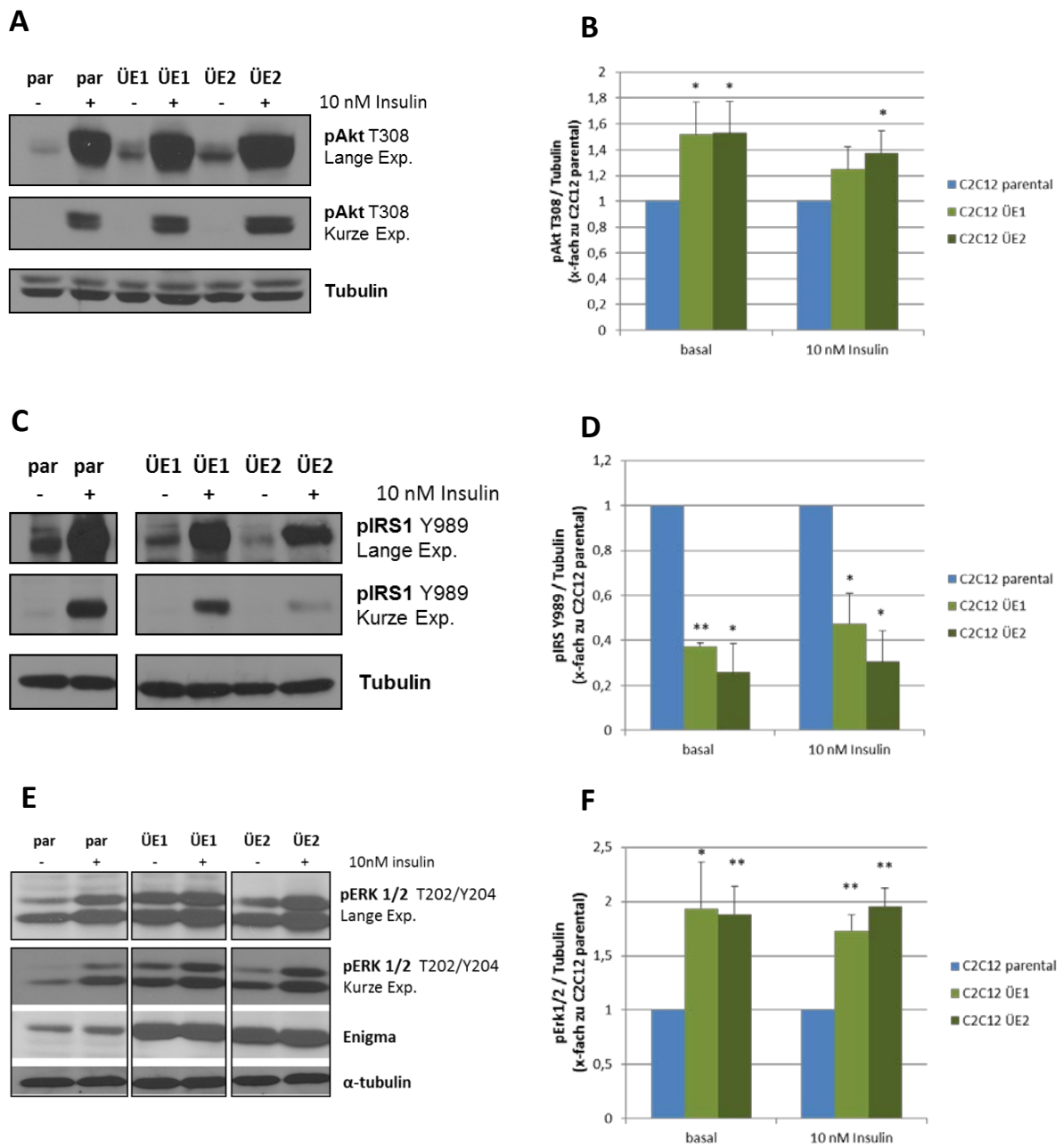


Abbildung 3.2: Eine Überexpression von Enigma führt zu Veränderungen der Phosphorylierungszustände von Komponenten des Insulinsignalweges

(A) (C) (E) Repräsentative Western-Blots von Gesamtzelllysaten. Die Zellen wurden über Nacht gehungert und mit 10 nM Insulin stimuliert. Die Detektion erfolgte mit phospho-spezifischen Antikörpern gegen IRS1 Y989, Akt T308, Erk1/2 T202/Y204 und Tubulin. (B) (D) (F) Densitometrische Auswertung der Western-Blots. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD aus mindestens n=3 unabhängigen Experimenten. Die Werte wurden auf Tubulin normalisiert und im Verhältnis zu parentalen C2C12 angegeben. * $p < 0,05$ bzw. ** $p < 0,01$ bezeichnet eine Signifikanz zur Kontrolle (parentale C2C12).

Ergebnisse

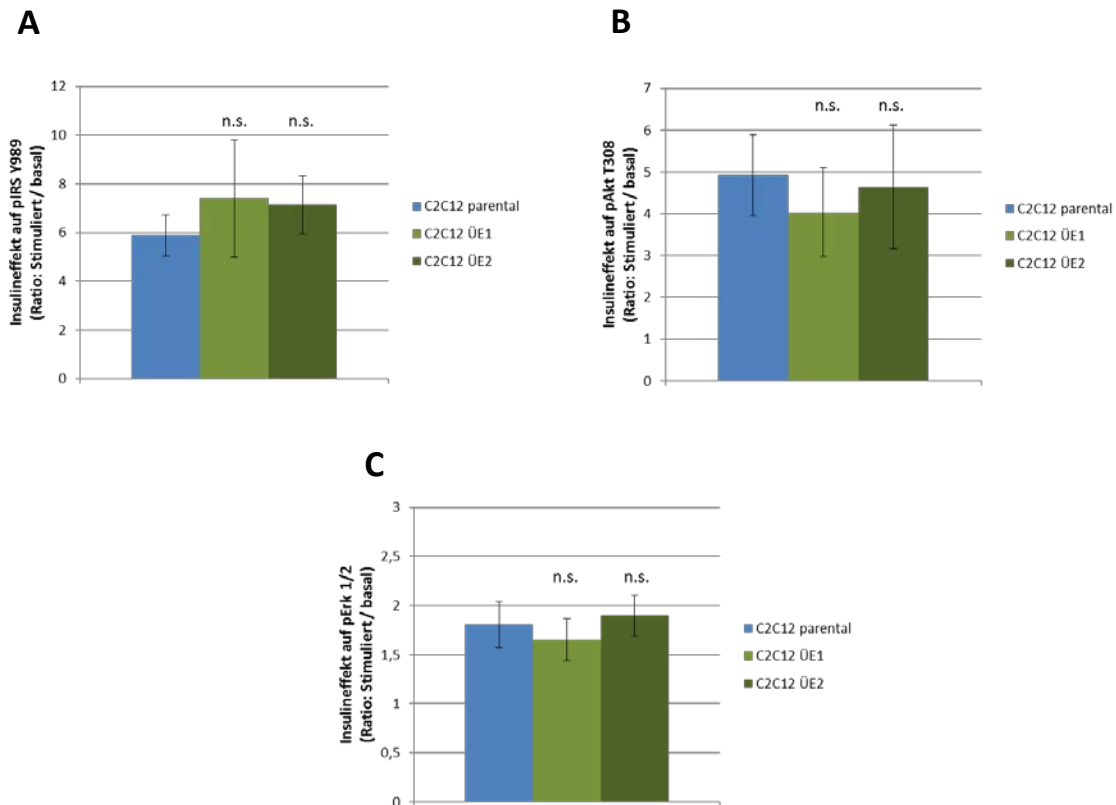


Abbildung 3.3: Eine erhöhte Expression von Enigma hat keinen signifikanten Einfluss auf die Effekte von Insulin

Mit den auf Tubulin normalisierten Werten der densitometrischen Analysen wurden die Effekte von Insulin auf (A) IRS Y989, (B) Akt T308 und (C) Erk1/2 T202/Y204 berechnet. Dazu wurden die Werte nach Insulinstimulation ins Verhältnis zu den basalen Werten gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD der Insulineffekte aus den Werten der Experimenten aus Abb. 3.2. (n.s. = nicht signifikant).

3.1.2. Ein stabiler Knockdown von Enigma in C2C12 Myoblasten führt ebenfalls zu veränderter IRS1, Akt und Erk1/2 Aktivierung

Um die Veränderungen im Phosphorylierungszustand von IRS1, Akt und Erk1/2, welche bei Überexpression von Enigma beobachtet werden konnten, weiter zu untersuchen, sollten C2C12 Myoblasten mit einem stabilen Knockdown von Enigma verwendet werden. Diese wurden wie in 2.3.2.2.2. beschrieben generiert und im Folgenden als C2C12 KD bezeichnet. Da sich die Transfektion mit den shRNA-Plasmiden als schwierig herausstellte, konnten nur zwei Zelllinien mit vergleichbar starkem Knockdown isoliert und kultiviert werden (Abb. 3.4 A). Densitometrische Analysen ergaben eine Enigma-Proteinexpression von ca. 26 % (C2C12 KD1) bzw. 19 % (C2C12 KD2) verglichen zu den parental C2C12-Zellen (Abb. 3.4 B).

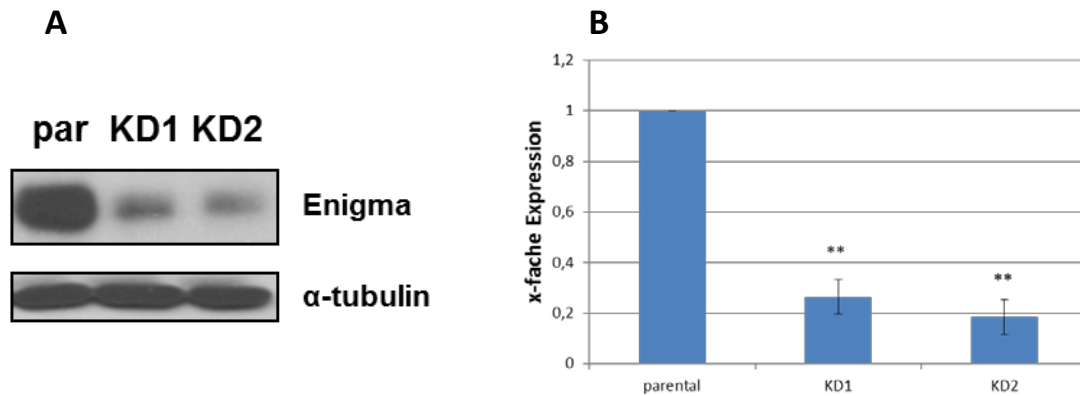


Abbildung 3.4: Expressionsanalyse von Enigma in den C2C12 Myoblasten mit stabilem Knockdown

(A) Repräsentativer Western-Blot mit Gesamtzelllysaten von C2C12 Myoblasten mit stabilem Enigma-Knockdown. (B) Densitometrische Auswertung von Western-Blots zur quantitativen Bestimmung der Enigma-Proteinexpression. Die Werte wurden auf Tubulin normalisiert (n=3). **p<0,01 bezeichnet eine Signifikanz zur Kontrolle (parentale C2C12).

Die Zellen wurden wieder über Nacht gehungert und am folgenden Tag mit 10 nM Insulin stimuliert. Entgegen den Erwartungen zeigten die Zellen mit einem stabilem Knockdown keine verringerte Akt-Phosphorylierung an T308. Außer Klon KD2, bei dem eine signifikant erhöhte basale Akt T308 Phosphorylierung zu beobachten war, zeigten die Zellen mit stabilem Knockdown eine, zwar nicht signifikant, aber tendenziell erhöhte Akt T308 Phosphorylierung (Abb. 3.5A+B). Dies könnte durch eine ebenfalls verstärkte basale IRS Y989 Phosphorylierung zu erklären sein (Abb. 3.5 C+D). Während bei den Enigma-überexprimierenden Zellen eine IRS-unabhängige Akt-Phosphorylierung zu beobachten war, könnte hier die erhöhte basale IRS-Phosphorylierung zu einer verstärkten PI3K-Aktivität und somit schließlich zur Akt-Phosphorylierung führen. Das Enigma-Expressionslevel scheint also, zumindest unter basalen Bedingungen, negativ mit der IRS1 Y989 Phosphorylierung zu korrelieren. Die Berechnung des Insulineffekts auf die Akt-Phosphorylierung zeigten keine signifikanten Unterschiede (Abb. 3.6A). Auf die IRS1-Phosphorylierung hatte Insulin jedoch einen geringeren Effekt in den Zellen mit Enigma-Knockdown (Abb. 3.6B). Als nächstes wurde die Erk 1/2-Phosphorylierung angeschaut. Hier zeigte ein Enigma-Knockdown den gegenteiligen Effekt zur Überexpression. Die Erk 1/2-Phosphorylierung an T202/Y204 war sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach Stimulation der Zellen mit Insulin signifikant reduziert (50 % bzw. 60 % im Vergleich zu den parentalen Zellen) (Abb. 3.5 E+F). Ein signifikanter Effekt von Insulin konnte auch hier nicht festgestellt werden (Abb. 3.6C). Die Proteinmenge von Akt und Erk1/2 war auch nach Knockdown von Enigma nicht verändert (siehe Supplementary Abb. 3.27).

Ergebnisse

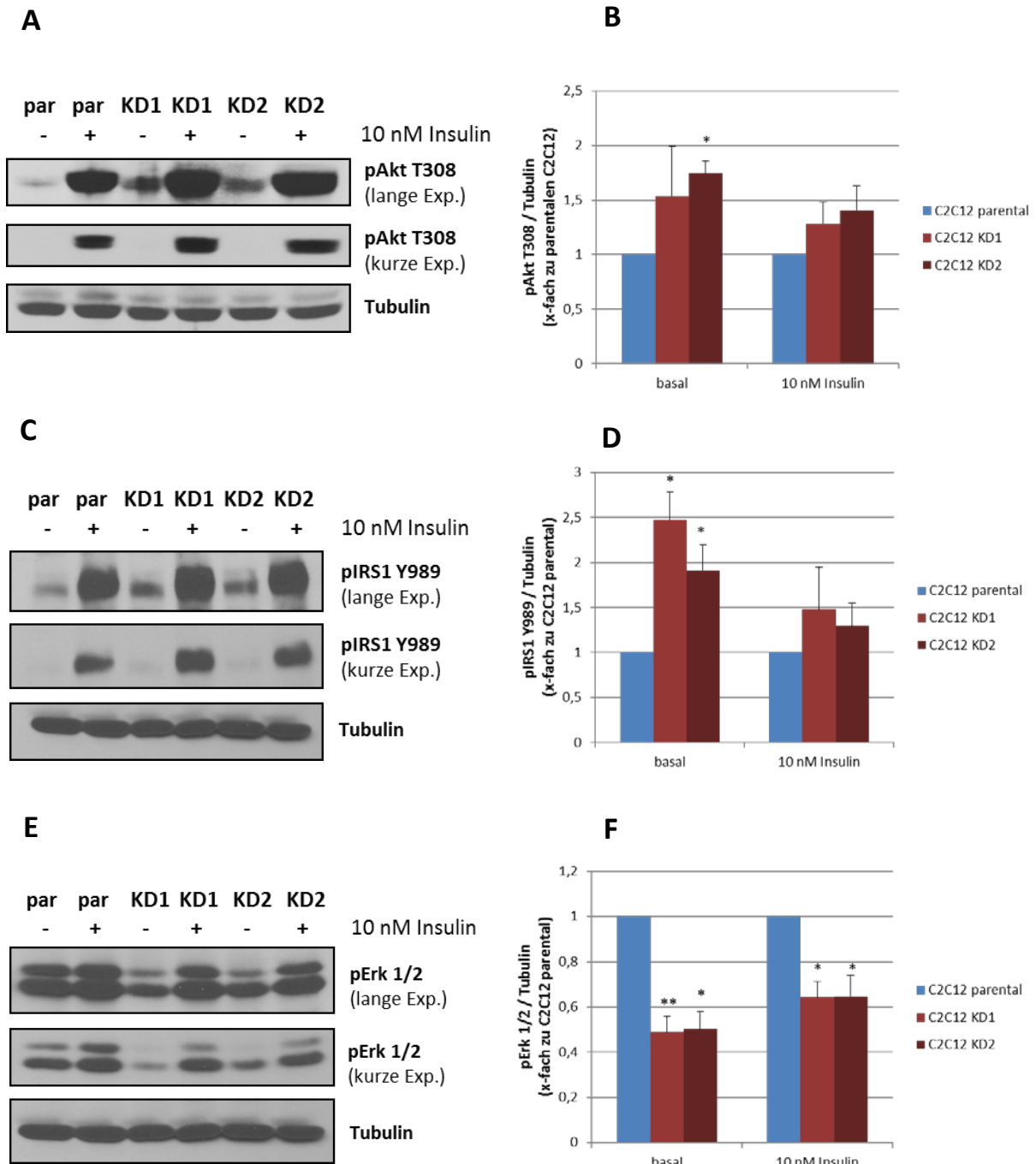


Abbildung 3.5: Ein Knockdown von Enigma führt zu Veränderungen der Phosphorylierungszustände von Komponenten des Insulinsignalweges

(A) (C) (E) Repräsentative Western-Blots von Gesamtzelllysaten. Die Zellen wurden über Nacht gehungert und mit 10 nM Insulin stimuliert. Die Detektion erfolgte mit phosfo-spezifischen Antikörpern gegen IRS1 Y989, Akt T308, Erk1/2 T202/Y204 und Tubulin. (B) (D) (F) Densitometrische Auswertung der Western-Blots. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD aus mindestens n=3 unabhängigen Experimenten. Die Werte wurden auf Tubulin normalisiert und im Verhältnis zu parentalen C2C12 angegeben. * $p < 0,05$ bzw. ** $p < 0,01$ bezeichnet eine Signifikanz zur Kontrolle (parentale C2C12).

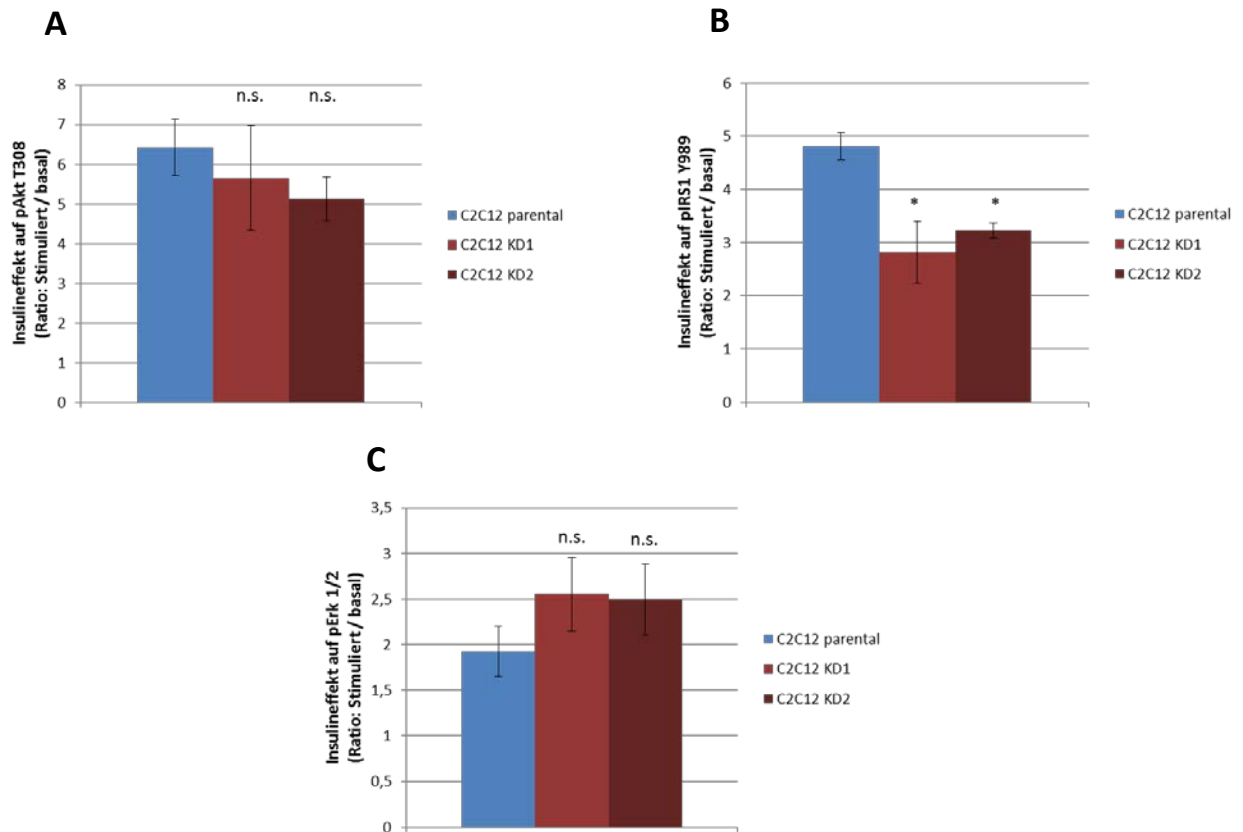


Abbildung 3.6: Ein Enigma-Knockdown hat keinen signifikanten Einfluss auf die Effekte von Insulin auf die Akt- und Erk1/2-Phosphorylierung

Mit den auf Tubulin normalisierten Werten der densitometrischen Analysen wurden die Effekte von Insulin auf (A) IRS Y989, (B) Akt T308 und (C) Erk1/2 T202/Y204 berechnet. Dazu wurden die Werte nach Insulinstimulation ins Verhältnis zu den basalen Werten gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD der Insulineffekte aus den Werten der Experimenten aus Abb. 3.5. (* $p < 0,05$) (n.s. = nicht signifikant).

3.2. Ein verändertes Expressionslevel von Enigma hat Auswirkungen auf die Signalwege downstream von Akt

Nachdem sowohl eine Überexpression als auch ein Knockdown von Enigma zu einer erhöhten basalen Akt-Phosphorylierung führte, sollte in diesem Kapitel untersucht werden, ob dies Auswirkungen auf Zielproteine des Akt-Signalweges hat. Da die Akt-Phosphorylierung schon unter basalen unstimulierten Bedingungen erhöht war und Insulin keinen veränderten Effekt im Vergleich zu den Kontrollzellen hatte, wurden diese Versuche unter unstimulierten Bedingungen durchgeführt. Da Akt über den TSC1/TSC2 Komplex die mTOR-Kinase aktivieren kann, was wiederum zu einer aktivierenden Phosphorylierung der p70-S6-Kinase an T389 führt, kann die p70-S6K als ein Indikator für eine veränderte Akt-Aktivität herangezogen werden. Aber auch der MAPK-Signalweg kann zu einer Aktivierung

der p70-S6K führen (Wang et al., 2001). Um dies zu untersuchen, wurde ein spezifischer AK gegen phosphoryliertes T389 der p70-S6K verwendet. Wie in Abbildung 3.7A zu sehen ist, konnten in Western-Blot Analysen keine verstärkte Phosphorylierung der p70-S6K bei Überexpression von Enigma festgestellt werden. Interessanterweise konnte bei den Myoblasten mit Enigma-Knockdown eine erhöhte konstitutive Phosphorylierung beobachtet werden. Als nächstes wurde die GSK3 α/β Phosphorylierung an S21/9 angeschaut. Die GSK3 stellt ein direktes Zielprotein der Akt-Kinase dar und wird nach Phosphorylierung durch Akt deaktiviert und phosphoryliert und inhibiert daraufhin ihrerseits die Glykogensynthese nicht mehr. Hier konnten, sowohl bei Überexpression als auch bei Knockdown von Enigma, eine tendenziell leicht erhöhte konstitutive GSK3-Phosphorylierung im Unterschied zu den parentalen C2C12-Zellen detektiert werden (Abb. 3.7B). Allerdings waren die Unterschiede nicht signifikant.

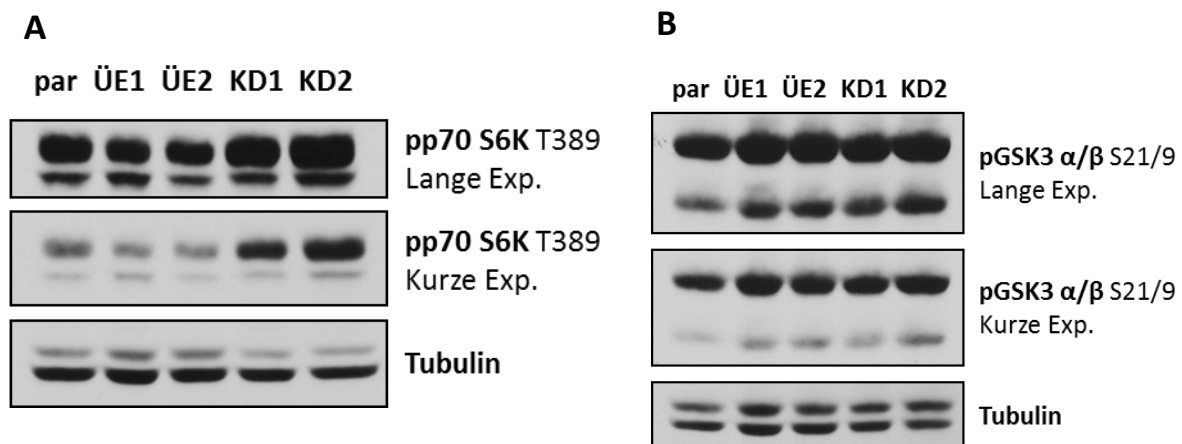


Abbildung 3.7: Auswirkungen der veränderten Enigma-Expression auf die basale Phosphorylierung von downstream Komponenten des PI3K-Signalweges

Western-Blot zur Analyse der T389-Phosphorylierung der p70-S6K (A) und der S21/9 Phosphorylierung der GSK3 (B) in den C2C12-Zellen mit Enigma-Überexpression bzw. Enigma-Knockdown im Vergleich zu den parentalen C2C12.

3.3. Mittels Co-Immunpräzipitation kann keine Interaktion zwischen Enigma und dem Insulin-Rezeptor nachgewiesen werden

In diesem Abschnitt sollte die von Wu and Gill 1994 beschriebene Interaktion zwischen Enigma und dem Insulinrezeptor (IR) mittels Co-Immunpräzipitation (Co-IP) bestätigt werden. Insbesondere die veränderte Tyrosinphosphorylierung des IRS1 könnte auf eine solche Interaktion zurückzuführen sein. Da eine transiente Expression des IR in den C2C12 UE Zellen nur zu sehr geringen Mengen an überexprimiertem IR führte, wurden für diese Versuche Hek293-Zellen, wie in 2.3.2.2.3. beschrieben, mit Enigma allein oder zusammen

mit dem IR co-transfiziert. Um einen möglichen Einfluss von Insulin auf die Interaktion zu berücksichtigen, wurde ein Teil der Zellen zusätzlich mit Insulin stimuliert. Die Immunpräzipitation erfolgte mit einem Antikörper gegen den IR (8314) bzw. gegen Enigma (ab86065). Abbildung 3.8A zeigt einen Western-Blot der IP mit dem 8314-Ak (Antikörper gegen den Insulinrezeptor). Im Gesamtzelllysat (WCL) ist zu sehen, dass Enigma und auch der IR stark exprimiert wurden. Der IR konnte zwar immunpräzipitiert werden, jedoch war sowohl unter unstimulierten als auch unter insulinstimulierten Bedingungen keine Co-Präzipitation von Enigma detektierbar. Auch nach Immunpräzipitation von Enigma konnte keine Co-Präzipitation/Interaktion im Western-Blot beobachtet werden (Abb. 3.8B). Da auch keine deutlichen Effekte von Insulin auf die Akt und Erk1/2 Phosphorylierung nach Überexpression bzw. Knockdown von Enigma vorlagen, sind diese Ergebnisse ein weiteres Indiz dafür, dass Enigma keinen Einfluss auf das Insulinsignal hat bzw. Enigma die Effekte nicht durch ein verändertes Insulinrezeptorsignal vermittelt.

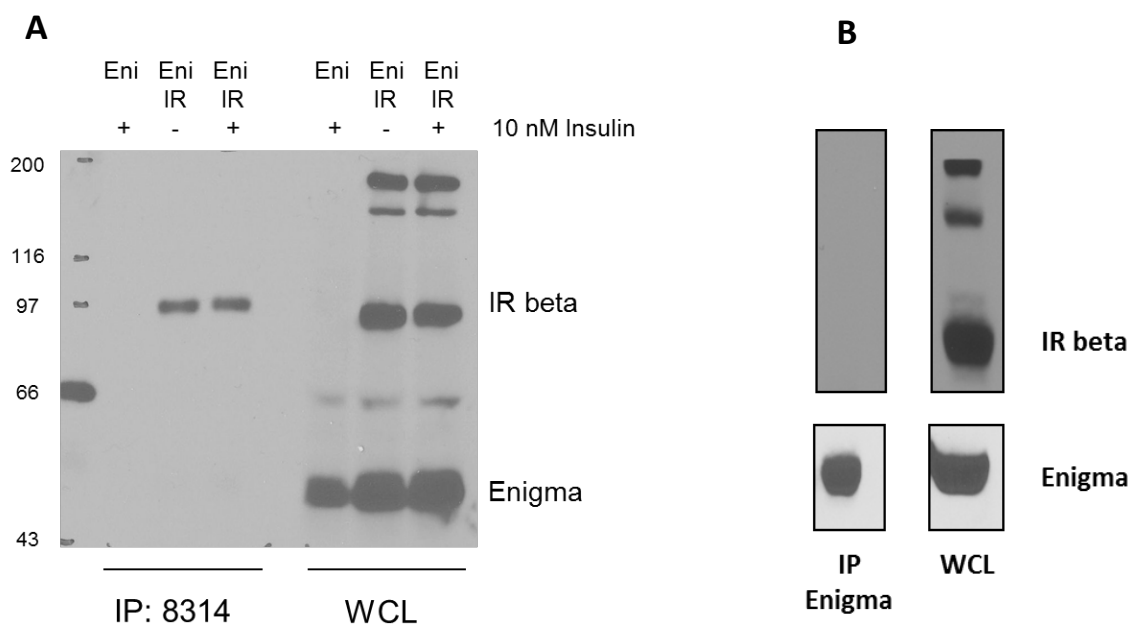


Abbildung 3.8: Enigma zeigt keine Interaktion mit dem Insulin Rezeptor via Co-Immunpräzipitation

(A) Western-Blot nach Immunpräzipitation des IR aus Gesamtzelllysat (WCL) der co-transfizierten Hek293-Zellen. Die IP erfolgte mit dem 8314-Ak unter unstimulierten und insulinstimulierten Bedingungen. Gezeigt sind die Immunblots gegen den IR und Enigma. (B) Western-Blot nach Immunpräzipitation von Enigma aus dem Gesamtzelllysat der co-transfizierten Hek293-Zellen. Die IP erfolgte mit dem Enigma-Ak (ab86065) unter unstimulierten Bedingungen. Gezeigt sind Immunblots gegen den IR und Enigma. MW-Standard in kDa.

3.4. Die erhöhte Erk1/2 Aktivierung nach Überexpression von Enigma ist MEK-abhängig

Die bisherigen Versuche zeigten, dass eine veränderte Enigma-Expression die deutlichsten Effekte auf die Erk1/2-Aktivierung hat. Um den Bereich, in dem Enigma die Effekte auf die Erk1/2 Aktivierung vermittelt, weiter einzugrenzen, wurde der spezifische MEK-Inhibitor PD98059 verwendet. PD98059 bindet an die inaktive Form von MEK1 und MEK2 und verhindert so eine Aktivierung dieser Kinasen durch upstream gelegene Kinasen wie zum Beispiel c-Raf (Alessi et al., 1995). Dadurch wird die Phosphorylierung von Erk1/2 an T202/Y204 innerhalb der Aktivierungsdomäne inhibiert. Für diesen Versuch wurden die Zellen für 1,5 h mit 50µM PD98059 behandelt. Der Western-Blot in Abbildung 3.9 zeigt, dass bei Inhibierung von MEK1/2 die Erk1/2 Aktivierung sowohl in den parentalen C2C12-Zellen als auch in den Überexprimierern vollständig inhibiert war. Daraus lässt sich schließen, dass die erhöhte Erk1/2 Aktivierung durch Enigma-Überexpression von MEK1/2 vermittelt wird.

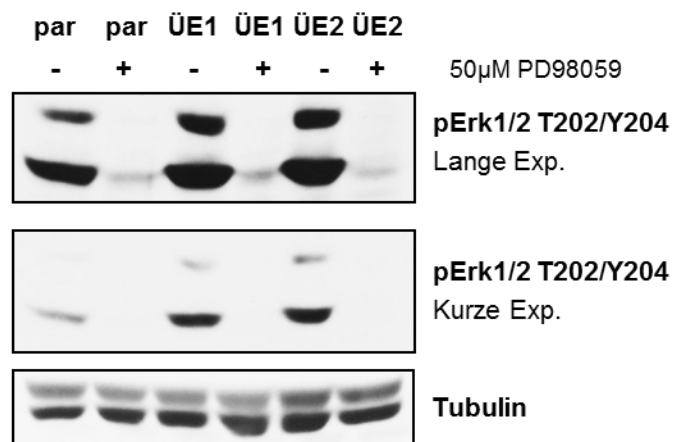


Abbildung 3.9: Die Erk1/2 Aktivierung durch Enigma-Überexpression ist MEK1/2 abhängig

Die Zellen wurden für 1,5 h mit 50µM PD98059 behandelt und anschließend lysiert. Das Gesamtzelllysate wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Erk1/2 T202/Y204 Phosphorylierung im Western-Blot detektiert. Gezeigt ist ein repräsentativer Western-Blot.

3.5. Enigma interagiert nicht mit upstream Komponenten des MAPK- Signalweges

Der klassische MAPK-Signalweg beginnt an Oberflächenrezeptoren wie dem IR oder dem IGF1R, welche das externe Signal dann über intrazelluläre Proteine weiterleiten. Dies wird hauptsächlich durch Rekrutierung von SHC1 und IRS1 an den aktivierten/tyrosinphosphorylierten Rezeptor initiiert (Sasaoka und Kobayashi, 2000,

Ravikandran 2001). Diese Substrate werden daraufhin ihrerseits von den RTKs phosphoryliert. Über eine SH2-Domäne kann nun ein Komplex aus Grb2-SOS binden, wodurch SOS als GEF aktiviert wird. Dies führt zur Aktivierung von Ras (Geyer und Wittinghofer, 1997) und folglich zu einer Aktivierung der MAP3K Raf. Durch Phosphorylierung von Serin und Threoninresten aktiviert Raf nun MEK1/2.

Nachdem durch den Einsatz des MEK-Inhibitors PD98059 gezeigt werden konnte, dass die erhöhte Erk1/2 Aktivierung nach Überexpression von Enigma durch MEK1/2 vermittelt wird, sollte nun eine mögliche Interaktion zwischen Enigma und upstream von MEK gelegenen Komponenten des MAPK Signalweges untersucht werden. Dazu wurden c-Raf, Shc1 und Grb2 durch Co-Immunpräzipitation auf eine Interaktion mit Enigma untersucht. Grb2, Shc1 und c-Raf waren dabei mit einem C-terminalen myc-Tag versehen. Hek293 Zellen wurden mit den entsprechenden Expressionsplasmiden transfiziert und Enigma aus dem Gesamtzelllysat immunpräzipitiert.

Nach Immunpräzipitation von Enigma mit einem Enigma-Ak (ab86065) konnte kein co-präzipitiertes Shc1 nachgewiesen werden (Abb. 3.10A). Als Kontrolle dienten Hek293 Zellen, die nur mit Shc1 transfiziert wurden, sowie eine IP mit einem pMEKK1 Antikörper. In diesen beiden Ansätzen wurden keine detektierbaren Mengen des Enigma-Proteins immunpräzipitiert (Spur 3+5). Auch in nicht-transfizierten Hek293 konnte Enigma nicht immunpräzipitiert werden (Spur 1). Dies ist wahrscheinlich auf die sehr geringe endogene Expression von Enigma in Hek293-Zellen zurückzuführen, wie im Gesamtzelllysat zu sehen ist.

Als nächstes wurde eine Interaktion mit Grb2 untersucht. Auch hier wurde Enigma aus dem Gesamtzelllysat immunpräzipitiert. Jedoch war auch hier im Western-Blot keine Interaktion nachweisbar (Abb. 3.10B).

Für c-Raf wurde bereits gezeigt, dass es mit Adapterproteinen wie KSR (Stewart et al. 1999, Michaud et al., 1997, Therrien et al., 1996) und SUR-8 (Li et al., 2000) interagiert und dass sich diese Interaktionen auf die Aktivität von c-Raf auswirken. Weiterhin besitzt c-Raf in seiner C1-Domäne ein Zink-Finger Motiv. Da die LIM Domänen von Enigma auch Zink-Finger Strukturen bilden und es bekannt ist, dass solche Domänen miteinander interagieren können, wurde eine mögliche Interaktion zwischen c-Raf und Enigma als Ursache für die veränderte Erk1/2 Aktivierung überprüft. Allerdings zeigten die CoIPs auch hier keine Interaktion (Abb. 3.10C).

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Regulation der Erk1/2-Aktivität durch Enigma nicht durch direkte Interaktion mit c-Raf, Shc1 oder Grb2 erfolgt.

Ergebnisse

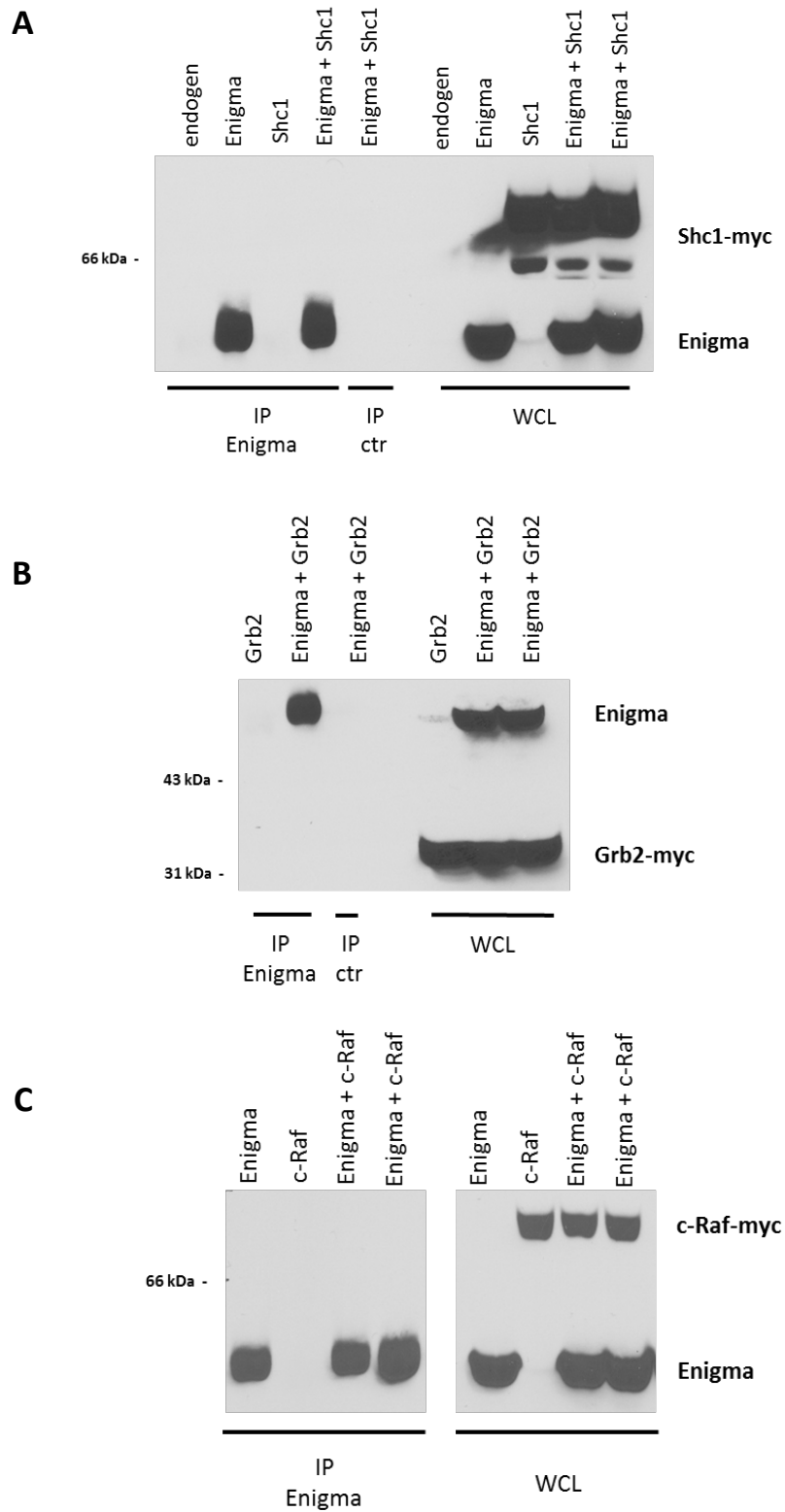


Abbildung 3.10: Enigma zeigt keine Interaktion mit Grb2, Shc1 und c-Raf

Hek293 Zellen wurden mit Shc1 (A), Grb2 (B) oder c-Raf (C) und Enigma co-transfiziert und Enigma aus dem Gesamtzelllysat immunpräzipitiert. Für die Kontroll-IP wurde ein pMEKK1-Ak verwendet. Shc1, Grb2 und c-Raf wurden anhand ihres C-terminalen myc-Tags mit einem myc-Ak detektiert.

3.6. Die Akt- und Erk1/2-Aktivierung durch Überexpression von Enigma ist abhängig von einer PI3K-Aktivität

Der klassische Weg zu einer Aktivierung von Akt über RTKs setzt die Generierung des second messengers PIP3 durch die PI3K voraus. IRS-Proteine werden dazu von den RTKs tyrosinphosphoryliert und interagieren folglich über die entstandenen SH2-Bindestellen mit der regulatorischen Untereinheit p85 der PI3K. Dies wiederum führt zu einer Aktivierung der katalytischen Untereinheit p110, welche die Phosphorylierung von PIP2 zu PIP3 katalysiert. Dadurch werden Akt und PDK1 über ihre PH-Domänen an der Plasmamembran co-lokalisiert und Akt schließlich von der PDK1 an T308 phosphoryliert. Allerdings kann Akt auch unabhängig von der PI3K aktiviert werden (Mahajan et al., 2012).

Da die Akt Phosphorylierung an T308 nach Enigma-Überexpression erhöht, die IRS1-Tyrosinphosphorylierung jedoch reduziert war, sollte nun überprüft werden, ob die Akt-Aktivierung in diesen Zellen PI3K-abhängig ist. Dazu wurden parentale und die Enigma überexprimierenden Zellen ausgesät und mit 20 bzw. 40 μM des PI3K-Inhibitors LY294002 behandelt. Die Inhibierung der PI3K führte zu einer vollständig reduzierten Akt T308 Phosphorylierung in den parentalen C2C12-Zellen wie auch in den Enigma überexprimierenden Zellen (Abb. 3.11). Daraus kann geschlossen werden, dass die erhöhte Akt-Phosphorylierung durch Enigma-Überexpression auf eine ebenfalls erhöhte PI3K-Aktivität zurückzuführen ist. Interessanterweise führte die Inhibierung der PI3K auch zu einer starken Reduktion der Erk1/2-Phosphorylierung in den überexprimierenden Zellen. Die parentalen Zellen zeigten dagegen eine geringere Reduktion. Diese Ergebnisse könnten auf einen von Enigma vermittelten Crosstalk zwischen dem PI3K-Signalweg und dem MAPK-Signalweg in diesen Zellen hinweisen.

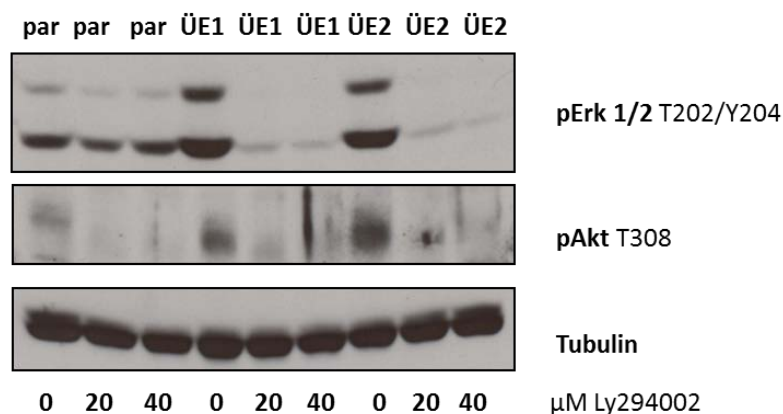


Abbildung 3.11: Die Akt- und Erk1/2-Aktivierung durch Enigma-Überexpression wird über die PI3K vermittelt

Die Zellen wurden mit 20 bzw. 40 μM des PI3K-Inhibitors LY294002 behandelt. Das Gesamtzelllysate wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Akt und Erk1/2-Phosphorylierung mit spezifischen Antikörpern im Western-Blot detektiert. Gezeigt ist ein repräsentativer Western-Blot.

3.7. Ein Überexpression bzw. ein Knockdown von Enigma führt zu Veränderungen im Phosphorylierungszustand bei weiteren Mitgliedern des MAPK-Signalweges

Da sowohl bei Knockdown als auch bei Überexpression von Enigma die deutlichsten Effekte bei der Erk1/2-Phosphorylierung zu beobachten waren, sollten nun weitere Komponenten des MAPK-Signalweges untersucht werden.

Neben den bereits beschriebenen Änderungen der Erk1/2-Phosphorylierung (Abb. 3.12A+B), zeigten Überexpression bzw. Knockdown von Enigma auch eine Erhöhung bzw. Reduzierung der JNK-Phosphorylierung (Abb. 3.12C+D). Von JNK ist bekannt, dass es eine wichtige Rolle in der Vermittlung von Apoptose, der Inflammation und der Zytokinproduktion einnimmt (Dhanasekaran et al., 2008, Huang et al., 2009, Rincon et al., 2009). Durch alternatives Spleißen entstehen mehrere Isoformen von JNK (Barr et al., 2001). Eine 46 kDa- und eine 54 kDa-Variante (JNK1 und JNK2) wurden durch den phospho-spezifischen Antikörper detektiert. Beide Isoformen zeigten nach Überexpression von Enigma eine um ca. das 2-fache erhöhte Phosphorylierung an T183/Y185. Eine Phosphorylierung des TPY-Motivs führt zu einer Aktivierung der Kinase. Diese Aktivierung konnte durch eine ebenfalls erhöhte Phosphorylierung des Substrats c-Jun bestätigt werden (Abb.3.12C). Im Gegensatz dazu konnte nach Enigma-Knockdown eine stark reduzierte JNK-Phosphorylierung beobachtet werden. Eine c-Jun Phosphorylierung war hier kaum noch feststellbar.

Für die Aktivierung von JNK sind hauptsächlich die zwei MAP2Ks MKK4 und MKK7 verantwortlich (Davis, 2000, Barr et al., 2001). Frühere Arbeiten konnten außerdem zeigen, dass diese dual-spezifischen Kinasen unterschiedliche Präferenzen gegenüber der Phosphorylierung des TPY-Motivs aufweisen. Während die MKK4 eine starke Präferenz für die Phosphorylierung des Tyrosins aufweist, favorisiert die MKK7 die Threonin-Phosphorylierung (Lawler et al., 1998). MKK4 und MKK7 werden ihrerseits von MAP3Ks wie beispielsweise der MEKK1 aktiviert. Um zu überprüfen ob diese beiden Kinasen ebenfalls durch Überexpression bzw. Knockdown von Enigma beeinflusst sind, wurden diese mit phospho-spezifischen Antikörpern in Western-Blot Analysen detektiert (Abb. 3.13). Dabei war zu sehen, dass die MKK4 verstärkt (ÜE) bzw. reduziert (KD) phosphoryliert vorlag. Die MKK7 zeigte hingegen keine veränderte Aktivierung gegenüber den parentalen C2C12. Generell war die Phosphorylierung von MKK7 in allen Zellen schwächer im Vergleich zur MKK4. Daraus lässt sich schließen, dass die Regulation der JNK-Aktivierung in diesen Zellen wahrscheinlich hauptsächlich über die MKK4 verläuft. Die MAP-Kinasen können in drei Hauptfamilien eingeteilt werden. Neben Erk1/2 und JNK wird auch die p38-MAPK dazugezählt. Eine Aktivierung der p38-MAPK durch Phosphorylierung des TGY-Motivs, hat

Ergebnisse

Auswirkungen auf Inflammation, Apoptose, Zelldifferenzierung und Zellzyklus-Regulation (Cuenda et al., 2007, Cuadrado et al., 2010).

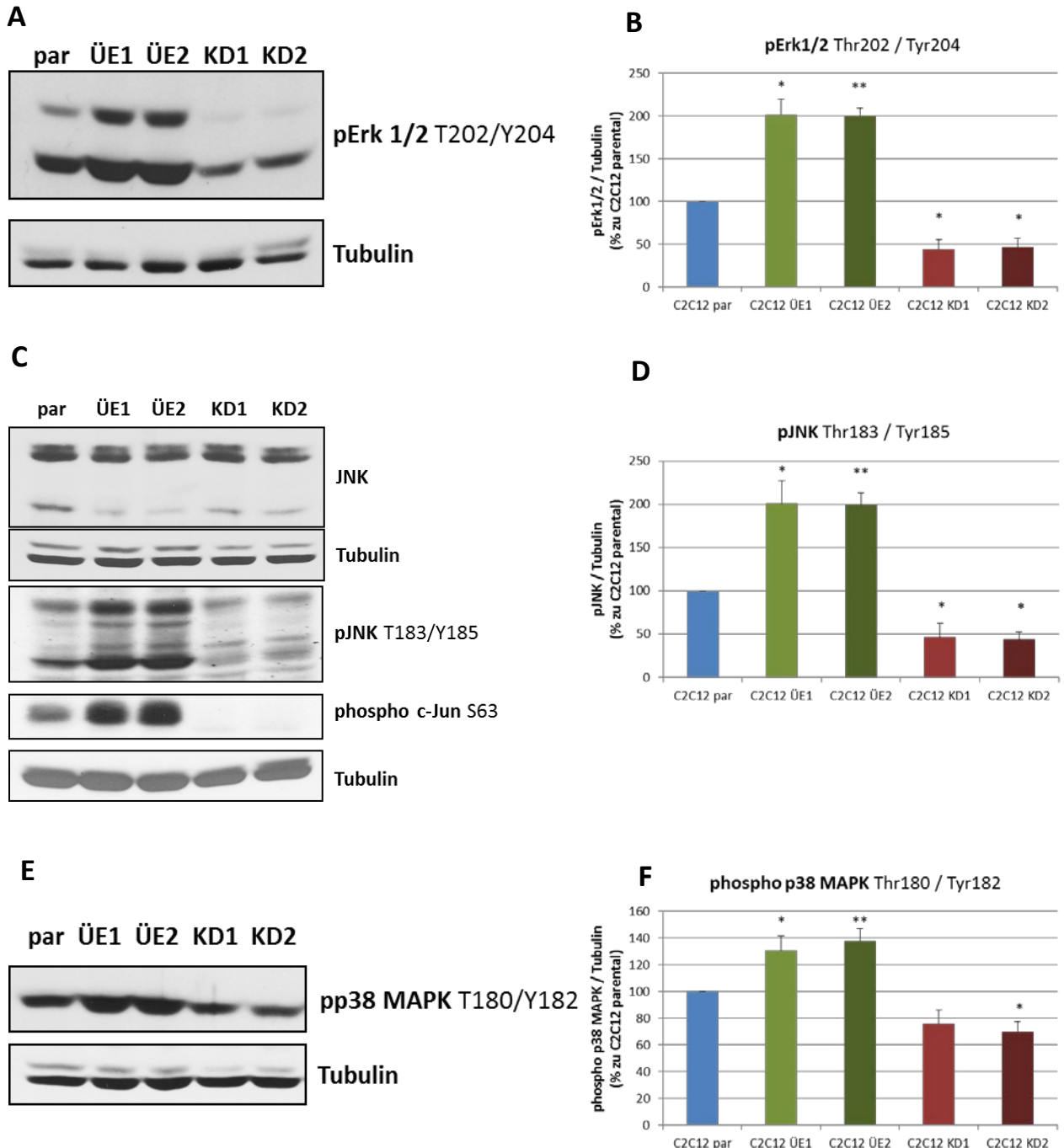


Abbildung 3.12: Eine veränderte Enigma Expression hat auch Auswirkungen auf JNK und die p38 MAPK

(A) (C) (E) Repräsentative Western-Blots von Gesamtzelllysaten. Die Detektion erfolgte mit den angegebenen phospho-spezifischen Antikörpern. Als Ladekontrolle wurde Tubulin detektiert. (B) (D) (F) (G) Densitometrische Auswertungen von mindestens n=3 unabhängigen Western-Blot Analysen. Die Werte wurden auf Tubulin normalisiert und im Verhältnis zu parentalen C2C12 angegeben. *p<0,05 bzw. **p<0,01 bezeichnet eine Signifikanz zur Kontrolle (parentale C2C12).

Ergebnisse

Wie Abbildung 3.12E zeigt, führte die Überexpression von Enigma auch hier zu einer verstärkten Aktivierung. Diese war im Vergleich zu der Erk1/2- und JNK-Aktivierung etwas schwächer (ca. 1,4-fach) verglichen zu den parentalen Zellen. Ein Knockdown von Enigma führte zu einer tendenziell geringeren Phosphorylierung des TGY-Motivs. Eine Signifikanz konnte hier nur bei der Zelllinie C2C12 KD2 beobachtet werden (Abb. 3.12F). Da bekannt ist, dass die Phosphorylierung der p38-MAPK über die upstream-Kinasen MKK3 und MKK6 erfolgt, sollte deren Aktivierung ebenfalls überprüft werden. Allerdings war es mit den verfügbaren phospho-spezifischen Antikörpern nicht möglich diese Kinasen aussagekräftig zu detektieren. Ob dies an einer zu geringen Menge an phosphoryliertem Protein oder an den Antikörpern selbst lag wurde nicht weiter untersucht.

Um zu kontrollieren ob diese Effekte unspezifisch durch den Transfektionsprozess/ Selektionsprozess oder das Expressionsplasmid an sich bedingt sind, wurden parentale C2C12-Zellen mit den jeweiligen Leervektoren pSV₂Neo bzw. pLKO-puro stabil transfiziert, selektiert und einzelne Klone isoliert. Diese Zellen wurden exemplarisch auf Erk1/2- und JNK-Phosphorylierung untersucht (siehe Supplementary Abb. 3.28), zeigten jedoch keine veränderte Aktivität dieser Kinasen im Vergleich zu den parentalen Zellen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass ein verändertes Expressionslevel von Enigma zu vielen Änderungen in den MAPK-Signalwegen führt.

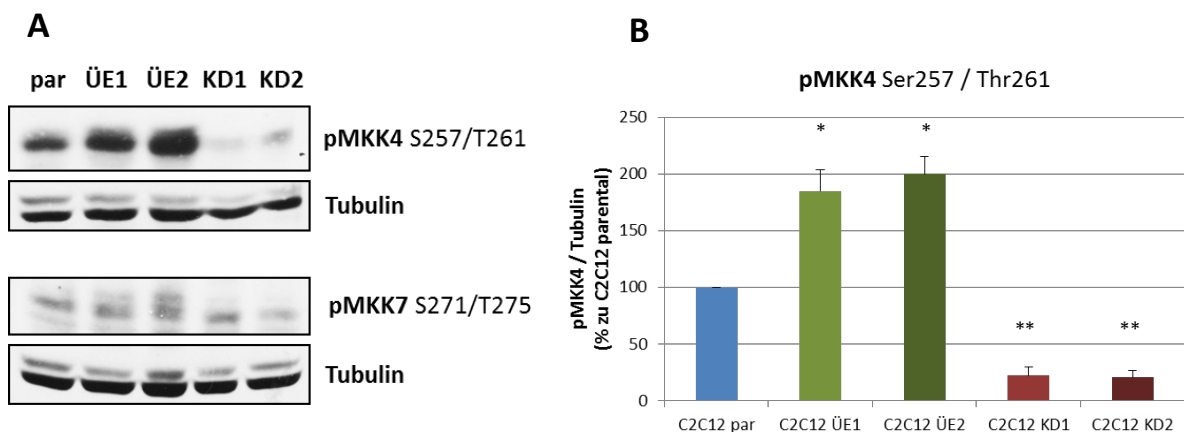


Abbildung 3.13: Die veränderte JNK-Aktivität wird wahrscheinlich durch die MKK4 vermittelt

(A) Repräsentative Western-Blots, welche die Phosphorylierung der MKK4 und MKK7 nach Überexpression bzw. Knockdown von Enigma im Vergleich zu parentalen C2C12 zeigen. (B) Densitometrische Auswertung der MKK4-Phosphorylierung. Die Werte wurden auf Tubulin normalisiert und im Verhältnis zu parentalen C2C12 angegeben. * $p < 0,05$ bzw. ** $p < 0,01$ bezeichnet eine Signifikanz zur Kontrolle (parentale C2C12) ($n=3$).

3.8. Die MAP3K MEKK1 könnte für die Veränderungen in den MAPK-Signalwegen verantwortlich sein

Der klassische Weg der Aktivierung von MAP Kinasen verläuft eine dreistufige Signalkaskade (MAP3K → MAP2K → MAPK) (Keshet und Seger, 2010, Cargnello und Roux, 2011). Im Falle von Erk1/2 beginnt diese Kaskade meist mit einem extrazellulären Signal. Typischerweise werden dadurch Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) aktiviert, die wiederum direkt oder über Adapterproteine, die MAP3K Raf aktivieren. Über eine Phosphorylierung/Aktivierung von MEK1 und MEK2 (auch als MKK1 und MKK2 bezeichnet) erfolgt schließlich die Phosphorylierung der MAPKs Erk1/2.

JNKs werden hingegen typischerweise durch extrazellulären oder intrazellulären Stress wie beispielsweise Zytokine, UV-Strahlung, Lipopolysaccharide (LPS) oder osmotischem Stress aktiviert (Davies, 2000). Sie werden deshalb auch als „Stresskinasen“ bezeichnet. Aber auch Wachstumsfaktoren können zu einer Aktivierung führen. Die p38-MAPK wird durch ähnliche Stimuli wie die JNKs aktiviert (Cuadrado und Nebreda, 2010). Meist sind die MAP3K, welche zur Aktivierung JNK und p38-MAPK führen, sogenannte MEKKs (MEKK 1-4).

Die MEKK1 ist eine Serin/Threonin Kinase, die im MAPK-Signalweg eine zentrale Rolle einnimmt. Frühere Arbeiten konnten zeigen, dass die MEKK1 direkt oder indirekt sowohl JNK (Zhang et al., 2012, Xu et al., 1997) und die p38-MAPK (Page et al., 2004) als auch Erk1/2 (Karandikar et al., 2000, Yujiri et al., 1998) aktivieren kann. Dabei kann die MEKK1 als eine Art scaffold-Protein fungieren und mit anderen Komponenten des MAPK-Signalweges sogenannte Signalosomen bilden.

Aufgrund dessen wurde als nächstes die MEKK1 Aktivität untersucht. Dabei wurde ein Phosphopeptid-spezifischer Antikörper, welcher an die aktivierte Kinase bindet, verwendet. Auch hier zeigten die Zellen mit Enigma-Überexpression eine ca. 1,6-fach erhöhte MEKK1-Aktivität. Wie erwartet war die Phosphorylierung der MEKK1 nach Enigma-Knockdown verringert (Abb. 3.14). Warum die phosphorylierte MEKK1 als Doppelbande vorlag ist nicht bekannt. Mögliche Gründe dafür könnten beispielsweise eine alternative Isoform oder zusätzliche Phosphorylierungen am Protein sein. Dies wurde jedoch nicht weiter untersucht.

Mit diesem Ergebnis konnte somit eine MAP3K identifiziert werden, die erstens durch veränderte Enigma-Expression in ihrer Aktivität verändert ist, und zweitens eine upstream Kinase von Erk1/2, JNK und der p38-MAPK darstellt.

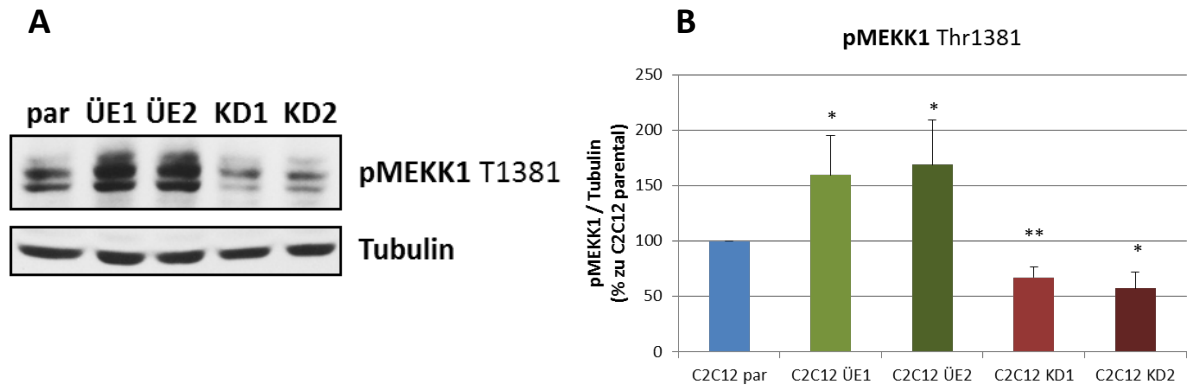


Abbildung 3.14: Die Aktivität der MAP3K MEKK1 ist nach Überexpression bzw. Knockdown von Enigma verändert

(A) Gezeigt ist die MEKK1 T1381 Phosphorylierung in einem repräsentativen Western-Blot nach Überexpression bzw. Knockdown von Enigma im Vergleich zu parentalen C2C12 zeigen. (B) Densitometrische Auswertung der MEKK1-Phosphorylierung. Die Werte wurden auf Tubulin normalisiert und im Verhältnis zu parentalen C2C12 angegeben. * $p < 0,05$ bzw. ** $p < 0,01$ bezeichnet eine Signifikanz zur Kontrolle (parentale C2C12) ($n=3$).

3.9. Die Effekte auf die MAPK-Signalwege werden nicht durch Rac1 vermittelt

Es konnte gezeigt werden, dass das Expressionslevel von Enigma Auswirkungen auf Komponenten der MAPK-Signalwege hat. Interessanterweise waren die Effekte einer Überexpression auf die Aktivität von Erk1/2 im Vergleich zu den parentalen Zellen stärker von der PI3K abhängig. Daher kann angenommen werden, dass Enigma an einem Crosstalk zwischen der PI3K und dem MAPK-Signalweg beteiligt ist oder diesen sogar vermittelt.

Rac1 ist ein kleines G-Protein und gehört zu der Familie der Rho GTPasen. Es kann über die PI3K indirekt durch Rac1-GEFs aktiviert werden. In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass Rac1 eine Verknüpfung zwischen dem PI3K- und den MAPK-Signalwegen darstellen kann. Sowohl Effekte auf JNK (Coso et al., 1995) und die p38-MAPK (Zhang et al., 1995) als auch auf den MEK-Erk1/2-Signalweg (Ebi et al., 2013) sind beschrieben. Außerdem ist bekannt, dass Rac1 mit der MEKK1 interagiert (Fanger et al., 1997). Damit stellt Rac1 ein interessantes Protein dar, welches die PI3K-abhängigen Effekte von Enigma auf die MAPK-Signalwege weiter erklären könnte.

Um dies zu untersuchen wurden die parentalen C2C12 und die Zellen mit Überexpression bzw. Knockdown für unterschiedliche Zeiten mit 100 μ M NSC23766 behandelt und anschließend mittels Western-Blot Analysen der Phosphorylierungsstatus der einzelnen

MAPKs angeschaut. NSC23766 inhibiert nicht Rac1 direkt, sondern verhindert eine Aktivierung (GTP Bindung) durch spezifische Rac-GEFs. Dabei werden die verwandten Rho GTPasen RhoA und CDC42 nicht beeinflusst. Wie in Abbildung 3.15 zu sehen ist hatte der Rac1-Inhibitor keinen Einfluss auf die Phosphorylierung der untersuchten Kinasen. Auch eine längere Inkubation mit dem Inhibitor von bis zu 14 h zeigte keinen Einfluss (nicht gezeigt). Damit kann ausgeschlossen werden, dass Enigma einen möglichen Crosstalk zwischen dem PI3K-Signalweg und dem MAPK-Signalweg über Rac1 vermittelt.

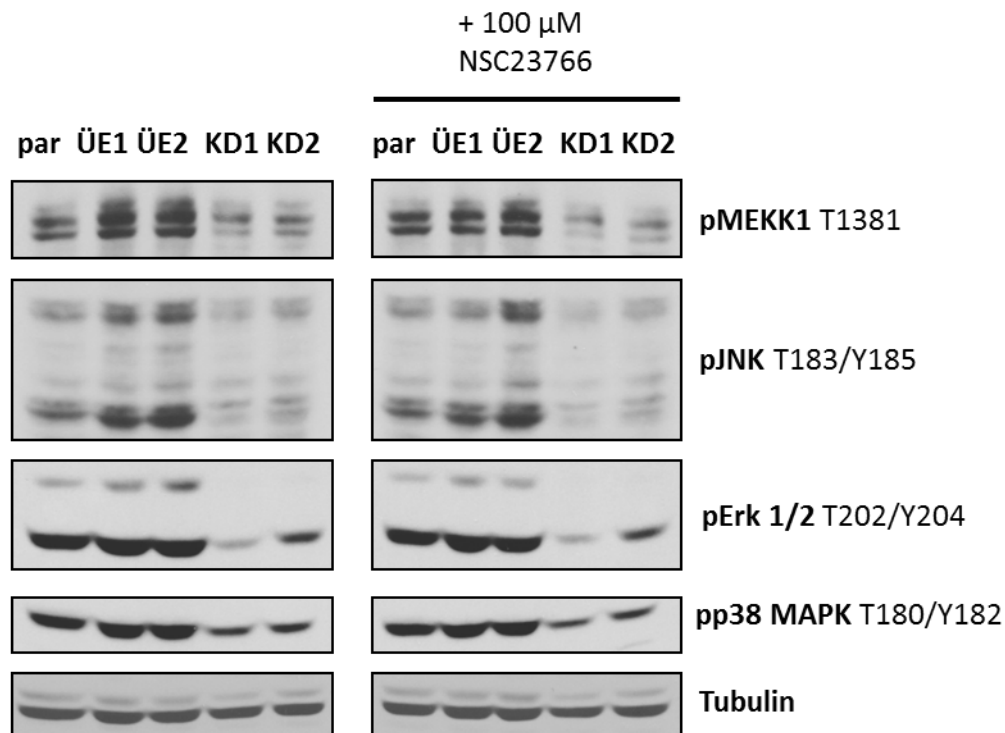


Abbildung 3.15: Rac1 hat keinen Einfluss auf die Effekte von Enigma

Die Zellen wurden für 4 h mit 100 μ M NSC23766 behandelt und anschließend lysiert und das Gesamtzelllysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Gezeigt ist ein repräsentativer Western-Blot zur Analyse der Phosphorylierungszustände von Erk1/2, JNK, p38-MAPK und MEKK1 vor und nach Rac1-Inhibierung.

3.10. Intrazelluläre Lokalisation von Enigma

Es ist bekannt, dass Enigma mit dem Aktinzytoskelett assoziiert ist (Barres et al., 2005). In 3T3-L1 Adipozyten konnte außerdem gezeigt werden, dass Enigma hauptsächlich an der Plasmamembran lokalisiert ist (Barres et al., 2006). In diesem Abschnitt sollte mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden, wie Enigma in C2C12 Myoblasten verteilt ist, und ob die Verteilung bei Überexpression oder Knockdown verändert ist. Dazu wurden die Zellen auf Glasplättchen kultiviert. Es folgte eine Immunfärbung von Enigma mit einem primären Antikörper gegen Enigma, gefolgt von einem FITC-konjugierten sekundären

Antikörper. Aktin wurde mittels Rhodamin-Phalloidin angefärbt. Die Aufnahmen der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie zeigten, dass Enigma in den parentalen Myoblasten gleichmäßig innerhalb der Zellen verteilt ist (Abb. 3.16B). Außerdem ist eine Co-Lokalisation mit dem Aktinzytoskelett zu erkennen (Abb. 3.16A).

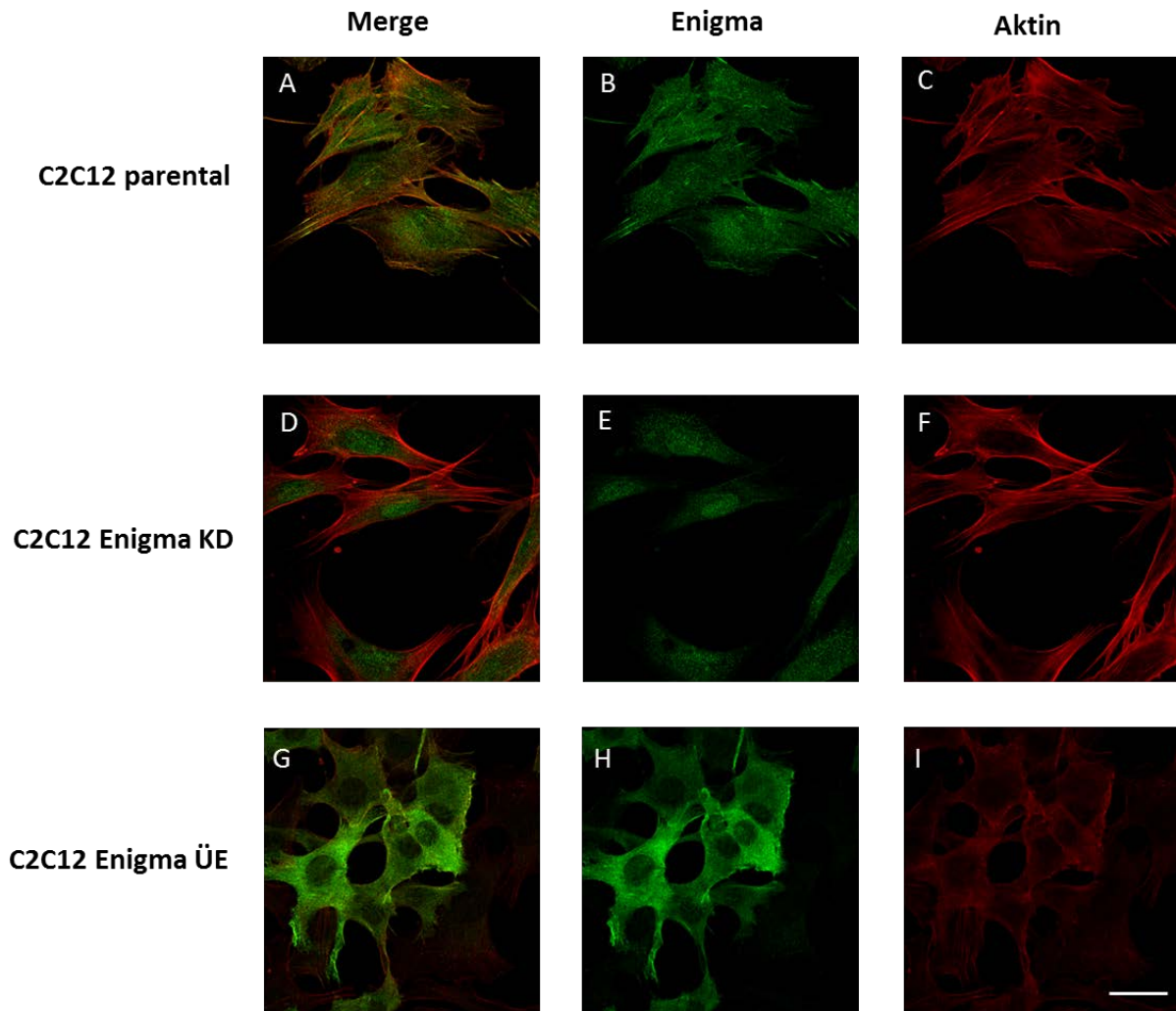


Abbildung 3.16: Intrazelluläre Lokalisation von Enigma in parentalen C2C12, sowie nach Überexpression und Knockdown

Die Zellen wurden auf Glasplättchen fixiert und Enigma mit spezifischen Antikörpern gefärbt (B, E, H). Es folgte eine Aktinfärbung mittels Rhodamin-Phalloidin (C, F, I). Die Aufnahmen wurden mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. Der Maßstabsbalken entspricht 20µM.

Im Vergleich dazu war Enigma in den Zellen mit stabilem Knockdown hauptsächlich im und um den Zellkern detektierbar (Abb. 3.16E). Die Zellen mit stabiler Enigma-Überexpression wiederum zeigten eine stärkere Präsenz von Enigma in der Zellperipherie. Der Eindruck als ob Enigma in diesen Zellen nicht mehr im Zellkern vorliegt täuscht etwas. Eventuell wird das

Signal von Enigma im Zellkern von dem generell überexprimierten Enigma im Zytoplasma überlagert. Somit scheint sich die Überexpression bzw. der Knockdown hauptsächlich auf die zytosolische Enigma-Konzentration auszuwirken. Diese Ergebnisse zeigen, dass Enigma in C2C12 Myoblasten auch an der Plasmamembran, wo upstream Komponenten des Akt- oder Erk1/2 Signalweges wie die PI3K bzw. Ras/Raf lokalisiert sind, vorkommt. Dies könnte eine Erklärung für die unterschiedlichen Effekte eines Knockdown bzw. einer Überexpression auf die IRS1-Tyrosinphosphorylierung und die Erk1/2 Phosphorylierung sein.

3.11. Auswirkungen von Überexpression bzw. Knockdown von Enigma auf Endpunkte der PI3K- und MAPK-Signalwege

3.11.1. Überexpression von Enigma resultiert in einer leicht erhöhten Proliferationsrate

Die bisherigen Ergebnisse konnten zeigen, dass sich ein verändertes Expressionslevel von Enigma auf die Aktivierung von Erk1/2 und Akt auswirkt. Um zu untersuchen, ob Enigma dadurch einen Einfluss auf das Zellwachstum der C2C12-Zellen hat, wurde eine Proliferationsanalyse anhand von BrdU-Inkorporation gemacht. Dafür wurden die Zellen für unterschiedliche Zeiten kultiviert und dann wie unter 2.3.3.9 beschrieben mit Bromdesoxyuridin inkubiert. Die Messung erfolgte spektralphotometrisch. Wie in Abbildung 3.17 zu sehen ist, zeigte die C2C12 ÜE1 Zelllinie eine leicht erhöhte Proliferationsrate im Vergleich zu parental Zellen. Ein signifikanter Effekt war allerdings erst nach 72 h Kultur zu beobachten. Die zweite Zelllinie mit Überexpression (C2C12 ÜE1) wies ebenfalls ein tendenziell erhöhtes Zellwachstum auf, allerdings waren die Messwerte hier, bezogen auf die parental Zellen, nicht signifikant erhöht. Ein Knockdown führte zu keiner signifikanten Veränderung des Zellwachstums, obwohl auch hier nach 72h eine eher erhöhte BrdU-Inkorporation gemessen wurde. Diese Ergebnisse legen nahe, dass das leicht erhöhte Zellwachstum nach Enigma-Überexpression eventuell aufgrund des erhöhten mitogenen Signals via Erk1/2 und Akt zustande kommt.

Ergebnisse

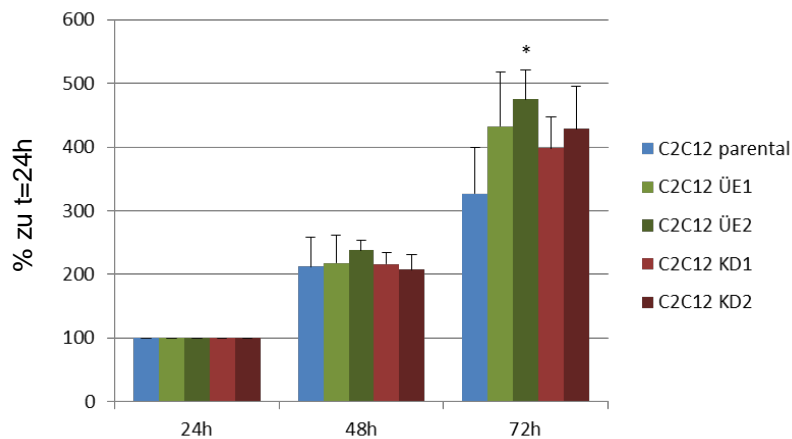


Abbildung 3.17: Überexpression von Enigma hat einen leichten Einfluss auf das Zellwachstum

Die Zellen wurden in einer 96-Lochplatte ausgesät und für 3 Tage kultiviert. Nach 24, 48 und 72 h wurde ein BrdU-Proliferationsassay durchgeführt und spektralphotometrisch analysiert. Die Werte nach 48 h und 72 h wurden in Bezug auf den jeweiligen 24h-Wert angegeben. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD aus 4 unabhängigen Experimenten, die jeweils als Triplikate durchgeführt wurden. * $p < 0,05$ bezeichnet eine Signifikanz zu den parental C2C12 zum jeweiligen Messzeitpunkt.

3.11.2. Enigma hat Einfluss auf die induzierte Apoptose in diesen Zellen

Für Enigma wurde gezeigt, dass es in Leberzellen mit MDM2 interagiert und dadurch eine selbst-Ubiquitinierung von MDM2 hemmt. Eine Überexpression von Enigma führte dabei zu erhöhten MDM2-Proteinmengen. Dies hatte wiederum einen verstärkten proteasomalem Abbau von p53 durch die erhöhte MDM2-Proteinmenge, und schlussendlich einen anti-apoptotischen Effekt zufolge (Jung et al., 2010). Ob dies auch in Myoblasten der Fall ist wurde mittels Western-Blot Analysen untersucht. Es konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede in der p53 Proteinmenge zwischen den parental und den Zellen mit Überexpression bzw. Knockdown festgestellt werden (Abb. 3.18).

Weiterhin sollte untersucht werden ob die durch Enigma hervorgerufenen Veränderungen im PI3K- und MAPK-Signalweg Auswirkungen auf eine induzierte Apoptose in den Myoblasten haben. Es ist bekannt, dass die MAPK-Signalwege sowohl anti- als auch pro-apoptotische Effekte vermitteln (Chang et al., 2003, Wada und Penninger, 2004, Lu und Xu, 2006). Auch der PI3K-Signalweg spielt hier einen Rolle (Franke et al., 2003, Chang et al., 2003).

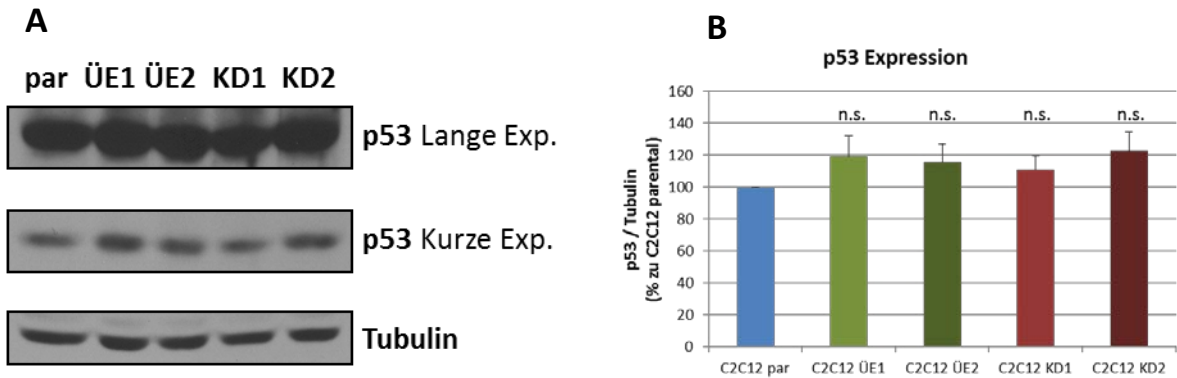


Abbildung 3.18: Die p53 Expression ist nicht signifikant verändert

(A) Repräsentativer Western-Blot zur p53-Expression. (B) Densitometrische Auswertung der p53 Expression von 3 unabhängigen Western-Blot Analysen. Die Werte wurden auf Tubulin normalisiert und im Verhältnis zu parentalen C2C12 angegeben. (n.s. = nicht signifikant).

Für die Versuche wurde der physiologische Apoptose-Induktor Stearat verwendet. Stearat ist eine gesättigte Fettsäure, die in Muskelzellen Lipotoxizität und Apoptose bedingen kann (Artwohl et al., 2009). Die Zellen wurden dazu auf Glasplättchen ausgesät und für 21 h mit 500 μ M Stearat, welches zuvor an BSA gekoppelt wurde, kultiviert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mittels TUNEL-Färbung die apoptotischen Zellkerne angefärbt. Zusätzlich wurde eine Gegenfärbung mit DAPI gemacht um die apoptotischen Zellen im Verhältnis zu nicht-apoptotischen Zellen berechnen zu können.

Die Experimente zeigten, dass sowohl die Enigma-überexprimierenden Zellen als auch die Myoblasten mit Knockdown eine erhöhte Apoptoseantwort auf Stearat im Vergleich zu den parentalen Zellen zeigten (Abb. 3.19). Den deutlichsten apoptotischen Phänotyp zeigten hierbei die C2C12-Myoblasten mit einem Knockdown. Ca. 45 % der Zellen waren hier TUNEL-positiv. Die Enigma-überexprimierenden Myoblasten waren ebenfalls anfälliger für die Stearat-induzierte Apoptose (30 % bzw. 24 % TUNEL-positive Zellen) verglichen zu den parentalen C2C12-Zellen (19 % TUNEL-positive Zellen).

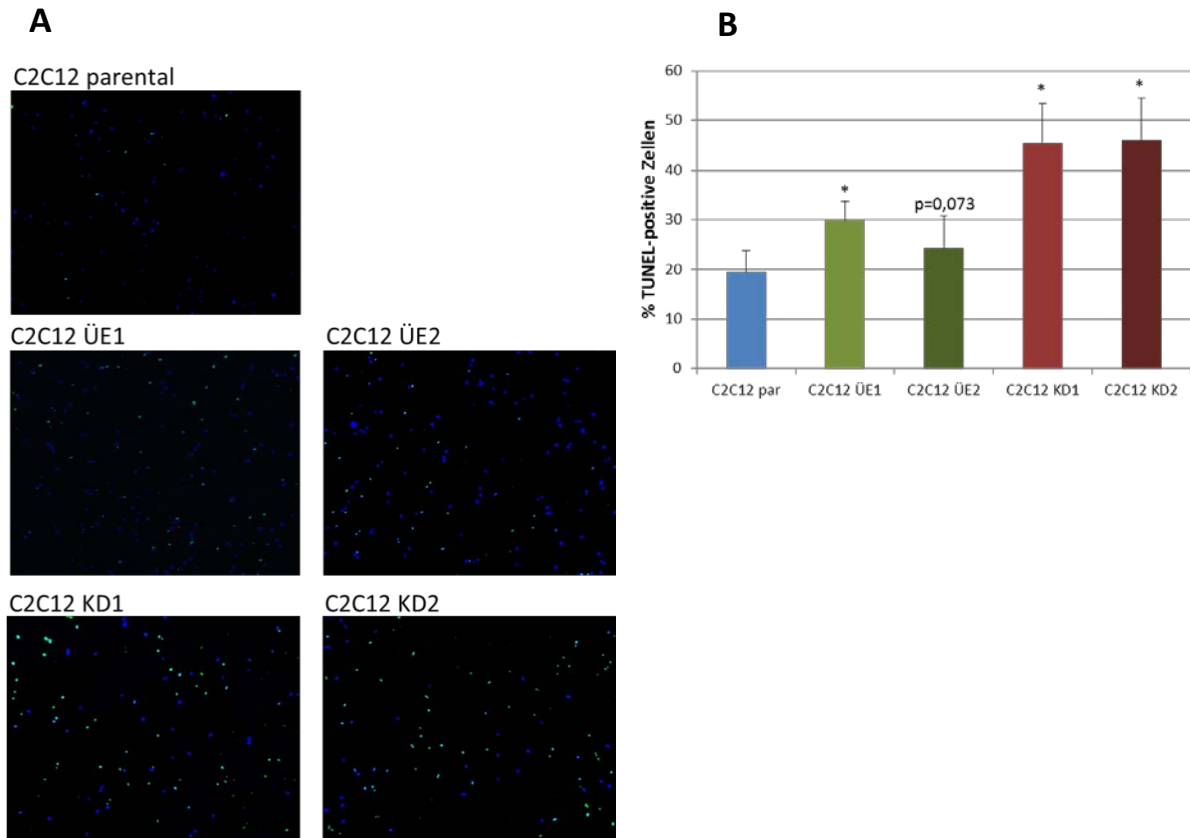


Abbildung 3.19: Eine veränderte Enigma-Expression hat Auswirkungen auf die Stearat-induzierte Apoptose

Die Zellen wurden auf Glasplättchen kultiviert und für 21 h mit 500 μ M Stearat behandelt. Es folgte eine TUNEL-Färbung und DAPI-Gegenfärbung zur fluoreszenzmikroskopischen Analyse der apoptotischen Zellen. (A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen mit TUNEL-positiven Zellkernen (grün) und DAPI-gefärbten Zellkernen (blau). (B) Mittelwerte \pm SD der TUNEL-positiven Zellen aus 3-4 unabhängigen Experimenten (n = mindestens 1959 ausgezählte Zellkerne). *p<0,05 bezeichnet eine Signifikanz zur Kontrolle (parentale C2C12).

3.11.3. Die Expression wichtiger Gene für die mitochondriale Funktion ist dereguliert

Um die Ursache für die erhöhte Lipotoxizität in den Zellen mit veränderter Enigma-Expression weiter zu ergründen, sollte die Expression wichtiger Gene für die mitochondriale Funktion angeschaut werden. Es ist bekannt, dass eine erhöhte Lipotoxizität mit einer reduzierten mitochondrialen Funktion im Zusammenhang steht (Schrauwen et al., 2010, Rial et al., 2010). Zu diesem Zweck wurde mRNA aus den Myoblasten isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qRT-PCR quantitativ die mRNA-Expression bestimmt. RPS13 wurde als Referenzgen verwendet.

Zunächst wurde die Expression von PGC-1 α (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*) untersucht. Gewebe mit hoher metabolischer Rate, wie das Herz, Fettgewebe und der Muskel, besitzen eine starke PGC-1 α Expression. PGC-1 α fungiert als transkriptioneller Co-Aktivator von PPARs (*Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren*) und aktiviert die Expression von Genen, die am Fettsäuremetabolismus beteiligt sind (Finck und Kelly, 2006). Während nach Überexpression von Enigma eine nicht signifikante, aber tendenziell erhöhte PGC-1 α Expression gemessen wurde, konnte interessanterweise bei den Zellen mit Knockdown keine PGC-1 α mRNA detektiert werden (Abb. 3.20A). Es scheint also, dass ein Enigma-Knockdown tatsächlich drastische Auswirkungen auf den Fettsäuremetabolismus und/oder die Mitochondrienfunktion in C2C12 Myoblasten hat.

NRF1 (*nuclear respiratory factor 1*) ist ein Transkriptionsfaktor der von PGC-1 α reguliert wird. Dadurch reguliert NRF1 wichtige nukleäre Gene, welche für die Funktion von Mitochondrien von Bedeutung sind (Scarpulla, 2008). Im Einklang mit den Beobachtungen zur PGC-1 α Expression war auch die Expression von NRF1 bei den Zellen mit Enigma-Knockdown reduziert. Die überexprimierenden Zellen wiesen eine ähnliche Expression wie die parentalen C2C12 auf (Abb. 3.20E).

Ein Zielgen, das von NRF1 und PGC-1 α reguliert wird ist der *mitochondriale Transkriptionsfaktor A* (TFAM). TFAM bindet an Promotorregionen von mitochondrialen Genen und unterstützt dadurch ihre Transkription (Kang et al., 2007). Es stellt daher eine zentrale Komponente zur Aufrechterhaltung der mitochondrialen Funktion dar. Auch hier wurde eine tendenziell geringere mRNA Expression nach Knockdown, bzw. eine leicht erhöhte Expression nach Überexpression festgestellt (Abb. 3.20B).

Zusätzlich zu diesen Genen wurde die Expression weiterer, an der Erhaltung der Mitochondrien-Funktion beteiligter Gene, untersucht. Das *uncoupling protein 2* (UCP2) ist das im Skelettmuskel am stärksten exprimierte UCP. Es kann beispielsweise bei Substratüberschuss eine Reduzierung des Protonengradienten bewirken. Auch eine Rolle bei der Regulation von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) ist beschrieben (Arsenijevic et al., 2000). Bei der mRNA Expression des UCP2 zeigten sich erneut Unterschiede zwischen den Zelllinien. Die Zellen mit Knockdown wiesen eine tendenziell höhere Expression als die parentalen Zellen auf. Die Messwerte der unabhängigen Experimente führten dabei jedoch zu einer großen Standardabweichung, weswegen hier keine Signifikanz erkennbar war. Im Gegensatz dazu war die UCP2-Expression in den überexprimierenden C2C12 leicht niedriger im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb. 3.20D).

Ergebnisse

Weiterhin wurde die mRNA Expression der *superoxide dismutase 2* (SOD2) untersucht. Die SODs spielen beim Abbau von ROS eine Rolle und haben somit protektive, anti-apoptotische Eigenschaften (Pias et al., 2003). Dabei konnte beobachtet werden, dass die Zellen mit Enigma-Knockdown eine geringere mRNA-Expression aufweisen (Abb. 3.20C). Dies könnte eine Erklärung für die erhöhte Apoptoserate in diesen Zellen darstellen.

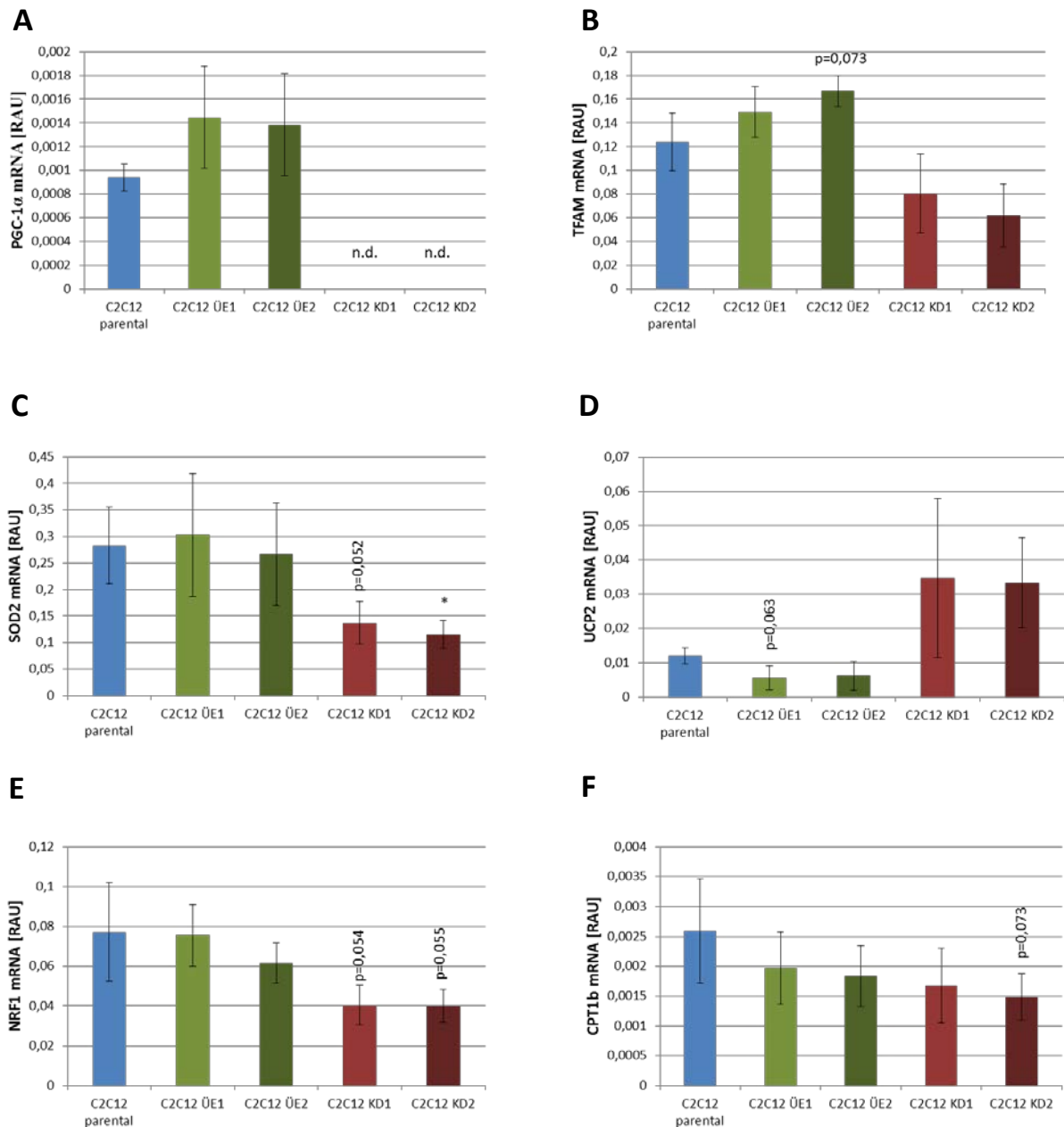


Abbildung 3.20: Veränderte mRNA Expression einiger Gene, welche für die mitochondriale Funktion wichtig sind

Parentale und die in der Enigma-Expression veränderten Zellen wurden in 6-Lochschalen bis zu ca. 80-90 %iger Konfluenz kultiviert. Anschließend wurde die RNA wie in 2.3.1.4. beschrieben isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die mRNA-Expressionslevel von (A) PGC-1 α , (B) TFAM, (C) SOD2, (D) UCP2, (E) NRF1 und (F) CPT1b wurden mittels qRT-PCR aus drei unabhängigen Versuchen ermittelt. Die mRNA-Mengen wurden in Bezug auf das Haushaltsgen Rps13 bestimmt und als relative arbitrary units [RAU] angegeben. *p<0,05 bezeichnet eine Signifikanz zu den parentalen C2C12. (n.d. = nicht detektierbar).

Ein weiteres wichtiges Protein, das bei metabolischen Krankheiten wie Diabetes dereguliert ist, ist die *carnitine palmitoyltransferase I* (CPT1). Sie ist wichtig für den Transport langkettiger Fettsäuren in die Mitochondrien, und somit an der β -Oxidation von Fettsäuren beteiligt. In Säugetieren existieren drei Isoformen, wobei die CPT1b die Muskel-spezifische Isoform darstellt. Um zu untersuchen ob in den veränderten Zelllinien eventuell ein gestörter Fettsäureimport vorliegt und diese Zellen dadurch die großen Mengen an Stearat nicht verarbeiten können, wurde die mRNA-Menge von CPT1b bestimmt. Auch hier war bei den Mittelwerten eine leichte Tendenz zu einer niedrigeren Expression, sowohl nach Überexpression als auch nach Knockdown, zu erkennen (Abb. 3.20F). Jedoch waren die Expressionslevel nicht signifikant verschieden.

Zusammenfassend zeigen diese Experimente, dass eine veränderte Expression von Enigma die Expression einiger wichtiger Gene für die Funktion der Mitochondrien beeinflusst. Dies könnte ein Grund sein, warum v.a. die Knockdown-Zellen eine erhöhte Apoptose nach Behandlung mit Stearat zeigten. Die Ergebnisse der mRNA Expressionsanalysen von SOD2 und UCP2 könnten beispielsweise auf eine erhöhte Bildung von ROS hinweisen und die nicht detektierbare PGC-1 α Expression in den Knockdown-Zellen auf eine generell gestörte mitochondriale Aktivität hindeuten.

3.11.4. Eine veränderte Enigma-Expression führt zu einer gestörten Differenzierung der C2C12 Myoblasten zu Myotuben

Es ist bekannt, dass die MAPK-Signalwege Einfluss auf die Differenzierung von Muskelzellen haben (Kontaridis et al., 2002, Khurana und Dey, 2004, Wang et al., 2008). In diesem Abschnitt sollte untersucht werden, ob die beobachteten Veränderungen in den MAPK-Signalwegen nach Überexpression bzw. Knockdown von Enigma einen Einfluss auf das Differenzierungspotential dieser Zellen haben.

Die Zellen wurden in 6-Lochschalen kultiviert und nach Erreichen von ca. 70 %iger Konfluenz auf Differenzierungsmedium (0,5 % FCS) gesetzt. Die Aufnahmen aus Abbildung 3.21 wurden an Tag 7 der Differenzierung gemacht. Wie zu sehen ist, waren die parentalen Zellen zu diesem Zeitpunkt zu Myotuben ausdifferenziert. Die Zellen mit Überexpression von Enigma zeigten dagegen eine gestörte Myogenese. Hier waren nur vereinzelt und kleinere Myotuben zu erkennen. Die Zellen mit Knockdown waren dagegen drastisch in ihrer Fähigkeit zur Differenzierung gestört. Bei diesen Zellen konnte beobachtet werden, dass sie trotz Serumentzug weiterwuchsen und anscheinend auch in der Kontaktinhibition gestört waren. Die mit den entsprechenden Leervektoren transfizierten Myoblasten wiesen dagegen keine gestörte Differenzierung zu Myotuben auf (siehe Supplementary Abb.3.29).

Ergebnisse

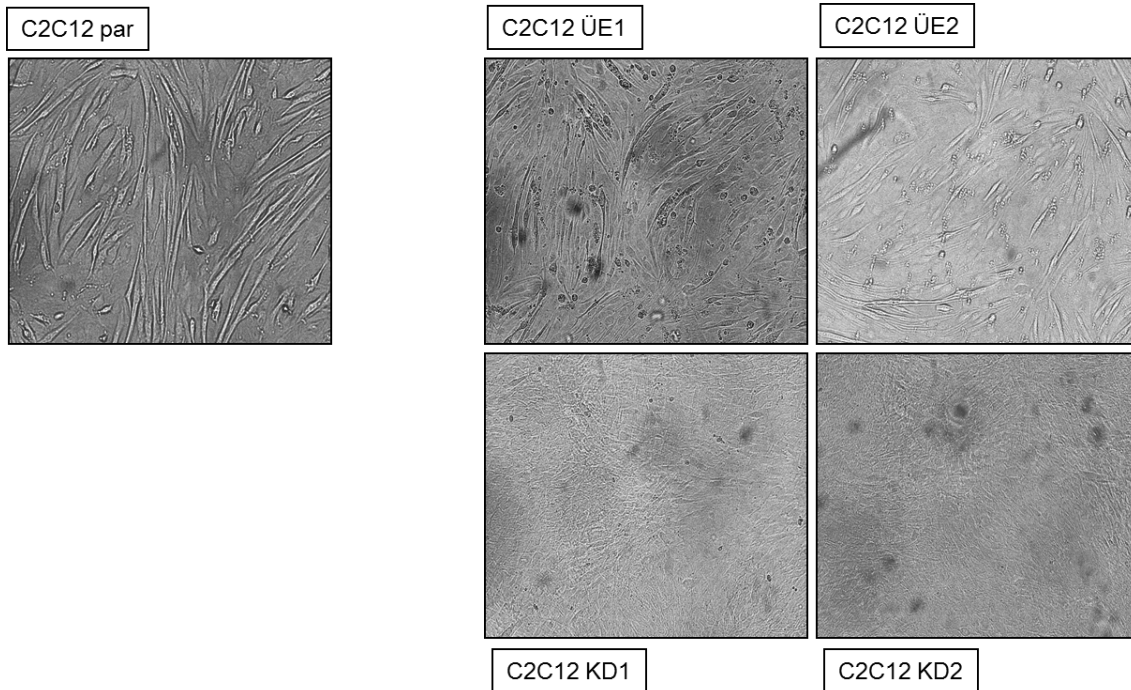


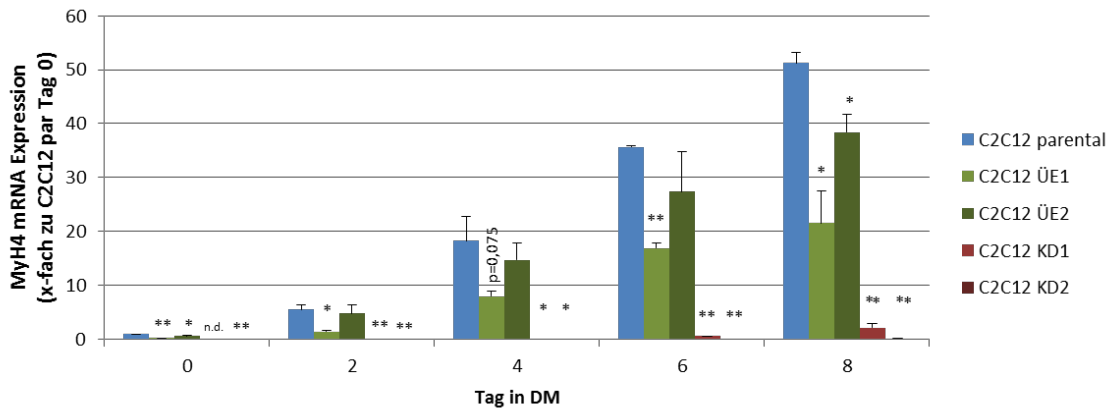
Abbildung 3.21: Gestörte Differenzierung zu Myotuben

Die Zellen wurden in 6-Lochschalen bis zu einer Konfluenz von ca. 70 % kultiviert und dann auf Differenzierungsmedium (DM) gewechselt (0,5 % FCS). Gezeigt sind Phasenkontrast Aufnahmen nach 7 Tagen in DM-Medium.

Um die Ursachen der gestörten Myogenese zu ergründen wurde nun die Regulation von einigen MRFs (*myogenic regulatory factors*) untersucht. Nach Serumentzug wird normalerweise die Transkription bestimmter MRFs sequenziell hochreguliert (Rescan, 2001). Dadurch wird ein komplexes Netzwerk an Genen aktiviert und die Differenzierung eingeleitet.

Für diese Versuche wurden die Zellen wieder in 6-Lochschalen kultiviert und auf Differenzierungsmedium gesetzt. An Tag 0 und jeden zweiten Tag der Differenzierung wurde die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qRT-PCR die mRNA Expression einiger Differenzierungsmarker bestimmt. Zunächst wurde die mRNA-Expression des terminalen Differenzierungsmarkers MyH4 untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Myoblasten mit Enigma-Knockdown so gut wie keine MyH4 mRNA exprimieren (Abb. 3.22A). Dies war zu erwarten, da bei diesen Zellen keine Myotuben zu beobachten waren (vgl. Abb. 3.21). Im Gegensatz dazu wiesen die Enigma-überexprimierenden Myoblasten einen Anstieg der MyH4 mRNA während des Messzeitraumes auf. Dieser Anstieg war verglichen mit der MyH4-Expression der parentalen Zellen jedoch geringer (Abb. 3.22A).

A



B

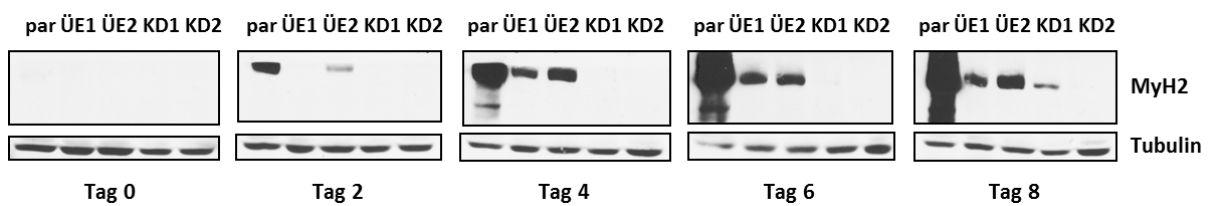


Abbildung 3.22: Reduzierte Expression der terminalen Differenzierungsmarkers MyH4 und MyH2

Die Zellen wurden in gleicher Zellzahl in 6-Lochschalen bis zu einer Konfluenz von ca. 70 % kultiviert und dann auf Differenzierungsmedium gesetzt. An Tag 0, 2, 4, 6 und 8 wurden jeweils die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben, sowie Zelllysate für die Western-Blot Analyse der MyH2 Proteinexpression (B) gemacht. Die Quantifizierung der mRNA-Expression (A) erfolgte mittels qRT-PCR. Die mRNA-Expression von MyH4 wurde jeweils auf das Haushaltsgen Rps13 normalisiert und im Verhältnis zur Expression der parentalen Zellen an Tag 0 angegeben. * $p < 0,05$ bzw. ** $p < 0,01$ bezeichnet einen signifikanten Unterschied der mRNA-Expression zu den parentalen Zellen des jeweiligen Messzeitpunktes.

Da, vor allem bei der Zelllinie C2C12 ÜE2, die MyH4 mRNA-Expression noch relativ hoch war aber nur wenige Myotuben ausgebildet waren, wurde zusätzlich die Proteinexpression einer weiteren MyH-Isoform (MyH2) angeschaut. Im Western-Blot aus Abbildung 3.22B ist zu sehen, dass die Proteinexpression von MyH2 im Vergleich zu den parentalen C2C12 stark reduziert war. Außerdem bestätigt die Western-Blot Analyse die kaum vorhandene *myosin heavy chain* Expression in den Knockdown-Zellen.

Ein wichtiger Schritt damit die Differenzierung von C2C12 Myoblasten zu Myotuben eingeleitet wird, ist der Zellzyklusstop. Dieser wird unter anderem durch die erhöhte Expression von p21 vermittelt (Guo et al., 1995). Abbildung 3.23A zeigt, dass die p21 Expression konstant ansteigt. Allerdings zeigten sowohl die Überexprimierer als auch die Knockdown-Zellen signifikant niedrigere Mengen. Vor allem in den Zellen mit Enigma-Knockdown konnte selbst nach 8 Tagen in DM kein deutlicher Anstieg der p21 Expression detektiert werden.

Zu den Genen, die früh während der Myogenese hochreguliert werden, zählt auch der Transkriptionsfaktor Myf5. Wie in Abbildung 3.23B zu sehen ist, erreichte die Myf5 mRNA-Expression in den parental Zellen schon nach zwei Tagen das Maximum und ging im weiteren Verlauf der Differenzierung wieder zurück. Bei den Enigma-überexprimierenden Zellen blieb die Expression allerdings konstant hoch. Die Knockdown-Zellen wiederum zeigten geringere Mengen an Myf5, wobei bei der Zelllinie C2C12 KD2 kaum ein Anstieg zu beobachten war.

Ein weiterer muskelspezifischer Transkriptionsfaktor, der für die Koordination der Differenzierung und die Fusion in mehrkernige Myotuben verantwortlich ist, ist Myogenin. Die quantitative Bestimmung der mRNA Expression zeigte hier eine drastische Reduktion in den veränderten Zellen (Abb. 3.23C). Dies könnte eine weitere Erklärung für die reduzierte (nach Enigma ÜE) bzw. nicht vorhandene (nach Enigma KD) Fusion der Zellen sein.

Zusammenfassend konnten diese Ergebnisse eine gestörte Expression wichtiger Regulatoren der Differenzierung von Myoblasten zu Myotuben aufzeigen. Die stark reduzierten Expressionen von p21 und Myogenin sind dabei ein Hinweis auf eine gestörte Initiation der Myogenese sein, wodurch dann die spätere Expression myogener Proteine, wie beispielsweise die MyHs, eingeschränkt ist.

Ergebnisse

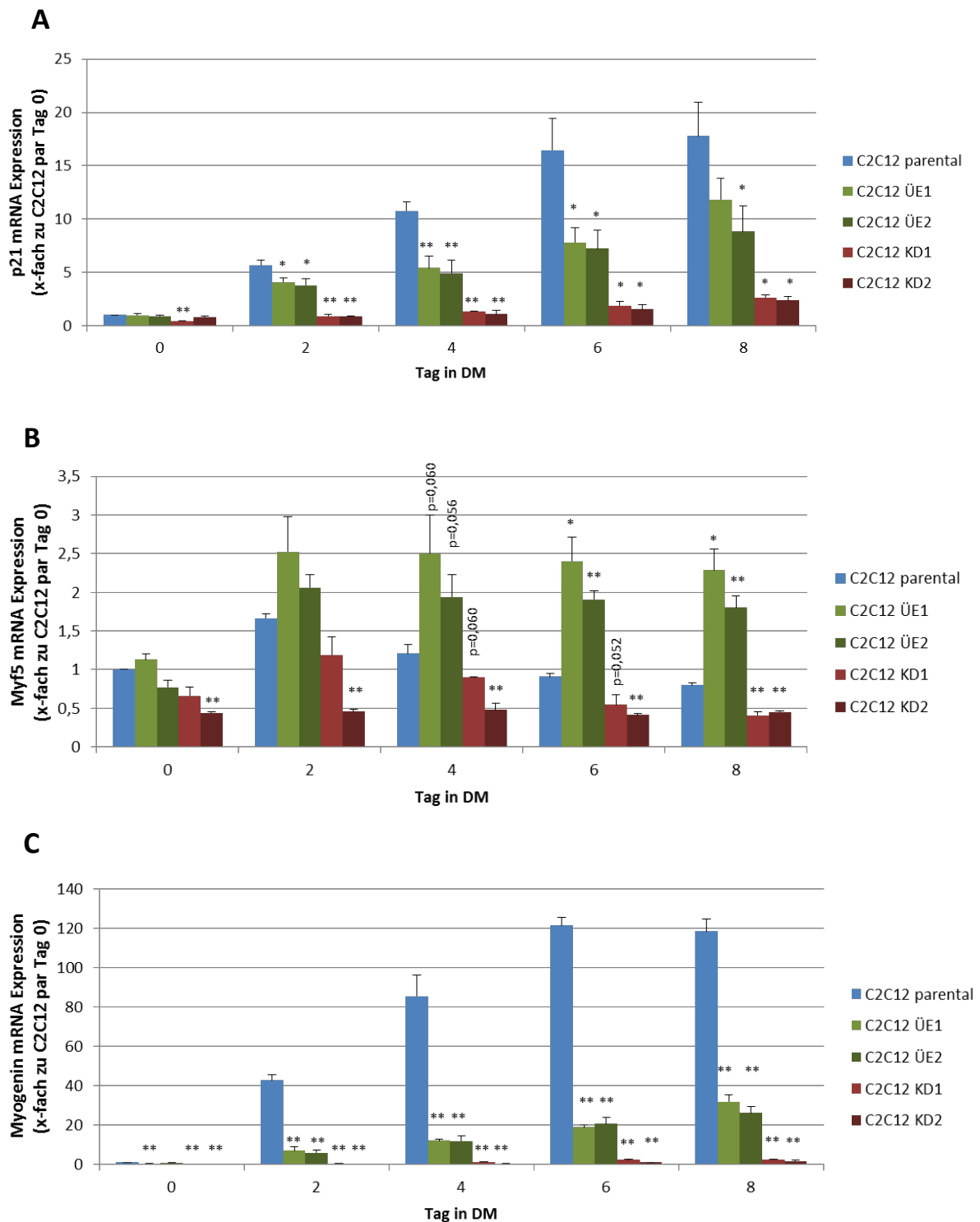


Abbildung 3.23: mRNA Expression wichtiger Regulatoren der Myogenese an unterschiedlichen Zeitpunkten während des Differenzierungsprozesses

Die Zellen wurden in gleicher Zellzahl in 6-Lochschalen bis zu einer Konfluenz von ca. 70 % kultiviert und dann auf Differenzierungsmedium gesetzt. An Tag 0, 2, 4, 6 und 8 wurde jeweils die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die Quantifizierung erfolgte mittels qRT-PCR. Die mRNA-Expression von (A) p21, (B) Myf5 und (C) Myogenin wurde jeweils auf das Haushaltsgen Rps13 normalisiert und im Verhältnis zur Expression der parentalen Zellen an Tag 0 angegeben. * $p < 0,05$ bzw. ** $p < 0,01$ bezeichnet einen signifikanten Unterschied der mRNA-Expression zu den parentalen Zellen des jeweiligen Messzeitpunktes.

Ein weiteres Protein, das mit der Differenzierung von Muskelzellen in Verbindung gebracht wird, ist die *focal adhesion kinase* (FAK) (Clemente et al., 2005). Die FAK wird durch Zell-Zell-Kontakte oder Interaktionen mit der extrazellulären Matrix (ECM) reguliert. Die mikroskopischen Aufnahmen der Myoblasten mit Enigma-Knockdown (vgl. Abb.3.21) lassen eine gestörte Kontaktinhibierung dieser Zellen vermuten. Daher wurde die Aktivierung dieser Kinase untersucht. Die Zellen wurden dazu bis zur Konfluenz kultiviert, lysiert und das Gesamtzelllysat mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Western-Blot Analyse zeigte jedoch keine deutliche Veränderung der FAK-Phosphorylierung (Abb. 3.24). Daraus kann geschlossen werden, dass der beobachtete Phänotyp nach Enigma-Knockdown nicht durch die FAK vermittelt wird.

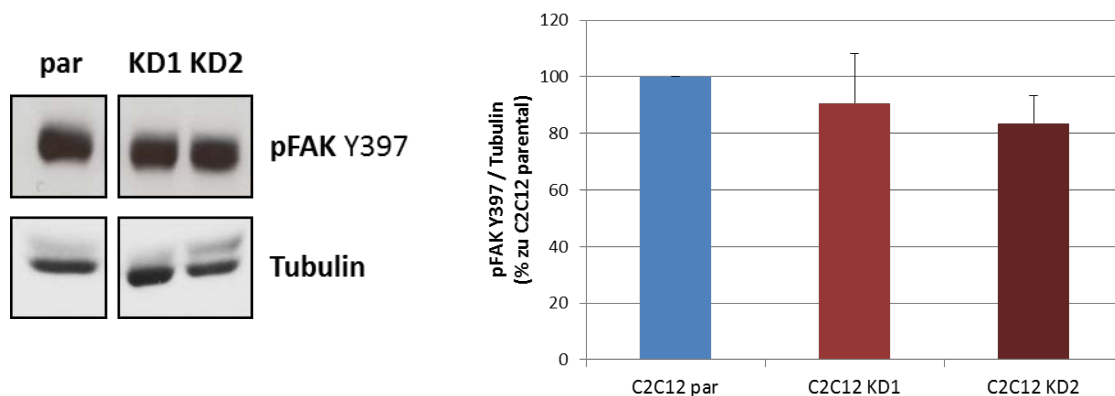


Abbildung 3.24: Der Verlust der Kontaktinhibierung wird nicht von der FAK vermittelt

(A) Repräsentativer Western-Blot zur FAK-Aktivierung in den Knockdown-Zellen. (B) Densitometrische Auswertung von drei Western-Blot Analysen. Die Werte wurden auf Tubulin normalisiert und sind im Verhältnis zu den parentalen Zellen angegeben.

3.12. Variationen im Enigma Gen haben Auswirkungen auf die Insulinsensitivität

Im Laufe dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Enigma einen Einfluss auf manche Komponenten des Insulinsignalweges (IRS1, Akt, Erk1/2) sowie Regulatoren der mitochondrialen Funktion bzw. β -Oxidation in Maus-Myoblasten hat. Basierend auf diesen molekularen Ergebnissen sollte anhand von Patientendaten aus der *Tübingen Family study for type 2 diabetes* (TÜF) untersucht werden, ob Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) im humanen Enigma-Genlokus mit wichtigen metabolischen Parametern assoziiert sind. Dazu wurden lineare Regressionsanalysen gemacht, in denen die einzelnen Parameter (FFAM10, HOMA-IR, ISI-Mats, ISI-joined, VO2MAX, HPA und Blutzucker als

Ergebnisse

Zielvariable und der jeweilige SNP-Genotyp als unabhängige Variable gewählt wurde. Die Daten der SNP-Genotypisierungen wurden von Dr. Fausto Machichao zur Verfügung gestellt. Das Geschlecht, das Alter und der *body mass index* (BMI) wurden als mögliche Störvariablen miteinbezogen (siehe auch 2.4.). Mittels der Regressionsanalysen konnten Hinweise auf einen Zusammenhang einzelner SNPs im Enigma-Genlocus mit den Parametern ISI-Mats und dem Blutzuckerspiegel gefunden werden. Die SNPs rs234376 und rs230763 konnten mit einer erhöhten Insulinsensitivität (ISI-Mats) assoziiert werden (Abb. 3.25 und 3.26). Bei dem SNP rs230763 war dies jedoch nur bei den Männern ($p=0,034$) der Fall und wurde durch eine zusätzliche Assoziation mit einem niedrigeren Blutzuckerspiegel (BZ0 und BZ AUC) bestätigt. Die nicht-adjustierten Rohdaten sind in den Tabellen 3.1 und 3.2 zusammengefasst. Die beiden SNPs, rs234376 und rs230763, liegen innerhalb von Introns des Enigma-Gens und führen daher nicht zu einer veränderten Aminosäuresequenz. Solche SNPs könnten jedoch Auswirkungen auf die Bindung von Transkriptionsfaktoren oder die Expression anderer Splicevarianten haben.

Zusammenfassend sind diese Ergebnisse als Hinweis auf einen möglichen Zusammenhang dieser Einzelnukleotid-Polymorphismen im Enigma-Gen mit einer verbesserten Insulinsensitivität und daraus resultierendem niedrigerem Blutzucker zu verstehen.

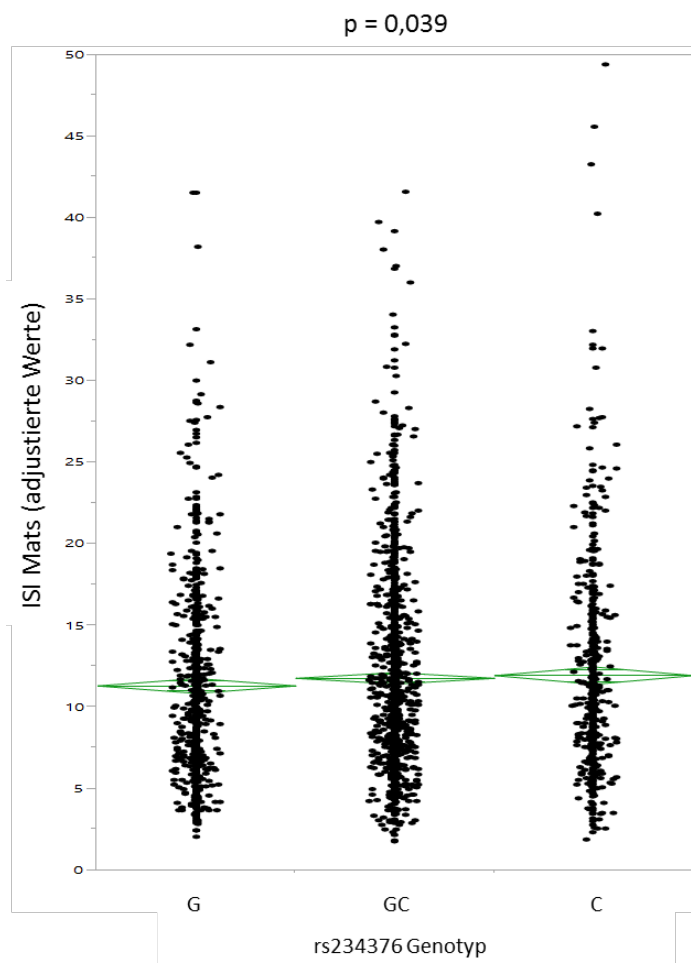


Abbildung 3.25: Der SNP rs234376 ist mit verbesserter Insulinsensitivität assoziiert

Ergebnisse

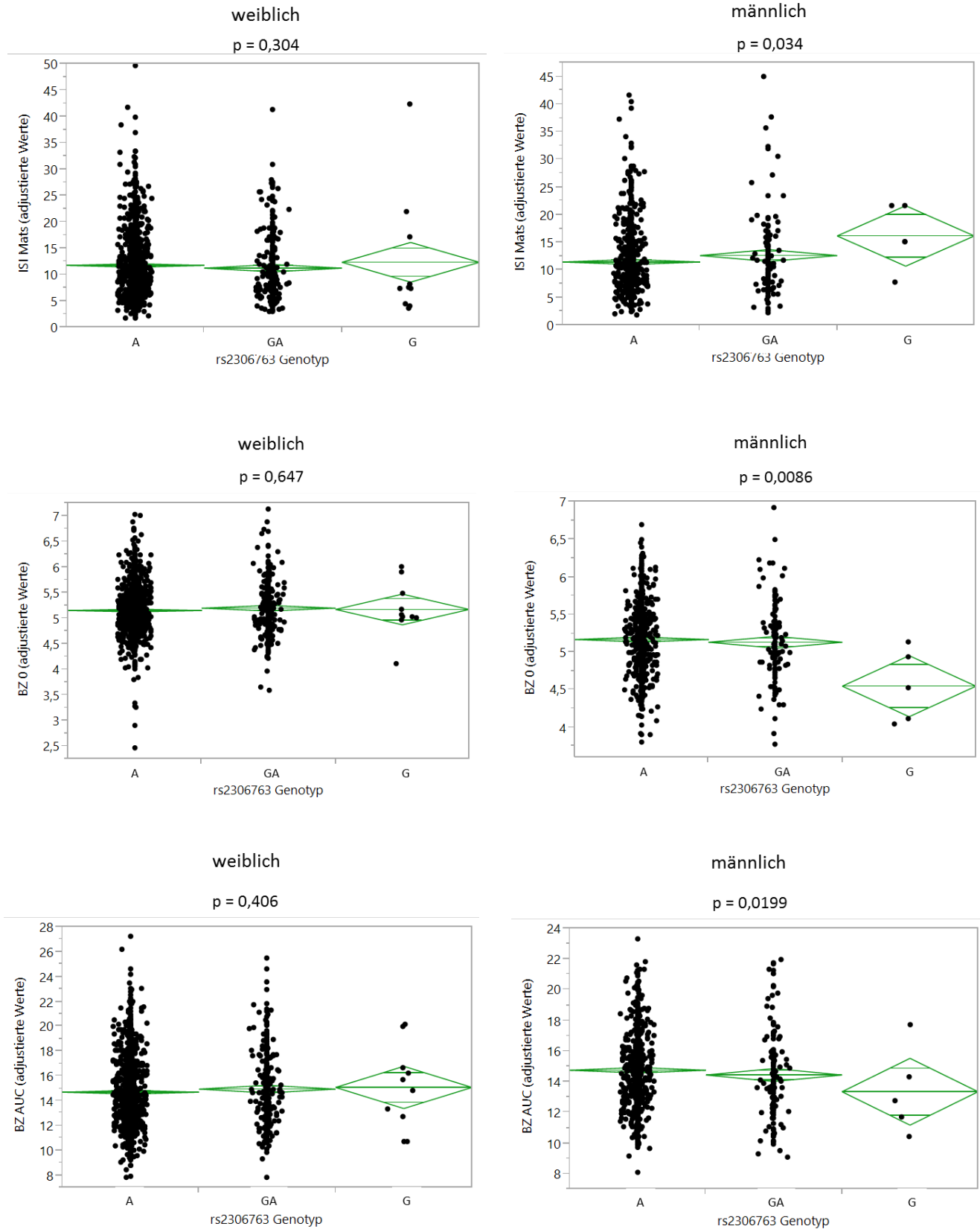


Abbildung 3.26: Der SNP rs230763 ist bei Männern mit verbesserter Insulinsensitivität und niedrigerem Blutzuckerspiegel assoziiert

Supplementary Data

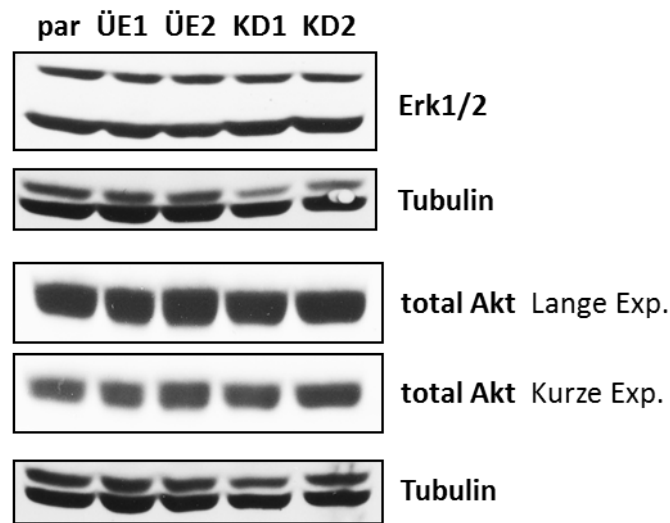


Abbildung 3.27: Die Expression von Erk1/2 und Akt ist durch Überexpression bzw. Knockdown von Enigma nicht verändert

Gesamtzelllysate von parentalen C2C12 Myoblasten, sowie von den Zelllinien mit Überexpression bzw. Knockdown von Enigma wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend die Expression von Erk1/2 und Akt in Western-Blot Analysen detektiert. Als Ladekontrolle wurde zusätzlich Tubulin detektiert.

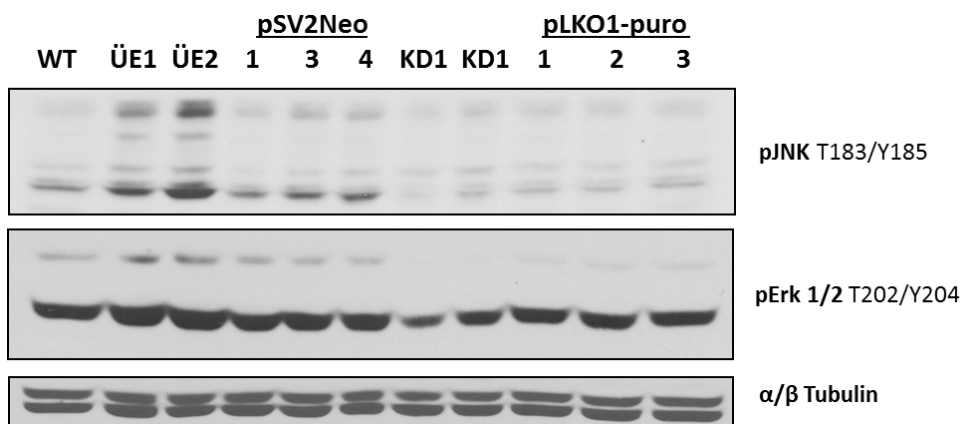


Abbildung 3.28: Die mit den Leervektoren stabil transfizierten C2C12 Myoblasten zeigen keine Effekte auf die Aktivierung von Erk1/2 und JNK

Gesamtzelllysate von parentalen C2C12 Myoblasten, sowie von den Zelllinien mit Überexpression bzw. Knockdown von Enigma wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mit phospho-spezifischen Antikörpern die Aktivierung von Erk1/2 und JNK in Western-Blot Analysen detektiert.

Supplementary Data

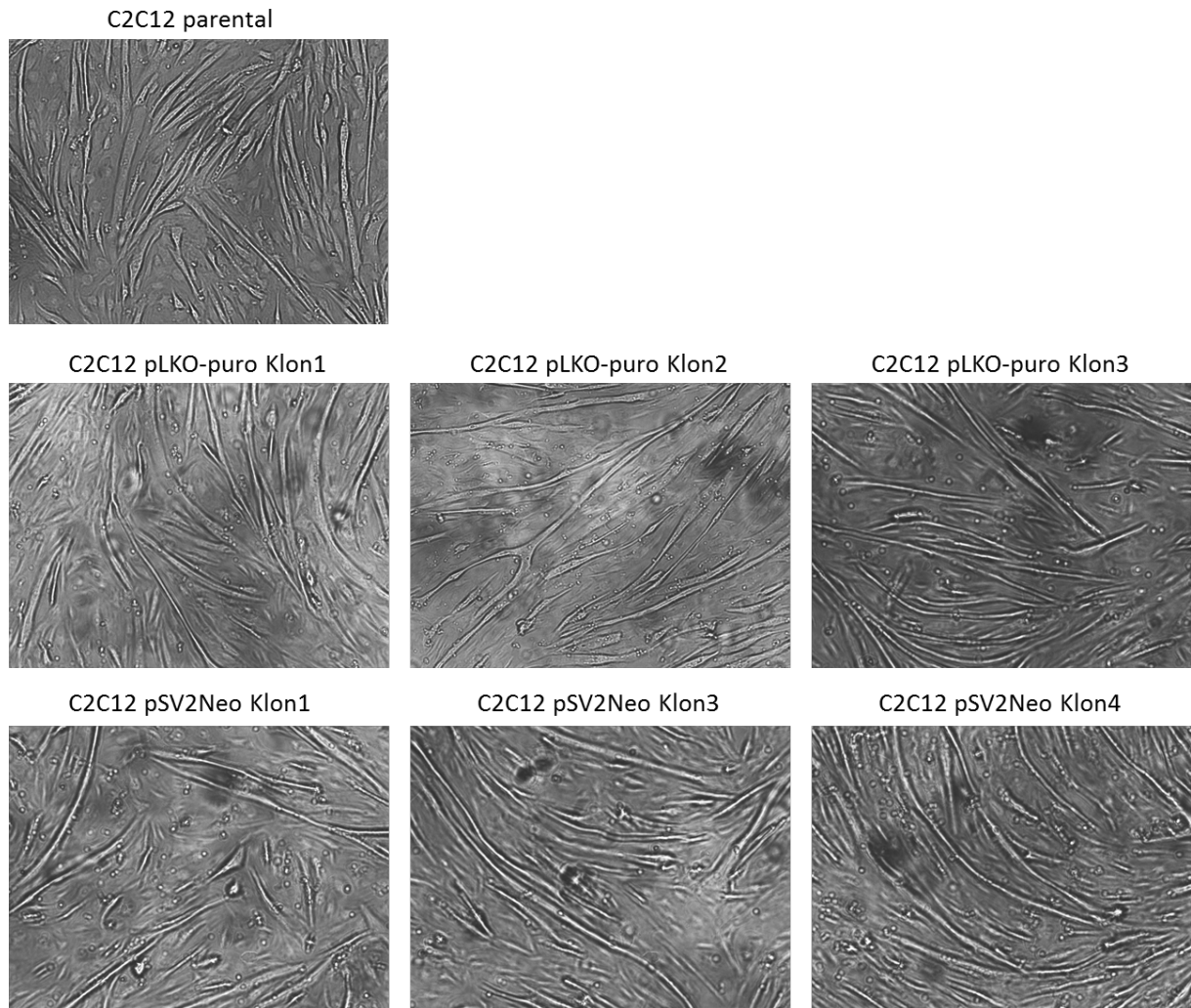


Abbildung 3.29: Die mit den Leervektoren stabil transfizierten C2C12 Myoblasten zeigen eine normale Differenzierung zu Myotuben

Die Zellen wurden in 6-Lochschalen kultiviert und zur Differenzierung angeregt. Die Aufnahmen zeigen die Zellen nach 7 Tagen in DM-Medium

Tabelle 3.1: Assoziation der ausgewählten tagging SNPs mit dem Parameter ISI-Matsuda (N_{OGTT}=2393)

	Genotyp	N OGTT	ISI Mats (*10 ¹⁵ L ² *mol ⁻²)
Rs55743355	AA	768	12,71 ± 8,89
	AG	1154	13,32 ± 9,80
	GG	471	13,41 ± 9,19
P _{Assoziation}	-	-	0,117
P _{Geschlechtsinteraktion}	-	-	0,778
Rs234376	GG	699	12,53 ± 8,66
	GC	1180	13,32 ± 9,71
	CC	514	13,54 ± 9,62
P _{Assoziation}	-	-	0,039
Effektgröße (Standardisiertes Beta)			0,030
P _{Geschlechtsinteraktion}	-	-	0,824
Rs163203	GG	679	13,64 ± 10,03
	GA	1203	12,97 ± 9,13
	AA	511	12,87 ± 9,13
P _{Assoziation}	-	-	0,746
P _{Geschlechtsinteraktion}	-	-	0,464
Rs2306763	GG	15	16,45 ± 13,83
	AG	416	13,80 ± 10,22
	AA	1962	12,97 ± 9,17
P _{Assoziation}	-	-	0,597
P _{Geschlechtsinteraktion}	-	-	0,0106
P _{weiblich}			0,304
P _{männlich}			0,0338
Effektgröße (Standardisiertes Beta)			0,039

Tabelle 3.1:

Die Daten sind als nicht-adjustierte Rohdaten gezeigt (Mittelwerte ± SD). Assoziationen zwischen den SNP-Genotypen und dem ISI-Mats Parameter wurden mittels der Methode der kleinsten Quadrate in multiplen linearen Regressionsanalysen getestet. Dabei wurden das Geschlecht, das Alter und der BMI als mögliche Störvariablen berücksichtigt. Bei den geschlechtsspezifischen Assoziationsanalysen wurden das Alter und der BMI als Störvariablen gewählt. P_{Assoziation} – p-Wert für die Assoziation zwischen dem jeweiligen SNP mit dem ISI-Mats Parameter; P_{Geschlechtsinteraktion} – p-Wert für den Interaktionseffekt zwischen SNP und dem Geschlecht auf ISI-Mats. Assoziationen mit einem p-Wert < 0,05 sind in rot dargestellt. OGTT – oral glucose tolerance test; SNP – single nucleotide polymorphism

Tabelle 3.2: Assoziation der ausgewählten tagging SNPs mit der Plasmaglukosekonzentration (N_{OGTT}= 2457)

	Genotyp	N OGTT	Glucose, fasting (mmol/L)	Glucose, 120 min (mmol/L)	Glucose, AUC ₀₋₁₂₀ min (mmol/L)
Rs55743355	AA	787	5,18 ± 0,576	6,33 ± 1,55	14,83 ± 2,99
	AG	1183	5,16 ± 0,547	6,36 ± 1,61	14,8 ± 3,12
	GG	487	5,16 ± 0,526	6,38 ± 1,61	14,8 ± 3,09
p _{Assoziation}	-	-	0,451	0,564	0,697
p _{Geschlechtsinteraktion}	-	-	0,773	0,687	0,522
Rs234376	GG	715	5,18 ± 0,575	6,34 ± 1,55	14,86 ± 2,97
	GC	1213	5,16 ± 0,543	6,37 ± 1,59	14,81 ± 3,11
	CC	529	5,16 ± 0,541	6,35 ± 1,65	14,74 ± 3,13
p _{Assoziation}	-	-	0,469	0,987	0,307
p _{Geschlechtsinteraktion}	-	-	0,359	0,429	0,280
Rs163203	GG	700	5,17 ± 0,564	6,35 ± 1,55	14,81 ± 3,01
	GA	1230	5,16 ± 0,527	6,36 ± 1,57	14,81 ± 3,04
	AA	527	5,18 ± 0,593	6,35 ± 1,68	14,81 ± 3,15
p _{Assoziation}	-	-	0,573	0,301	0,452
p _{Geschlechtsinteraktion}	-	-	0,421	0,137	0,940
Rs2306763	GG	15	4,95 ± 0,74	6,52 ± 2,26	14,56 ± 3,73
	AG	429	5,15 ± 0,59	6,34 ± 1,65	14,71 ± 3,28
	AA	2013	5,17 ± 0,54	6,36 ± 1,57	14,83 ± 3,02
p _{Assoziation}	-	-	0,301	0,854	0,556
p _{Geschlechtsinteraktion}	-	-	0,0175	0,036	0,019
p _{weiblich}			0,647	0,269	0,406
p _{männlich}			0,0086	0,111	0,0199
Effektgröße (Standardisiertes Beta)			-0,045		-0,043

Tabelle 3.2:

Die Daten sind als nicht-adjustierte Rohdaten gezeigt (Mittelwerte \pm SD). Assoziationen zwischen den SNP-Genotypen und den Plasmaglukosekonzentrationen wurden mittels der Methode der kleinsten Quadrate in multiplen linearen Regressionsanalysen getestet. Dabei wurden das Geschlecht, das Alter und der BMI als mögliche Störvariablen berücksichtigt. Bei den geschlechtsspezifischen Assoziationsanalysen wurden das Alter und der BMI als Störvariablen gewählt. $P_{\text{Assoziation}}$ – p-Wert für die Assoziation zwischen dem jeweiligen SNP mit den Blutzuckerwerten; $P_{\text{Geschlechtsinteraktion}}$ – p-Wert für den Interaktionseffekt zwischen SNP und dem Geschlecht auf die Blutzuckerwerte. Assoziationen mit einem p-Wert $< 0,05$ sind in rot dargestellt. OGTT – oral glucose tolerance test; SNP – single nucleotide polymorphism; AUC – area under the curve

4. Diskussion

Enigma wurde als ein Interaktionspartner des Insulinrezeptors beschrieben (Wu und Gill, 1994, Wu et al., 1996). Außerdem wurde gezeigt, dass es eine Rolle bei der insulin-induzierten Glut4-Translokation einnimmt und in übergewichtigen Diabetikern überexprimiert ist (Barres et al., 2006). Erstaunlicherweise gibt es jedoch keine Erkenntnisse, ob dies Auswirkungen auf den Insulinsignalweg hat. Daher sollte in dieser Arbeit die Rolle von Enigma im Insulinsignalweg in C2C12-Myoblasten untersucht werden.

4.1. Co-Immunpräzipitation zeigt keine Interaktion zwischen Enigma und dem Insulinrezeptor

Die von Wu et al. (1994, 1996) beschriebene Interaktion von Enigma und dem Insulinrezeptor basiert hauptsächlich auf Yeast Two-Hybrid (Y2H) Screenings, bei denen gezeigt werden konnte, dass bestimmte Peptidsequenzen dieser Proteine aneinander binden. Jedoch gibt es bisher keinen Beweis dafür, dass die Vollängenproteine des Insulinrezeptors und Enigma unter physiologischen Bedingungen tatsächlich eine Interaktion zeigen. Ein Y2H-Assay kann zwar einen Hinweis auf eine Interaktion zweier Proteine unter *in vivo*-ähnlichen Verhältnissen geben, hat allerdings einige Limitierungen, die zu falsch positiven wie auch zu falsch negativen Ergebnissen führen können. Eines der Hauptprobleme eines Y2H-Screenings ist, dass die zu untersuchende Interaktion im Zellkern stattfinden muss. Das ist vor allem ein Problem, wenn membranständige Proteine (wie der Insulinrezeptor) untersucht werden sollen, denn unter physiologischen Bedingungen kommen solche Proteine nicht im Zellkern vor. Da im Zellkern außerdem ein anderes zelluläres Milieu herrscht als im Zytoplasma, kann dies zu nicht-physiologischen Modifikationen der zu untersuchenden Proteine führen. Es kann zum Beispiel vorkommen, dass Proteine anders gefaltet sind. Auch posttranslationale Veränderungen, wie Glykosylierung, Palmitoylierung und Phosphorylierung unterscheiden sich bei Hefen von anderen eukaryotischen Organismen. Ergebnisse von Y2H-Interaktionen müssen daher immer kritisch hinterfragt werden und durch weitere Studien, wie Immunpräzipitation oder Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET), unter physiologisch relevanten Bedingungen bestätigt werden. In dieser Arbeit wurde die Interaktion zwischen Enigma und dem Insulinrezeptor mittels Co-Immunpräzipitation untersucht. Leider war es nicht möglich, dies direkt in den Enigma-überexprimierenden C2C12 Myoblasten zu untersuchen. Hier konnten weder Enigma, noch der Insulinrezeptor, ausreichend immunpräzipitiert werden. Möglicherweise war die Expression der Proteine zu gering, um mit der verwendeten Methode ausreichend immunpräzipitiert zu werden. Daher wurden Hek293-Zellen verwendet, die mit

entsprechenden Expressionsplasmiden transient transfiziert wurden. Dies resultierte in einer starken Expression sowohl des Insulinrezeptors als auch von Enigma. Beide Proteine konnten somit immunpräzipitiert werden. Western-Blot Analysen dieser Co-Immunpräzipitationen zeigten jedoch keine Co-Aufreinigung und somit keine Interaktion der beiden Proteine. Zusammenfassend ist zu sagen, dass die von Wu et al. beschriebene Interaktion unter physiologisch relevanteren Bedingungen in Hek293-Zellen nicht bestätigt werden konnte. Eine Interaktion zwischen zwei Proteinen kann jedoch auch abhängig vom Zelltyp sein. Um einen direkten Beweis zu erbringen, dass diese Interaktion in den verwendeten Zelllinien dieser Arbeit tatsächlich nicht stattfindet, müsste die Interaktion direkt in diesen Zellen untersucht werden. Dies war jedoch, wie bereits erwähnt, mittels Immunpräzipitation leider nicht möglich. Da jedoch auch keine Bestätigung der Interaktion zwischen Enigma und dem Insulinrezeptor durch weitere Publikationen verfügbar ist, ist es wahrscheinlich, dass diese Interaktion unter physiologisch relevanten Bedingungen nicht stattfindet.

4.2. Die Enigma-Expression reguliert die Aktivierung von Komponenten des Insulinsignalwegs insulinunabhängig

Um einen möglichen Einfluss von Enigma auf den Insulinsignalweg zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit stabile C2C12-Zelllinien mit Überexpression bzw. Knockdown von Enigma generiert. Die Zelllinie C2C12 stellt Vorläuferzellen (Myoblasten) des Skelettmuskels und somit ein wichtiges Ziel des Insulins dar. Es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Enigma zu einer reduzierten Tyrosinphosphorylierung von IRS1 an Y989 führt. Dies war sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach Insulinstimulation der Fall. Auch für den Tyrosinrest Y612 konnte dies beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). IRS-Proteine sind Substrate von Rezeptortyrosinkinasen (RTK) wie dem Insulinrezeptor und werden nach Bindung des Liganden durch den aktivierten Rezeptor an Tyrosinresten phosphoryliert (Hanke et al., 2009). Dadurch wird das Rezeptorsignal auf diese Dockingproteine übertragen, die daraufhin ihrerseits downstream Komponenten wie die PI3K aktivieren (Keller et al., 1993). Die Aktivierung der PI3K führt dann zur Bildung des second messengers Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PIP3) und schlussendlich zur Aktivierung des zentralen Mediators des Insulinsignals Akt (Franke et al., 1997, Pearce et al., 2010). Da für Enigma eine Interaktion mit der Juxtamembran-Region des Insulinrezeptors beschrieben ist (Wu und Gill, 1994), und IRS1 auch an diese Domäne bindet, könnte eine Konkurrenz um diese Stelle die Erklärung für die reduzierte IRS1-Phosphorylierung bei Überexpression von Enigma sein. Allerdings konnte eine Interaktion zwischen Enigma und dem Insulinrezeptor in Co-Immunpräzipitationsversuchen nicht bestätigt werden.

Interessanterweise lag Akt in den Enigma-überexprimierenden Zellen trotz reduzierter IRS1-Tyrosinphosphorylierung stärker an T308 phosphoryliert vor. Da die Akt-Phosphorylierung von der Aktivität der PI3K abhängig war, lässt dies auf eine IRS-unabhängige konstitutive Aktivierung der PI3K und Akt schließen. Diese Hypothese wird gestützt von der Tatsache, dass eine Stimulation mit Insulin keinen signifikant veränderten Effekt auf die Phosphorylierung dieser Proteine im Vergleich zu den parentalen Zellen hatte. Um die IRS1-unabhängige Aktivierung der PI3K zu bestätigen, könnte in weiterführenden Untersuchungen beispielsweise die Interaktion zwischen IRS1 und der regulatorischen Untereinheit p85 der PI3K in diesen Zellen untersucht werden.

Im Gegensatz zu einer Überexpression zeigten die Zelllinien mit reduzierter Enigma-Expression eine erhöhte IRS1-Tyrosinphosphorylierung, was die ebenfalls erhöhte basale Akt-Phosphorylierung in diesen Zellen erklären könnte. Bei Stimulation dieser Zellen mit Insulin konnte ein geringerer Effekt auf die IRS1 Y989 Phosphorylierung festgestellt werden. Die Ursache dafür könnte sein, dass IRS1 nach Insulinstimulation sowohl bei den parentalen als auch bei den Knockdown-Zellen maximal phosphoryliert vorlag. Diese Ergebnisse zeigen somit, dass die Enigma-Expression negativ mit der IRS1-Tyrosinphosphorylierung korreliert.

IRS1 ist ein Protein mit vielen Serin-Phosphorylierungsstellen, die durch verschiedene Mechanismen phosphoryliert werden können (Sun et al., 1991). Dadurch wird IRS1 meist negativ reguliert, indem eine Tyrosinphosphorylierung verhindert wird (Paz et al., 1997). Zu den Kinasen, die diese Serin-Phosphorylierungen vermitteln gehören auch Mitglieder der MAPK-Familie. Von JNK ist bekannt, dass es IRS-1 an S307 phosphorylieren kann (Aguirre et al., 2000). Da bei Enigma-Überexpression auch JNK verstärkt aktiviert war, wurde dies als mögliche Ursache der reduzierten IRS1-Tyrosinphosphorylierung untersucht. Allerdings konnten keine Unterschiede der S307 Phosphorylierung zwischen den parentalen und den Enigma-überexprimierenden Zellen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Eine weitere Möglichkeit, wie die reduzierte IRS1-Tyrosinphosphorylierung in diesen Zellen zustande kommt, könnte die Interaktion zwischen Enigma und den klassischen PKCs (Kuroda et al., 1996) darstellen. Die PKC α und die PKC β II sind ebenfalls als mögliche Serin-Kinasen von IRS1 beschrieben (Liberman et al., 2008).

Trotz der konstitutiven Phosphorylierung von Akt nach Überexpression und Knockdown von Enigma konnte kein signifikanter Effekt auf die GSK3-Phosphorylierung festgestellt werden. Eventuell war die erhöhte Akt-Phosphorylierung zu gering um einen Einfluss auf die GSK3 zu vermitteln. Die Kinase mTOR ist ein weiteres Zielprotein, das über Akt aktiviert werden kann (Inoki et al., 2002, Potter et al., 2002). Eine aktivierte mTOR-Kinase phosphoryliert wiederum die p70-S6K an T389 (Pende, 2006). Die C2C12-Myoblasten mit einer Überexpression von Enigma und einer konstitutiv phosphorylierten Akt-Kinase zeigten

jedoch keine erhöhte Phosphorylierung der p70-S6K an T389. Interessanterweise wiesen die Zellen mit Enigma-Knockdown eine erhöhte konstitutive Phosphorylierung der p70-S6K auf. Möglicherweise wird die Substratspezifität von Akt durch die verstärkte Enigma-Expression verändert, wodurch keine mTOR-Aktivierung stattfindet. Dagegen ist bei einem Knockdown von Enigma der klassische Weg der p70-S6K-Aktivierung über IRS1-PI3K-Akt-TSC1/2 nicht beeinflusst. Matheny und Adamo (2009) beschreiben zudem, dass die p70-S6K-Aktivierung in C2C12 Myoblasten durch verschiedene Akt-Isoformen beeinflusst sein könnte oder ein noch unbekannter Akt-unabhängiger Weg der p70-S6K in diesen Myoblasten existiert.

Ein weiterer Signalweg, der durch Insulin aktiviert wird ist der MAPK/Erk1/2 Signalweg. Die Aktivierung der RTK führt zur Bindung von Dockingproteinen wie IRS oder SHC1 und schließlich zur Rekrutierung des Komplexes Grb2-SOS. SOS ist ein Ras-GEF und führt über die Aktivierung von Ras, Raf und der MEK1 schließlich zu einer Aktivierung von Erk1/2. Auch hier konnte eine erhöhte Erk1/2-Phosphorylierung nach Enigma-Überexpression beobachtet werden. Erk1/2 zeigte ebenfalls schon unter basalen Bedingungen eine erhöhte konstitutive Phosphorylierung und Insulin hatte auch hier keinen veränderten Effekt verglichen zu den parentalen Myoblasten. Dagegen wiesen die Zelllinien mit Enigma-Knockdown sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach Insulinstimulation eine geringere Phosphorylierung von Erk1/2 auf. Der Insulineffekt war auch hier nicht beeinflusst. Da bei Überexpression von Enigma eine reduzierte IRS1-Tyrosinphosphorylierung detektiert wurde, wäre es möglich, dass die erhöhte Menge an Enigma zu einer Verschiebung des Rezeptorsignals in Richtung des wachstumsfördernden Signalweges führt. Eine Interaktion von Enigma mit SHC1, GRB2 oder c-Raf konnte jedoch mittels Co-Immunpräzipitation nicht nachgewiesen werden.

Nach dem Einsatz des PI3K-Inhibitors LY294002 war die Erk1/2-Phosphorylierung in den Myoblasten mit Enigma-Überexpression interessanterweise stärker beeinträchtigt als in den parentalen Zellen. Es könnte somit sein, dass Enigma in diesen Zellen die PI3K-Aktivität erhöht und gleichzeitig einen Crosstalk zwischen der PI3K und dem MAPK-Signalweg vermittelt. Ursprünglich wurden diese beiden Signalwege als separate unabhängige Signalwege beschrieben. Mittlerweile sind jedoch viele Interaktionen und Feedback-Mechanismen bekannt, wodurch sich diese beiden Signalwege gegenseitig beeinflussen können (Castellano und Downward, 2012, Fey et al., 2012, Mendoza et al., 2011, Jimenez et al., 2002). Niba et al. konnten zeigen, dass eine basale Erk1/2-Phosphorylierungen in MSTO-211H Zellen (humane Lungen-Mesotheliom-Zellen) von der PI3K vermittelt wird. Eine Inhibierung oder ein Knockdown der PI3K führte zu Dephosphorylierung von Erk1/2. Wegen der Komplexität dieser Signalwege und der vielfältigen Möglichkeiten eines Crosstalks kann nur spekuliert werden wie Enigma solch einen Crosstalk vermittelt. Da Enigma in den überexprimierenden Myoblasten verstärkt in der Zellperipherie vorkommt und nach Knockdown hauptsächlich auf die Bereiche in und um den Zellkern beschränkt ist, wäre es

denkbar, dass Enigma als scaffold-Protein bestimmte Komponenten dieser beiden Signalwege lokal konzentriert bzw. zusammenführt.

Eine mögliche unspezifische Wirkung von LY294002 muss ebenfalls in Betracht gezogen werden. Zwar wurde dies, durch die verwendete niedrige Konzentration von 20µM versucht zu minimieren, jedoch gibt es in der Literatur Hinweise auf solche unspezifischen Wirkungen dieses Inhibitors (Gharbi et al., 2007). Da in dieser Arbeit der Effekt von LY294002 im Vergleich zu parentalen Zellen untersucht wurde, und der Inhibitor einen stärkeren Effekt auf die Reduktion der Erk1/2-Phosphorylierung in den Enigma-überexprimierenden Zellen hatte, ist eine unspezifische Wirkung des Inhibitors jedoch eher unwahrscheinlich. Allerdings besteht die Möglichkeit, dass durch die Überexpression von Enigma Proteine rekrutiert/aktiviert werden, die dann durch LY294002 beeinflusst werden, in den parentalen Zellen jedoch nicht.

4.3. Die Enigma-Expression steht im Zusammenhang mit der Aktivität der MAPK-Signalwege

Neben Erk1/2 beeinflusste das Expressionslevel von Enigma auch die Aktivität/Phosphorylierung von zwei weiteren Mitgliedern der MAPK-Familie, JNK und p38. Dabei konnte eine positive Korrelation zwischen der Menge an Enigma und der Phosphorylierung dieser Kinasen beobachtet werden. Mit der MEKK1 konnte zudem eine MAP3K identifiziert werden, deren Aktivität ebenfalls durch die Enigma-Expression verändert ist. Da diese Serin/Threonin-Kinase als upstream-Kinase von Erk1/2 (Karandikar et al., 2000, Yujiri et al., 1998), JNK (Zhang et al., 2012, Xu et al., 1997) und p38 (Page et al., 2004) beschrieben ist, könnte diese Kinase für die Phosphorylierung der MAPKs verantwortlich sein. Beispielsweise ist eine direkte Interaktion der MEKK1 mit der MKK4 beschrieben, wodurch der JNK-Signalweg aktiviert wird (Tu et al., 2003). Eventuell fungiert Enigma als scaffold-Protein, welches einzelne Module der MAPK-Signalwege an spezifischen intrazellulären Bereichen lokal konzentriert und/oder für Substrate zugänglich macht. Eine solche Funktion konnte bereits für einige scaffold-Proteine gezeigt werden (Good et al., 2011, Dhanasekaran et al., 2007, Morrison und Davis, 2003). Das scaffold-Protein JIP1, welches an Komponenten des JNK-Signalwegs bindet, wurde beispielsweise mit einer erhöhten JNK-Aktivität in fettleibigen Mäusen und einer daraus resultierenden Insulinresistenz in Zusammenhang gebracht (Jaeschke et al., 2004). Auch eine RTK-unabhängige Aktivierung von MAPKs durch Kompartimentierung durch Adapter/Scaffold-Proteine ist beschrieben (Mor und Philips, 2006, Caunt et al., 2006). In weiterführenden Experimenten könnten solche Interaktionen zwischen Enigma und den verschiedenen

Komponenten der MAPK-Signalwege, beispielsweise durch Co-Immunpräzipitation, untersucht werden.

Rac1 gehört zu der Familie der Rho-GTPasen und kann über die PI3K aktiviert werden (Welch et al., 2003, Kotani et al., 1995, Hawkins et al., 1995). Auch eine Aktivierung der PI3K durch Rac1 ist beschrieben (Yang et al., 2012). Außerdem ist bekannt, dass aktiviertes Rac1 (GTP-gebunden) unterschiedliche MAPKs aktivieren kann (Fanger et al., 1997, Zhang et al., 1995, Coso et al., 1995). Um zu untersuchen, ob Rac1 einen Einfluss auf die veränderten Signalwege bzw. auf einen möglichen Crosstalk zwischen dem PI3K- und dem MAPK-Signalweg in den Zelllinien dieser Arbeit hat, wurde der Rac1-Inhibitor NSC23766 verwendet. Es konnte jedoch kein Einfluss von Rac1 auf die Phosphorylierung/Aktivierung von MEKK1, JNK, p38 und Erk1/2 festgestellt werden. Da dieser Inhibitor spezifisch für Rac1 ist und verwandte GTPasen wie CDC42 oder RhoA nicht beeinflusst, ist es nicht gänzlich auszuschließen, dass ein solcher Signalweg über Rho-GTPasen in diesen Zellen existiert.

Enigma wurde schon in früheren Arbeiten mit dem mitogenen Signalweg über die c-Ret Rezeptortyrosinkinase in Verbindung gebracht (Kales et al., 2014, Borrello et al., 2002, Durick et al., 1998, Durick et al., 1996). Dabei konnte gezeigt werden, dass eine Interaktion von Enigma mit einem Motiv um ein nicht-phosphoryliertes Tyrosin (Y586) für das mitogene Signal dieses Rezeptors benötigt wird. Beim Menschen sind 58 RTKs bekannt, die eine ähnliche molekulare Architektur aufweisen (Lemmon und Schlessinger, 2010). Da die von Wu und Gill beschriebene Interaktion zwischen Enigma und dem Insulinrezeptor nicht bestätigt werden konnte und Insulin auch keinen veränderten Effekt auf die Komponenten der Signaltransduktion hatte, wäre es jedoch denkbar, dass Enigma mit anderen RTKs oder intrazellulären Tyrosinkinasen, wie c-Src oder c-Abl, interagiert und dadurch die PI3K- bzw. MAPK-Signalwege beeinflusst.

MAP-Kinasen können außerdem über den TGF- β -Signalweg reguliert werden (Guo und Wang, 2009). Der kanonische Signalweg über TGF- β wird durch SMAD und SMURF Proteine vermittelt. Da für Enigma eine Interaktion mit SMURF1 beschrieben ist (Sangadala et al., 2006), welche zu einer reduzierten Ubiquitinierung von SMAD-Proteinen führt, wurde ein möglicher Einfluss von TGF- β auf die Regulierung der MAPKs in den Myoblasten untersucht. Allerdings konnten nach Stimulation der Zellen mit TGF- β keine Unterschiede in der Phosphorylierung der MAPKs festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

4.4. Eine Überexpression von Enigma führt zu einer leicht erhöhten Proliferation

Der MAPK-Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation (Zhang und Liu, 2002). Aufgrund der konstitutiven Aktivierung dieses Signalweges nach Enigma-Überexpression wurde der Einfluss von Enigma auf die Proliferation untersucht. Mittels BrdU-Inkorporation konnte gezeigt werden, dass C2C12 Myoblasten mit Enigma-Überexpression tatsächlich eine leicht erhöhte Proliferation aufweisen. Da ein Knockdown zu reduzierter Erk1/2-Aktivierung führt, wäre hier ein beeinträchtigtes Zellwachstum zu erwarten gewesen. Eventuell wird dies jedoch durch die generell hohe Proliferationsrate von C2C12 Myoblasten überlagert. Eine weitere Erklärung könnte ein ausgleichendes proliferatives Signal durch die erhöhte basale Aktivierung von Akt in diesen Zellen sein. Eine erhöhte Akt-Aktivierung kann beispielsweise zu einer Phosphorylierung von Zellzyklus-regulierenden Proteinen wie p27^{Kip} (Liang et al., 2002, Shin et al., 2002) und p21^{Cip} (Heron-Milhavet et al., 2006, Zhou et al., 2001) führen, was wiederum den Verlauf des Zellzyklus fördert.

4.5. Eine veränderte Enigma-Expression führt zu erhöhter Lipotoxizität

In Leberzellen ist für Enigma eine antiapoptotische Funktion beschrieben. Eine Stabilisierung von Mdm2 führt hier zu einem verstärkten proteasomalen Abbau von p53 (Jung et al., 2010). Solch ein Effekt konnte in den C2C12 Myoblasten nicht beobachtet werden. Die p53-Proteinmenge unterschied sich nach Überexpression bzw. Knockdown nicht von parentalen Zellen. Eventuell ist dies ein Zelltyp-abhängiger Effekt von Enigma.

In den C2C12 Myoblasten hatte eine veränderte Enigma-Expression dagegen eine Apoptose-verstärkende Wirkung auf eine Fettsäure-induzierte Apoptose. Eine erhöhte Lipotoxizität geht oft mit einer reduzierten mitochondrialen Aktivität oder eines gestörten Fettsäurestoffwechsels einher (Schrauwen et al., 2010, Rial et al., 2010). Dagegen kann eine erhöhte Fettsäureoxidation im Skelettmuskel vor Apoptose schützen (Henique et al., 2010). Tatsächlich war die mRNA-Expression einiger Marker der mitochondrialen Aktivität in den veränderten Zelllinien gestört bzw. verändert. Während nach Überexpression von Enigma die mRNA-Menge von PGC-1 α tendenziell erhöht war, konnte in den Zellen mit Knockdown interessanterweise keine PGC-1 α mRNA detektiert werden. PGC-1 α koordiniert die Aktivierung nukleärer Gene, die für die mitochondriale Fettsäureoxidation und die oxidative Phosphorylierung wichtig sind (Liang und Ward, 2006). Da bekannt ist, dass die p38-MAPK in die Regulation und/oder die Expression von PGC-1 α involviert ist (Palomer et al., 2009, Fernandez-Marcos und Auwerx, 2011), könnte dies eine Erklärung für die veränderte bzw.

nicht vorhandene Expression von PGC-1 α sein. Es konnte sogar in C2C12-Zellen gezeigt werden, dass eine Überexpression der p38-MAPK zu einer verstärkten Expression des Transkriptionsfaktors ATF2 und folglich einer erhöhten Expression von PGC-1 α führt (Akimoto et al., 2005), während ein Knockdown der p38-MAPK eine reduzierten Expression von PGC-1 α zur Folge hat (Crunkhorn et al., 2007). Weiterhin ist die AMPK mit der Regulation von PGC-1 α assoziiert (Jorgensen et al., 2005, Suwa et al., 2003). Allerdings konnten in den veränderten Zelllinien keine Hinweise auf eine veränderte Aktivität der AMPK beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Neben diesen Regulationsmechanismen der PGC-1 α -Expression wird auch der Insulinsignalweg im Hinblick auf die PGC-1 α Aktivierung/Expression kontrovers diskutiert. Während Ling et al. (2004) einen positiven Effekt von Insulin auf die Expression von PGC-1 α postulieren, beschreiben Southgate et al. (2005) einen negativen Effekt. In diesem Szenario führt eine Aktivierung von Akt durch Insulin zu einer Phosphorylierung von FoxO1, wodurch dieses nicht mehr an die Promotorregion von PGC-1 α bindet.

NRF-1 ist ein Transkriptionsfaktor, dessen Transkription durch PGC-1 α aktiviert wird (Wu et al., 1999). Dieser Transkriptionsfaktor kontrolliert die Transkription einer ganzen Reihe von Genen, die für die mitochondriale Biogenese und Funktion wichtig sind. Dazu gehört auch der mitochondriale Transkriptionsfaktor A (TFAM) (Kelly und Scarpulla, 2004). Obwohl die genaue Funktionsweise von TFAM noch nicht geklärt ist, ist bekannt, dass TFAM für die Replikation mitochondrialer DNA sowie für die Transkription mitochondrialer Gene essentiell ist. Nachdem in den Myoblasten mit Enigma-Knockdown kein PGC-1 α detektiert wurde, konnte auch eine verminderte mRNA-Expression von NRF-1 und TFAM detektiert werden. Dass deren Expression nicht vollständig inhibiert war, liegt möglicherweise an einer kompensatorischen oder parallelen Regulation durch andere Isoformen von PGC-1 und/oder NRF (Shao et al., 2010, Bruni et al., 2010).

Die erhöhte Apoptoserate der Myoblasten mit Enigma-Überexpression und v.a. der Zellen mit Knockdown von Enigma nach Behandlung mit Stearat, und die veränderte Expression der Transkriptionsfaktoren PGC-1 α , NRF-1 und TFAM lassen auf eine Beeinträchtigung der Oxidation von Fettsäuren schließen. Dadurch kann oxidativer Stress in den Mitochondrien entstehen. Ein Sensor von oxidativem Stress sind die uncoupling-Proteine (UCP). Wird der Protonengradient über der inneren Membran der Mitochondrien zu groß, können die UCPs die oxidative Phosphorylierung von der ATP-Synthese abkoppeln und somit die durch den Elektronentransport entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies begrenzen (Garlid et al., 2000). Die tendenziell erhöhte Expression des UCP-2 in den Knockdown-Zellen könnte einen Schutzmechanismus dieser Zellen gegen eine exzessive ROS-Bildung darstellen. Die Enigma-überexprimierenden Myoblasten zeigten hingegen reduzierte Mengen an UCP-2. Hier ist die Expression dieses Proteins eventuell gestört, was zu einer verstärkten Präsenz

von ROS und folglich zu einer verstärkten Apoptoserate führt. Um dies im Detail zu klären, müssten weitere Untersuchungen, beispielsweise eine quantitative Messung von ROS in diesen Zellen, gemacht werden.

Ein weiterer Mechanismus von Zellen um die Bildung von ROS zu kontrollieren, ist die Expression von Superoxid-Dismutasen (SOD). Diese Enzyme wandeln toxische Superoxid-Anionen, die als Nebenprodukt der Elektronentransportkette entstehen, in Wasserstoffperoxid und molekularen Sauerstoff um. Somit nehmen diese Enzyme eine antiapoptotische Funktion bei oxidativem Stress ein (Pias et al., 2003). In den Myoblasten mit Enigma-Knockdown konnten hier signifikant geringere mRNA-Mengen an SOD-2 detektiert werden. Das SOD-2 Gen besitzt in seiner Promotorregion Bindestellen für den heterodimeren Transkriptionsfaktor AP-1 (Miao und St. Clair, 2009, Hitchler et al., 2008). Dieser besteht aus Proteinen der c-Jun und c-Fos Familie und wird mit der Transkription von SOD-2 in Verbindung gebracht (Qadri et al., 2004). Da die Knockdown-Zellen eine stark reduzierte Phosphorylierung/Aktivierung von JNK und c-Jun aufwiesen, könnte dies eine Erklärung für die geringere Expression der SOD-2 sein. Bekräftigt wird diese Hypothese zudem durch die kürzlich von Sangadala et al. (2014) beschriebene Interaktion zwischen Enigma und JAB1 (jun activation-domain-binding protein 1). JAB1 bindet an c-Jun und stabilisiert dadurch den Transkriptionsfaktor AP-1 (Claret et al., 1996).

Die Carnitine-Palmitoyltransferase I ist ein wichtiges Enzym im Metabolismus langkettiger Fettsäuren (McGarry et al., 1997). Es sind drei Isoformen (CPT1a, CPT1b, CPT1c) bekannt, wobei die Isoform CPT1b eine starke Expression im Skelettmuskel aufweist. CPT1 ist mit der äußeren mitochondrialen Membran assoziiert und katalysiert hier den Transfer der Acyl-Gruppe von Acyl-CoA auf Carnitine, wodurch Palmitoylcarnitine entsteht. Dieses kann folglich mittels Translokasen über die Membran in die mitochondriale Matrix transportiert werden. Eine Fehlfunktion der CPT1b im Muskel kann somit zu verminderter β -Oxidation führen. Daher steht dieses Protein auch im Zusammenhang mit Diabetes und anderen metabolischen Erkrankungen (Bruce et al., 2009). Da die Transkription der Carnitine-Palmitoyltransferasen unter anderem von PGC-1 α reguliert (Moore et al., 2003, Vega et al., 2000) wird, könnte dies die tendenziell geringeren mRNA-Expression von CPT1b in den Myoblasten mit Enigma-Knockdown erklären.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass vor allem in den Myoblasten mit einem Knockdown von Enigma die mitochondriale Funktion, zumindest auf der transkriptionellen Ebene wichtiger regulatorischer Proteine, beeinträchtigt ist und diese Zellen eine verstärkte Apoptoseantwort auf die Behandlung mit Stearat aufweisen. Ob dies tatsächlich mit Veränderungen in der Funktion oder der Anzahl der Mitochondrien in Verbindung steht, müsste in weiterführenden Experimenten bestätigt werden.

4.6. Enigma beeinflusst die Differenzierung von C2C12 Myoblasten zu Myotuben

C2C12-Zellen sind pluripotente Myoblasten, die nach Serumentzug zu Myotuben oder durch Stimulation mit BMP-2 (*bone morphogenetic protein 2*) zu einer Osteoblasten-Zelllinie differenzieren können (Katagiri et al., 1994). Fei et al. (2007) konnten beobachten, dass die Expression einer verkürzten Form des Enigma Proteins, bei der die LIM-Domänen entfernt wurden, die Differenzierung von C2C12-Myoblasten zu Myotuben blockiert. Die Autoren beschreiben dabei eine bevorzugte Differenzierung der pluripotenten C2C12-Myoblasten in eine Osteoblasten-Zelllinie nach Stimulation mit BMPs. Solch ein positiver Effekt von Enigma auf die Signalwege von BMPs in Osteoblasten wurde bereits in mehreren Publikationen beschrieben (Minamide et al., 2003, Liu et al., 2002, Boden et al., 1998). In dieser Arbeit wurde der Einfluss einer Überexpression bzw. eines Knockdowns von Enigma auf die Differenzierung zu Myotuben untersucht.

Die Skelettmuskeldifferenzierung ist ein komplex regulierter mehrstufiger Prozess, bei dem die Aktivierung und Repression etlicher Gene involviert ist. Einkernige Vorläuferzellen, die Myoblasten, fusionieren nach Entzug von Wachstumsfaktoren zu mehrkernigen Myotuben. Dieser Prozess wird hauptsächlich durch die Aktivierung von Myogenic regulatory factors (MRFs) gesteuert. Dazu gehören Myf5, MyoD, Myogenin und MRF4 (Ferri et al., 2009, Rescan, 2001). Diese Transkriptionsfaktoren zählen zur Familie der basic Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktoren (Murre et al., 1989). Frühere Arbeiten konnten zeigen, dass eine gestörte Regulierung dieser MRFs zu einer beeinträchtigten bzw. gestörten Muskeldifferenzierung führt (Valdez et al., 2000, Arnold und Braun, 1996). Bei einer veränderten Expression von Enigma in C2C12 Myoblasten konnten nach Initiation der Differenzierung keine (Knockdown) bzw. weniger (Überexpression) Myotuben beobachtet werden als in den parentalen Zellen. Diese sichtbaren phänotypischen Veränderungen konnten mit einer gestörten Regulation der MRFs Myf5 und Myogenin und einer verminderten Expression der terminalen Differenzierungsmarker MyHs bestätigt werden. Myf5 erreichte in den Kontrollzellen (parentale C2C12) die maximale Expression schon an Tag 2-3 nach Start der Differenzierung und nahm danach stetig wieder ab. Die Expression von Myogenin nahm dagegen stetig zu und blieb auch in ausdifferenzierten Myotuben erhalten. Diese zeitliche Regulation von Myf5 und Myogenin während der Differenzierung bei C2C12-Zellen wurde auch schon in früheren Arbeiten beschrieben (Dedieu et al., 2002). Der genaue Mechanismus wie die Transkription der MRFs reguliert wird, ist noch nicht vollständig geklärt. Es ist jedoch bekannt, dass die Transkription der MRFs durch die MAPK-Signalwege beeinflusst bzw. gesteuert werden kann. Khurana und Dey (2004) konnten zeigen, dass eine Inhibierung von JNK und c-Jun zu einer drastischen Störung der Differenzierung durch eine reduzierte Expression von Myosin und Myogenin führt. Den

größten Einfluss der MAPKs auf die Muskeldifferenzierung hat wohl die p38-MAPK. Einige frühere Arbeiten brachten eine gestörte Differenzierung mit dieser MAPK in Verbindung (Wang et al., 2008, Page et al., 2004). Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass ein Crosstalk zwischen MAPKs für die Skelettmuskeldifferenzierung wichtig ist (Meriane et al., 2000). Da, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, die Expression von Enigma die Aktivität dieser MAPKs beeinflusst, ist es wahrscheinlich, dass dies Auswirkungen auf die Differenzierungsfähigkeit der Myblasten hat.

Wie bereits erwähnt, muss ein Zellzyklusstop erreicht werden, damit Myoblasten das Differenzierungsprogramm starten. In kultivierten Zellen führt ein Serumentzug oder Zell-Zell Kontakte dazu, dass die wachstumsfördernde Aktivität verschiedener cyclin dependent kinases (CDKs) herabgesetzt wird. Das wird unter anderem durch die erhöhte Expression des CDK-Inhibitors p21 vermittelt (Guo et al., 1995, Halevy et al., 1995). Somit stellt dieser Prozess einen initialen Schritt während der Differenzierung von Myoblasten dar. Erst nachdem ein Austritt aus dem Zellzyklus stattfand, werden die bereits beschriebenen MRFs sequenziell hochreguliert. In Bezug auf die Zelllinien mit Überexpression von Enigma bedeutet dies, dass wahrscheinlich durch die konstitutive Aktivität des wachstumsfördernden Signalwegs über Erk1/2 ein Zellzyklusstop nicht in dem benötigten Maße erreicht wird. Dies ist aus der geringeren Expression von p21 in diesen Zellen schließen. Auf der anderen Seite wiesen die Myoblasten mit Knockdown eine noch geringere Menge an p21 auf. Hier ist die Erk1/2-Phosphorylierung unter basalen Bedingungen zwar reduziert, was einen Zellzyklusstop vermutlich sogar begünstigen würde, jedoch scheint in diesen Zellen die Kontaktinhibition durch Zell-Zell Kontakte gestört zu sein, wodurch ein Austritt aus dem Zellzyklus nicht möglich ist. Eine an Y397 phosphorylierte FAK vermittelt intrazelluläre Signale von Zelladhäsionen und Zell-Zell Kontakten (Playford et al., 2008, Mitra und Schlaepfer, 2006) und nimmt daher auch eine Rolle bei der Muskeldifferenzierung ein (Clemente et al., 2005). Paxilin ist ein Adapterprotein mit vier LIM-Domänen, über die es an focal adhesions lokalisiert ist und mit Tyrosinkinasen wie Src oder der FAK interagiert. Da Enigma ebenfalls LIM-Domänen besitzt, wäre eine Lokalisation an focal adhesions denkbar. Eine veränderte Phosphorylierung von FAK an Y397 nach veränderter Enigma-Expression konnte jedoch nicht festgestellt werden. Daraus kann geschlossen werden, dass die FAK wahrscheinlich nicht am Verlust der Kontaktinhibition beteiligt ist. Zell-Zell Kontakte über N-Cadherine induzieren ebenfalls eine Expression von p21 in C2C12 Myoblasten während der Differenzierung (Charrasse et al., 2002). Eine Expression von R-Cadherin inhibiert dagegen die Muskeldifferenzierung (Kucharczak et al., 2008). Daher wäre es interessant in weiterführenden Experimenten zu untersuchen, ob die Expression verschiedener Isoformen der Cadherine oder deren Signalweiterleitung durch einen Knockdown von Enigma beeinflusst ist.

4.7. SNP-Analysen geben Hinweise auf Effekte von Enigma auf die Insulinsensitivität und den Blutzuckerspiegel im Menschen

In dieser Arbeit konnten anhand von SNP-Analysen mit humanen Patientendaten Hinweise auf eine Rolle von Enigma auf die Insulinsensitivität und den Blutzuckerspiegel gefunden werden. Dabei waren beide SNPs mit einer verbesserten Insulinsensitivität (ISI-Mats) assoziiert, wobei der SNP rs230763 nur bei Männern einen Effekt zeigte. Zusätzlich war mit diesem SNP auch ein signifikant niedrigerer Blutzuckerspiegel assoziiert, was durch die verbesserte Insulinsensitivität zu erklären ist. Wie bereits erwähnt liegen diese SNPs innerhalb von Introns des Enigma-Gens, d.h. sie haben keinen Einfluss auf die Aminosäuresequenz. Allerdings können solche SNPs die Bindung von Transkriptionsfaktoren beeinflussen oder die Expression anderer Splicevarianten begünstigen. Auch die mRNA-Stabilität kann durch intronische SNPs verändert sein. Um dies im Detail zu untersuchen müssten beispielsweise Zellkulturen aus Biopsien dieser Patienten angelegt werden, die dann zur Untersuchung des Expressionslevels allgemein oder der Expression unterschiedlicher Enigma-Splicevarianten dienen könnten.

Die Ergebnisse der molekularen Experimente dieser Arbeit konnten zeigen, dass Enigma keinen Effekt auf das Insulinsignal hat. Jedoch war sowohl nach Überexpression, als auch nach Knockdown, die Akt-Kinase konstitutiv phosphoryliert. Diese konstitutive Aktivierung führte zwar nicht zu einer signifikanten, aber tendenziell leicht erhöhten GSK3-Phosphorylierung. Eine Inhibierung der GSK3 führt wiederum zu einer verstärkten Aktivität der Glykogensynthase und damit zu vermehrter intrazellulärer Glukosespeicherung. Die PI3K und Akt sind außerdem dafür bekannt, dass sie eine Rolle bei der GLUT4 Translokation spielen (Lizcano und Alessi, 2002). Barres et al. (2006) brachten Enigma zudem mit der Translokation des Glukosetransporters GLUT4 in Verbindung. Eine Überexpression von Enigma in 3T3-L1 Adipozyten führte hier zu einer reduzierten insulin-stimulierten GLUT4 Translokation und einer reduzierten Glukoseaufnahme. Dabei beeinflusste Enigma einen PI3K-unabhängigen Weg über APS (Adaptor protein with PH and SH2 domains). Die Autoren zeigten weiterhin eine erhöhte mRNA-Expression von Enigma in übergewichtigen Diabetikern. Durch eine veränderte Enigma-Expression in den C2C12 Myoblasten war auch die Aktivität der MAPKs Erk1/2, JNK und p38 beeinflusst. Mehrere Publikationen zeigen, dass auch die MAPKs bei der Glukoseaufnahme eine Rolle spielen (Kumar und Dey, 2002, Somwar et al., 2000, Taha et al., 1997). In weiteren Experimenten könnte daher untersucht werden, ob durch eine veränderte Enigma-Expression in den C2C12 Myoblasten die Expression verschiedener Glukosetransporter hochreguliert und die Glukoseaufnahme der Zellen erhöht ist.

Zusammenfassend müssen die SNP-Analysen als Hinweis darauf, dass Enigma einen Einfluss auf die Insulinsensitivität haben könnte, verstanden werden. Durch SNP-Analysen kann nur ein genereller Effekt eines Gens bzw. eines Einzelnukleotidpolymorphismus auf bestimmte Parameter aufgezeigt werden, nicht jedoch der exakte Mechanismus wie dies *in vivo* vermittelt wird. Mit den Erkenntnissen dieser Arbeit und dem publizierten Einfluss von Enigma auf die GLUT4-Translokation, wäre es jedoch interessant in weiterführenden *in vitro* und *in vivo* Studien diesen Effekt weiter zu untersuchen.

4.8. Zusammenfassung der Rolle von Enigma in C2C12 Myoblasten in einem schematischen Modell

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine veränderte Expression von Enigma Auswirkungen auf einige Komponenten der PI3K- und MAPK-Signalwege hat. In Abbildung 4.1. sind die Effekte von Enigma auf die Aktivierung dieser Proteine und die Konsequenzen für die Endpunkte der Signalwege in einem möglichen Modell schematisch zusammengefasst.

Die C2C12-Myoblasten mit stabiler Überexpression wiesen eine reduzierte Tyrosinphosphorylierung von IRS1 auf. Eine Assoziation von Enigma mit dem Insulinrezeptor, welche für die reduzierte IRS1-Phosphorylierung verantwortlich sein könnte, konnte nicht nachgewiesen werden. Trotz der reduzierten IRS1-Tyrosinphosphorylierung war die Akt T308 Phosphorylierung in diesen Zellen erhöht. Da durch den Einsatz des PI3K-Inhibitors LY294002 gezeigt werden konnte, dass die Akt-Phosphorylierung von der PI3K abhängig ist, kann daraus geschlossen werden, dass in diesen Zelllinien eine IRS1-unabhängige PI3K-Aktivierung vorliegt. Neben dem distalen Insulinsignalweg wurden auch Mitglieder der MAPK-Signalwege auf ihren Phosphorylierungszustand untersucht. Hier konnte beobachtet werden, dass auch Erk1/2 in diesen Zellen stärker aktiviert vorliegt. Es konnte gezeigt werden, dass die Erk1/2 Phosphorylierung von der MEK vermittelt wird. Eine direkte Interaktion von Enigma mit den upstream gelegenen Komponenten SHC1, GRB2 und c-RAF konnte ausgeschlossen werden. Überraschenderweise hatte eine Inhibierung der PI3K in diesen Zellen im Vergleich zu den parentalen Myoblasten einen stärkeren Einfluss auf die Erk1/2 Phosphorylierung. Auch weitere Komponenten der MAPK-Signalwege zeigten nach Enigma-Überexpression eine stärkere aktivierende Phosphorylierung. Die JNK und deren Substrat c-Jun lagen in diesen Zellen stärker phosphoryliert vor. Die MAP2K MKK4 konnte hierbei als mögliche aktivierende Kinase identifiziert werden, während die MKK7 nicht für die JNK-Phosphorylierung verantwortlich zu sein scheint. Weiterhin war als drittes Mitglied der MAP-Kinasen auch die p38-MAPK stärker aktiviert. Mit der MEKK1 konnte eine MAP3K identifiziert werden, welche ebenfalls eine erhöhte Aktivierung zeigte.

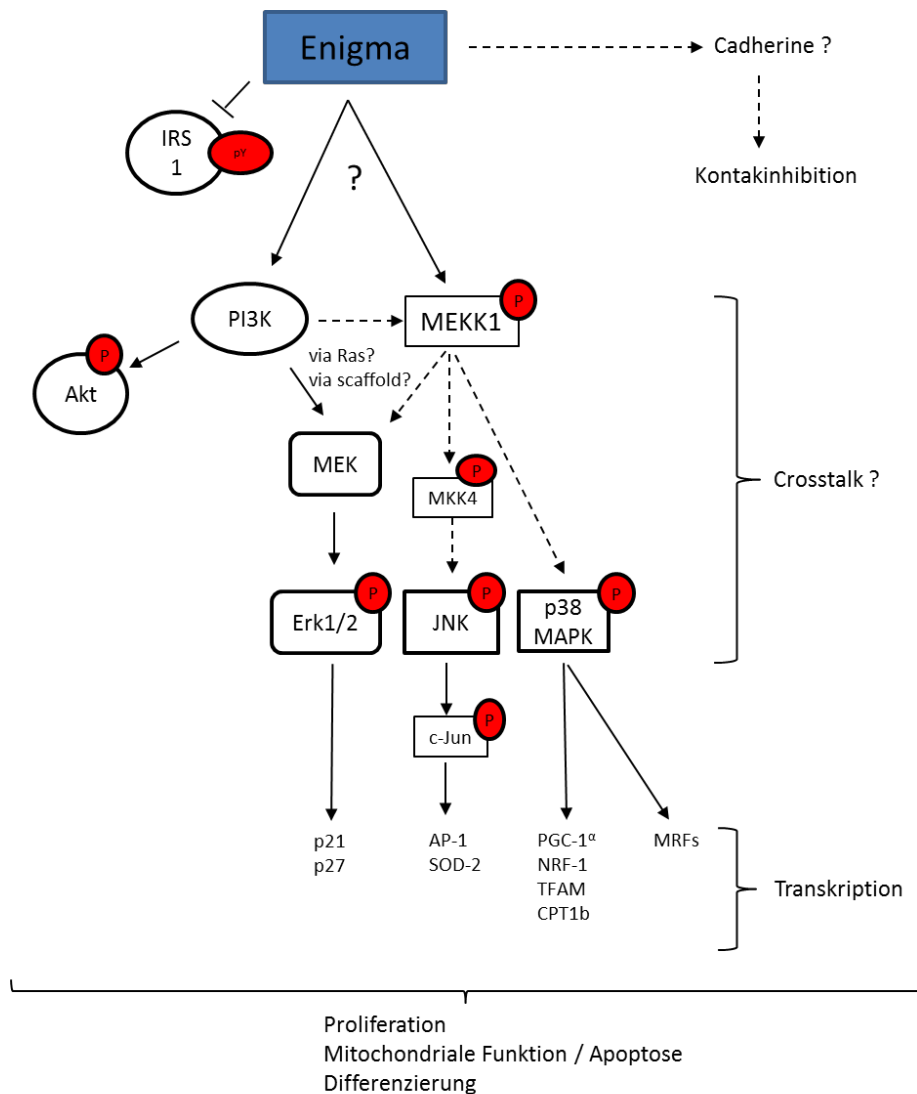


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der beobachteten Effekte von Enigma auf Komponenten der PI3K- und MAPK-Signalwege und einige Endpunkte dieser Signalwege

Da bekannt ist, dass sowohl Erk1/2 und JNK als auch die p38-MAPK durch diese MAP3K aktiviert werden können, könnten die in diesen Zelllinien beschriebenen Effekte durch die MEKK1 vermittelt werden. Weiterhin konnte Rac1 als möglicher Mediator der PI3K-vermittelten MEKK1-Aktivierung ausgeschlossen werden. Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen konnten, hatte ein Enigma-Knockdown meist den gegenteiligen Effekt auf den Phosphorylierungszustand dieser Proteine. Lediglich die Akt-Phosphorylierung an T308 war hier ebenfalls stärker im Vergleich zu den parentalen Zellen, was wahrscheinlich aus der erhöhten IRS1-Tyrosinphosphorylierung resultiert.

Diskussion

Mit Hilfe der generierten Zelllinien mit stabiler Überexpression bzw. stabilem Knockdown konnte zusammenfassend gezeigt werden, dass Enigma in C2C12 Myoblasten eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion der PI3K- und MAPK-Signalwegen einnimmt. Ein verändertes Expressionslevel hat dabei Auswirkungen auf den Aktivierungszustand einzelner Komponenten dieser Signalwege. Einige Endpunkte, die von diesen Signalwegen reguliert werden, wie die Proliferation, Apoptose und die Zelldifferenzierung werden dadurch ebenfalls beeinflusst.

5. Zusammenfassung

Das scaffold-Protein Enigma wurde bereits in früheren Arbeiten indirekt mit dem Insulinsignalweg in Verbindung gebracht. Neben der beschriebenen Interaktion mit dem Insulinrezeptor wurde außerdem eine erhöhte Expression im Fettgewebe von übergewichtigen Typ-2-Diabetikern festgestellt.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein möglicher Einfluss von Enigma auf den Insulinsignalweg näher untersucht. Dazu wurde die Expression von Enigma mittels stabiler Überexpression bzw. stabilem shRNA-basiertem Knockdown in C2C12 Mausmyoblasten verändert. Eine Überexpression führte dabei zu einer erhöhten Erk1/2- und Akt-Phosphorylierung. Gleichzeitig war jedoch die Tyrosinphosphorylierung im IRS1-Protein verringert, was auf eine IRS1-unabhängige Aktivierung von Akt hindeutet. Im Gegensatz dazu wiesen die Zelllinien mit reduzierter Enigma-Expression eine erhöhte IRS1-Tyrosinphosphorylierung auf. Dies resultierte auch in diesen Zellen in einer leicht erhöhten Akt-Phosphorylierung. Die Erk1/2-Phosphorylierung war dagegen reduziert. Die Interaktion mit dem Insulinrezeptor konnte durch Co-Immünpräzipitation nicht bestätigt werden. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Effekte von Enigma auf Erk1/2, Akt und IRS1 insulin-unabhängig vermittelt werden. Weiterhin konnten anhand von humanen Patientendaten Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Einzelnukleotid-Polymorphismen im Enigma-Gen und einer veränderten Insulinsensitivität, sowie einem veränderten Blutzuckerspiegel gefunden werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Enigma tatsächlich einige wichtige Komponenten des Insulinsignalwegs beeinflusst, diese Effekte jedoch schon im unstimulierten/basalen Zustand vermittelt.

Weiterführende Untersuchungen konnten zudem zeigen, dass eine veränderte Expression von Enigma Auswirkungen auf wichtige zelluläre Prozesse hat. Eine Überexpression resultierte, vermutlich durch eine verstärkte Erk1/2-Aktivierung, in einer leicht erhöhten Proliferationsrate. Außerdem konnte, sowohl nach Überexpression als auch nach Knockdown, eine erhöhte Lipotoxizität festgestellt werden. Dabei war die mRNA-Expression wichtiger Regulatoren der mitochondrialen Funktion sowie des Fettsäurestoffwechsels verändert. Nachdem in früheren Arbeiten ein Effekt von Enigma auf die Differenzierung von Osteoblasten nachgewiesen wurde, wurden in dieser Arbeit die Auswirkungen einer Überexpression bzw. eines Knockdowns auf die Differenzierungsfähigkeit der C2C12 Myoblasten zu Myotuben untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl eine Überexpression als auch eine reduzierte Expression die Differenzierung negativ beeinflussen. Während bei den Myoblasten mit Überexpression eine verminderte Myotubenbildung zu beobachten war, fehlte den Zellen mit einem Enigma-Knockdown die

Zusammenfassung

Fähigkeit Myotuben auszubilden komplett. Diese Zellen schienen einen Defekt in der Kontaktinhibition zu besitzen.

6. Abkürzungsverzeichnis

4E-BP1	<i>eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein</i>
AGC-Kinasen	<i>Protein kinase A, Protein kinase C, Guanosine monophosphate-dependent protein kinase</i>
Ak	Antikörper
Akt	Proteinkinase B
APS	Ammoniumpersulfat
APS-Protein	<i>Adaptor protein with PH and SH2 domains</i>
AS	Aminosäure
AS160	Akt-Substrat 160
ATP	Adenosintriphosphat
BAD	<i>B-cell lymphoma 2 [Bcl2]-associated agonist of cell death</i>
BIM	<i>Bcl2-like 11</i>
BMI	<i>body mass index</i>
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C-Terminus, C-terminal (CT)	Carboxyterminus, carboxyterminal
Casp9	Caspase 9
cDNA	komplementäre DNA
CDS	Codierende Sequenz
CDK	cyclin dependent kinase
CPT1	<i>Carnitine Palmitoyltransferase 1</i>
CR-Domäne	Cystein-reiche Domäne
Cyt c	Cytochrom c
Dapi	4',6-Diamidin-2'-Phenylindol-Dihydrochlorid
DAG	Diacylglycerol
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate

Abkürzungsverzeichnis

dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ENH	<i>Enigma Homolog</i>
eNOS	<i>endothelial nitric oxide (NO) synthase</i>
ERK1/2	Extracellular-signal Regulated <i>Kinase 1/2</i>
<i>Exp.</i>	<i>Expositionszeit (Belichtungszeit)</i>
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>
FCS	<i>Fötales Kälberserum</i>
FITC	fluorescein isothiocyanate
FOXO	<i>Forkhead-box O transcription factor</i>
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
GAB1	<i>Grb2-associated binding protein 1</i>
GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factor</i>
GLUT	<i>Glukosetransporter</i>
<i>Grb2</i>	<i>growth factor receptor-bound protein 2</i>
GSK3	<i>Glykogensynthase-Kinase 3</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	<i>Guanosintriphosphat</i>
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
HOMA-IR	homeostasis model assessment of insulin resistance
HPA	habitual physical activity
HRP	<i>Meerrettich-Peroxidase</i>
Ig	Immunglobulin
IGF-1 / IGF-2	<i>Insulin like growth factor 1 / 2</i>
IGF-1R	<i>Insulin like growth factor 1 receptor</i>
IGFBP-6	<i>Insulin-like growth factor binding protein 6</i>
IRS	Insulin receptor substrate
Ins	Insulin

Abkürzungsverzeichnis

IP, Co-IP	Immunpräzipitation, Co-Immunpräzipitation
IR	Insulinrezeptor
IRS	Insulinrezeptor-Substrat
ISI	insulin sensitivity index
JAB1	jun activation-domain-binding protein 1
JM-Domäne	Juxtamembran-Domäne
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KD	Knockdown
LIM	L in11, I sl-1 und M ec-3
LMP	<i>Lim Mineralization Protein</i>
MAF	minor allele frequency
Myf5	<i>Myogenic factor 5</i>
MYH2	<i>Myosin Heavy Chain 2</i>
MYH4	<i>Myosin Heavy Chain 4</i>
MYOG	<i>Myogenin</i>
MAGUK	<i>Membrane-Associated Guanylat-Kinase</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPKK (MAP2K)	Mitogen-aktivierte-Proteinkinase Kinase
MAPKKK (MAP3K)	Mitogen-aktivierte-Proteinkinase-Kinase Kinase
MDM2	Mouse double minute 2 E3-Ubiquitin-Protein Ligase
MEF2	Myocyte enhancer factor 2
MEK	MAPK ERK Kinase
min	Minuten
MKK4	Dualspezifische Mitogen-aktivierte Proteinkinase 4
MKK7	Dualspezifische Mitogen-aktivierte Proteinkinase 7
ml	Milliliter
mRNA	messenger RNA
MNK	<i>MAPK i</i> nteracting <i>K</i> inases
MRF	myogenic regulatory factor
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>

Abkürzungsverzeichnis

mTORC1/2	<i>Mammalian target of rapamycin complex 1/2</i>
Myc	<i>Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog</i>
nm	Nanometer
NRF1	Nuclear Respiratory Factor 1
N-Terminus, N-terminal (NT)	Aminotermius, aminoterminal
OD	Optische Dichte
OGTT	oraler Glukosetoleranztest
p-	phospho-
p110	PI3K katalytische Untereinheit
p70/p85 S6K	<i>p70/p85 ribosomal S6 kinase</i>
p85	PI3K regulatorische Untereinheit
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
par	parental
Par6 α	<i>Partitioning defective protein-6α</i>
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDK1	<i>phosphoinositide-dependent-kinase-1</i>
PDLIM7	<i>PDZ and LIM domain protein 7</i>
PDZ	PSD95, Discs large und Zonula occludentes-1
PH-Domäne	Pleckstrin-homology-Domäne
PHLPP	<i>Pleckstrin Homology domain Leucine-rich repeat Protein Phosphatase</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositide 3-kinase</i>
PIP2	Phosphatidylinositol-(4,5)-diphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat
PKB	<i>Proteinkinase B (Akt)</i>
PKC	<i>Proteinkinase C</i>
PP2A	<i>Protein Phosphatase 2A</i>
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor
PPARGC1 α	<i>PPARγ Co-Activator 1 α (PGC1α)</i>
PRAS40	<i>Proline-Rich Akt Substrate of 40kDa</i>
PSD-95	<i>Postsynaptic density protein 95</i>

Abkürzungsverzeichnis

PTB-Domäne	Phosphotyrosin-Bindedomäne
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin homolog</i>
qRT-PCR	quantitative real-time PCR
Raf	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
RAU	Relative Arbitrary Units
RET	<i>rearranged during transfection</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	rounds per minute
Rps13	<i>Ribosomales Protein S 13</i>
RSK	<i>Ribosomal S6 kinase</i>
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	standard error of the mean
Ser	Serin
SH2	Src-homologe Domäne 2
Shc	<i>Src homologous and collagen</i>
shRNA	small hairpin RNA
SMURF1	<i>Smad ubiquitin regulatory factor 1</i>
SNP	single nucleotide polymorphism
SOD2	<i>Superoxid-Dismutase 2</i>
Sos	<i>son of sevenless</i>
STAT3	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>
T2D	Typ-2-Diabetes
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFAM	Mitochondrialer Transkriptionsfaktor A
TGF- β	<i>Transforming-Growth-Factor-beta</i>
Thr	Threonin
TK	Tyrosinkinase

Abkürzungsverzeichnis

TM	Transmembrandomäne
TSC	<i>tuberous sclerosis complex</i>
TUNEL	T dT-mediated dUTP-biotin n ick e nd l abeling
UCP	<i>Uncoupling-Protein</i>
ÜE	Überexpression
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
Y2H	Yeast Two-Hybrid
ZASP	<i>Z-band alternatively Spliced PDZ-motif Protein</i>
µl	Mikroliter

7. Danksagung

Ich danke,

... Herrn Prof. Dr. Harald Staiger herzlich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die gute Betreuung, sein stets offenes Ohr für Fragen und seine konstruktive Kritik.

... Herrn Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee für die Übernahme des Zweitgutachtens und den unkomplizierten freundlichen Umgang.

... Herrn Prof. Dr. H.-U. Häring für die Möglichkeit in seiner Abteilung an der Uniklinik Tübingen zu arbeiten.

... Herrn Dr. Fausto Machichao für die Durchführung der SNP-Genotypisierungen.

... der gesamten AG Lammers für die Bereitstellung von Materialien.

... allen Mitarbeitern der Inneren Medizin IV, ganz besonders Carina Hermann, Lisa Ulmer, Anna-Maria Ordelheide, Siglinde Haug, Gabriele Kaiser, Madhura Panse, Andrea Janessa und Tina Sartorius für die tolle Arbeitsatmosphäre und Unterstützung im Labor.

... ganz besonders meinen Freunden und meiner Familie.

... ganz besonders meiner Frau Verena und unserem Sohn Toni, die es immer schafften mir auch in schwierigen Situationen ein Lächeln ins Gesicht zu zaubern. Ich bin euch unendlich dankbar für alles!

8. Literaturverzeichnis

Aguirre, V., Uchida, T., Yenush, L., Davis, R., and White, M.F. (2000). The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *The Journal of biological chemistry* 275, 9047-9054.

Aguirre, V., Werner, E.D., Giraud, J., Lee, Y.H., Shoelson, S.E., and White, M.F. (2002). Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *The Journal of biological chemistry* 277, 1531-1537.

Aikin, R., Maysinger, D., and Rosenberg, L. (2004). Cross-talk between phosphatidylinositol 3-kinase/AKT and c-jun NH2-terminal kinase mediates survival of isolated human islets. *Endocrinology* 145, 4522-4531.

Akimoto, T., Pohnert, S.C., Li, P., Zhang, M., Gumbs, C., Rosenberg, P.B., Williams, R.S., and Yan, Z. (2005). Exercise stimulates Pgc-1alpha transcription in skeletal muscle through activation of the p38 MAPK pathway. *The Journal of biological chemistry* 280, 19587-19593.

Alessi, D.R., Cuenda, A., Cohen, P., Dudley, D.T., and Saltiel, A.R. (1995). PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *The Journal of biological chemistry* 270, 27489-27494.

Alessi, D.R., James, S.R., Downes, C.P., Holmes, A.B., Gaffney, P.R., Reese, C.B., and Cohen, P. (1997). Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Current biology* : CB 7, 261-269.

Ameyar, M., Wisniewska, M., and Weitzman, J.B. (2003). A role for AP-1 in apoptosis: the case for and against. *Biochimie* 85, 747-752.

Andres, V., and Walsh, K. (1996). Myogenin expression, cell cycle withdrawal, and phenotypic differentiation are temporally separable events that precede cell fusion upon myogenesis. *The Journal of cell biology* 132, 657-666.

Arimura, T., Hayashi, T., Terada, H., Lee, S.Y., Zhou, Q., Takahashi, M., Ueda, K., Nouchi, T., Hohda, S., Shibutani, M., et al. (2004). A Cypher/ZASP mutation associated with dilated cardiomyopathy alters the binding affinity to protein kinase C. *The Journal of biological chemistry* 279, 6746-6752.

Arnold, H.H., and Braun, T. (1996). Targeted inactivation of myogenic factor genes reveals their role during mouse myogenesis: a review. *The International journal of developmental biology* 40, 345-353.

Arsenijevic, D., Onuma, H., Pecqueur, C., Raimbault, S., Manning, B.S., Miroux, B., Couplan, E., Alves-Guerra, M.C., Gubern, M., Surwit, R., et al. (2000). Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nature genetics* 26, 435-439.

Artwohl, M., Lindenmair, A., Roden, M., Waldhausl, W.K., Freudenthaler, A., Klosner, G., Ilhan, A., Luger, A., and Baumgartner-Parzer, S.M. (2009). Fatty acids induce apoptosis in human smooth muscle cells depending on chain length, saturation, and duration of exposure. *Atherosclerosis* 202, 351-362.

- Bach, I. (2000). The LIM domain: regulation by association. *Mechanisms of development* 91, 5-17.
- Bandyopadhyay, G., Sajan, M.P., Kanoh, Y., Standaert, M.L., Quon, M.J., Lea-Currie, R., Sen, A., and Farese, R.V. (2002). PKC-zeta mediates insulin effects on glucose transport in cultured preadipocyte-derived human adipocytes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 87, 716-723.
- Bandyopadhyay, G.K., Yu, J.G., Ofrecio, J., and Olefsky, J.M. (2005). Increased p85/55/50 expression and decreased phosphatidylinositol 3-kinase activity in insulin-resistant human skeletal muscle. *Diabetes* 54, 2351-2359.
- Barr, R.K., and Bogoyevitch, M.A. (2001). The c-Jun N-terminal protein kinase family of mitogen-activated protein kinases (JNK MAPKs). *The international journal of biochemistry & cell biology* 33, 1047-1063.
- Barres, R., Gonzalez, T., Le Marchand-Brustel, Y., and Tanti, J.F. (2005). The interaction between the adaptor protein APS and Enigma is involved in actin organisation. *Experimental cell research* 308, 334-344.
- Barres, R., Gremeaux, T., Gual, P., Gonzalez, T., Gugenheim, J., Tran, A., Le Marchand-Brustel, Y., and Tanti, J.F. (2006). Enigma interacts with adaptor protein with PH and SH2 domains to control insulin-induced actin cytoskeleton remodeling and glucose transporter 4 translocation. *Molecular endocrinology* 20, 2864-2875.
- Beeson, M., Sajan, M.P., Dizon, M., Grebenev, D., Gomez-Daspert, J., Miura, A., Kanoh, Y., Powe, J., Bandyopadhyay, G., Standaert, M.L., et al. (2003). Activation of protein kinase C-zeta by insulin and phosphatidylinositol-3,4,5-(PO₄)₃ is defective in muscle in type 2 diabetes and impaired glucose tolerance: amelioration by rosiglitazone and exercise. *Diabetes* 52, 1926-1934.
- Belfiore, A., Frasca, F., Pandini, G., Sciacca, L., and Vigneri, R. (2009). Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocrine reviews* 30, 586-623.
- Bellacosa, A., Kumar, C.C., Di Cristofano, A., and Testa, J.R. (2005). Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting. *Advances in cancer research* 94, 29-86.
- Bellacosa, A., Testa, J.R., Staal, S.P., and Tsichlis, P.N. (1991). A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science* 254, 274-277.
- Berwick, D.C., Dell, G.C., Welsh, G.I., Heesom, K.J., Hers, I., Fletcher, L.M., Cooke, F.T., and Tavaré, J.M. (2004). Protein kinase B phosphorylation of PIKfyve regulates the trafficking of GLUT4 vesicles. *Journal of cell science* 117, 5985-5993.
- Boden, S.D., Liu, Y., Hair, G.A., Helms, J.A., Hu, D., Racine, M., Nanes, M.S., and Titus, L. (1998). LMP-1, a LIM-domain protein, mediates BMP-6 effects on bone formation. *Endocrinology* 139, 5125-5134.
- Bonnard, C., Durand, A., Peyrol, S., Chanseaux, E., Chauvin, M.A., Morio, B., Vidal, H., and Rieusset, J. (2008). Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the

skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice. *The Journal of clinical investigation* 118, 789-800.

Borrello, M.G., Mercalli, E., Perego, C., Degl'Innocenti, D., Ghizzoni, S., Arighi, E., Eroini, B., Rizzetti, M.G., and Pierotti, M.A. (2002). Differential interaction of Enigma protein with the two RET isoforms. *Biochemical and biophysical research communications* 296, 515-522.

Bossenmaier, B., Mosthaf, L., Mischak, H., Ullrich, A., and Haring, H.U. (1997). Protein kinase C isoforms beta 1 and beta 2 inhibit the tyrosine kinase activity of the insulin receptor. *Diabetologia* 40, 863-866.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 248-254.

Brown, R.A., Domin, J., Arcaro, A., Waterfield, M.D., and Shepherd, P.R. (1999). Insulin activates the alpha isoform of class II phosphoinositide 3-kinase. *The Journal of biological chemistry* 274, 14529-14532.

Brozinick, J.T., Jr., Roberts, B.R., and Dohm, G.L. (2003). Defective signaling through Akt-2 and -3 but not Akt-1 in insulin-resistant human skeletal muscle: potential role in insulin resistance. *Diabetes* 52, 935-941.

Bruce, C.R., Hoy, A.J., Turner, N., Watt, M.J., Allen, T.L., Carpenter, K., Cooney, G.J., Febbraio, M.A., and Kraegen, E.W. (2009). Overexpression of carnitine palmitoyltransferase-1 in skeletal muscle is sufficient to enhance fatty acid oxidation and improve high-fat diet-induced insulin resistance. *Diabetes* 58, 550-558.

Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J., and Greenberg, M.E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96, 857-868.

Bruni, F., Polosa, P.L., Gadaleta, M.N., Cantatore, P., and Roberti, M. (2010). Nuclear respiratory factor 2 induces the expression of many but not all human proteins acting in mitochondrial DNA transcription and replication. *The Journal of biological chemistry* 285, 3939-3948.

Campbell, C.T., Kolesar, J.E., and Kaufman, B.A. (2012). Mitochondrial transcription factor A regulates mitochondrial transcription initiation, DNA packaging, and genome copy number. *Biochimica et biophysica acta* 1819, 921-929.

Cardone, M.H., Roy, N., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Franke, T.F., Stanbridge, E., Frisch, S., and Reed, J.C. (1998). Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282, 1318-1321.

Cargnello, M., and Roux, P.P. (2011). Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 75, 50-83.

Carlson, C.J., Koterski, S., Sciotti, R.J., Pocard, G.B., and Rondinone, C.M. (2003). Enhanced basal activation of mitogen-activated protein kinases in adipocytes from type 2 diabetes: potential role of p38 in the downregulation of GLUT4 expression. *Diabetes* 52, 634-641.

- Carlson, C.J., White, M.F., and Rondinone, C.M. (2004). Mammalian target of rapamycin regulates IRS-1 serine 307 phosphorylation. *Biochemical and biophysical research communications* 316, 533-539.
- Caro, J.F., Sinha, M.K., Raju, S.M., Ittoop, O., Pories, W.J., Flickinger, E.G., Meelheim, D., and Dohm, G.L. (1987). Insulin receptor kinase in human skeletal muscle from obese subjects with and without noninsulin dependent diabetes. *The Journal of clinical investigation* 79, 1330-1337.
- Carvalho, E., Eliasson, B., Wesslau, C., and Smith, U. (2000). Impaired phosphorylation and insulin-stimulated translocation to the plasma membrane of protein kinase B/Akt in adipocytes from Type II diabetic subjects. *Diabetologia* 43, 1107-1115.
- Castellano, E., and Downward, J. (2011). RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway. *Genes & cancer* 2, 261-274.
- Caunt, C.J., Finch, A.R., Sedgley, K.R., and McArdle, C.A. (2006). Seven-transmembrane receptor signalling and ERK compartmentalization. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 17, 276-283.
- Chambers, J., and Rabbitts, T.H. (2015). LMO2 at 25 years: a paradigm of chromosomal translocation proteins. *Open biology* 5, 150062.
- Chan, O., Inouye, K., Riddell, M.C., Vranic, M., and Matthews, S.G. (2003). Diabetes and the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Minerva endocrinologica* 28, 87-102.
- Chang, F., Lee, J.T., Navolanic, P.M., Steelman, L.S., Shelton, J.G., Blalock, W.L., Franklin, R.A., and McCubrey, J.A. (2003). Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. *Leukemia* 17, 590-603.
- Chang, F., Steelman, L.S., Shelton, J.G., Lee, J.T., Navolanic, P.M., Blalock, W.L., Franklin, R., and McCubrey, J.A. (2003). Regulation of cell cycle progression and apoptosis by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway (Review). *International journal of oncology* 22, 469-480.
- Charrasse, S., Meriane, M., Comunale, F., Blangy, A., and Gauthier-Rouviere, C. (2002). N-cadherin-dependent cell-cell contact regulates Rho GTPases and beta-catenin localization in mouse C2C12 myoblasts. *The Journal of cell biology* 158, 953-965.
- Chen, D., Zhao, M., Harris, S.E., and Mi, Z. (2004). Signal transduction and biological functions of bone morphogenetic proteins. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 9, 349-358.
- Chen, W.S., Xu, P.Z., Gottlob, K., Chen, M.L., Sokol, K., Shiyanova, T., Roninson, I., Weng, W., Suzuki, R., Tobe, K., et al. (2001). Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene. *Genes & development* 15, 2203-2208.
- Chen, X., Nelson, C.D., Li, X., Winters, C.A., Azzam, R., Sousa, A.A., Leapman, R.D., Gainer, H., Sheng, M., and Reese, T.S. (2011). PSD-95 is required to sustain the molecular organization of the postsynaptic density. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31, 6329-6338.

- Cheng, H., Kimura, K., Peter, A.K., Cui, L., Ouyang, K., Shen, T., Liu, Y., Gu, Y., Dalton, N.D., Evans, S.M., et al. (2010). Loss of enigma homolog protein results in dilated cardiomyopathy. *Circulation research* 107, 348-356.
- Cho, H., Thorvaldsen, J.L., Chu, Q., Feng, F., and Birnbaum, M.J. (2001). Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *The Journal of biological chemistry* 276, 38349-38352.
- Chung, C.T., and Miller, R.H. (1988). A rapid and convenient method for the preparation and storage of competent bacterial cells. *Nucleic acids research* 16, 3580.
- Ciaraldi, T.P., Mudaliar, S., Barzin, A., Macievic, J.A., Edelman, S.V., Park, K.S., and Henry, R.R. (2005). Skeletal muscle GLUT1 transporter protein expression and basal leg glucose uptake are reduced in type 2 diabetes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 90, 352-358.
- Claret, F.X., Hibi, M., Dhut, S., Toda, T., and Karin, M. (1996). A new group of conserved coactivators that increase the specificity of AP-1 transcription factors. *Nature* 383, 453-457.
- Clemens, K.R., Wolf, V., McBryant, S.J., Zhang, P., Liao, X., Wright, P.E., and Gottesfeld, J.M. (1993). Molecular basis for specific recognition of both RNA and DNA by a zinc finger protein. *Science* 260, 530-533.
- Clemente, C.F., Corat, M.A., Saad, S.T., and Franchini, K.G. (2005). Differentiation of C2C12 myoblasts is critically regulated by FAK signaling. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 289, R862-870.
- Coll, T., Jove, M., Rodriguez-Calvo, R., Eyre, E., Palomer, X., Sanchez, R.M., Merlos, M., Laguna, J.C., and Vazquez-Carrera, M. (2006). Palmitate-mediated downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1alpha in skeletal muscle cells involves MEK1/2 and nuclear factor-kappaB activation. *Diabetes* 55, 2779-2787.
- Coso, O.A., Chiariello, M., Yu, J.C., Teramoto, H., Crespo, P., Xu, N., Miki, T., and Gutkind, J.S. (1995). The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell* 81, 1137-1146.
- Coulombe, P., and Meloche, S. (2007). Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions. *Biochimica et biophysica acta* 1773, 1376-1387.
- Cozzone, D., Frojdo, S., Disse, E., Debard, C., Laville, M., Pirola, L., and Vidal, H. (2008). Isoform-specific defects of insulin stimulation of Akt/protein kinase B (PKB) in skeletal muscle cells from type 2 diabetic patients. *Diabetologia* 51, 512-521.
- Cross, D.A., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M., and Hemmings, B.A. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378, 785-789.
- Crunkhorn, S., Dearie, F., Mantzoros, C., Gami, H., da Silva, W.S., Espinoza, D., Faucette, R., Barry, K., Bianco, A.C., and Patti, M.E. (2007). Peroxisome proliferator activator receptor gamma coactivator-1 expression is reduced in obesity: potential pathogenic role of saturated fatty acids and p38 mitogen-activated protein kinase activation. *The Journal of biological chemistry* 282, 15439-15450.

- Cuadrado, A., and Nebreda, A.R. (2010). Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *The Biochemical journal* 429, 403-417.
- Cuenda, A., and Rousseau, S. (2007). p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochimica et biophysica acta* 1773, 1358-1375.
- Cusi, K., Maezono, K., Osman, A., Pendergrass, M., Patti, M.E., Pratipanawatr, T., DeFronzo, R.A., Kahn, C.R., and Mandarino, L.J. (2000). Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *The Journal of clinical investigation* 105, 311-320.
- Datta, S.R., Katsov, A., Hu, L., Petros, A., Fesik, S.W., Yaffe, M.B., and Greenberg, M.E. (2000). 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. *Molecular cell* 6, 41-51.
- Davies, C., and Tournier, C. (2012). Exploring the function of the JNK (c-Jun N-terminal kinase) signalling pathway in physiological and pathological processes to design novel therapeutic strategies. *Biochemical Society transactions* 40, 85-89.
- Davis, R.J. (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103, 239-252.
- De Meyts, P., and Whittaker, J. (2002). Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design. *Nature reviews Drug discovery* 1, 769-783.
- Dedieu, S., Mazeret, G., Cottin, P., and Brustis, J.J. (2002). Involvement of myogenic regulator factors during fusion in the cell line C2C12. *The International journal of developmental biology* 46, 235-241.
- del Peso, L., Gonzalez-Garcia, M., Page, C., Herrera, R., and Nunez, G. (1997). Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 278, 687-689.
- Denley, A., Wallace, J.C., Cosgrove, L.J., and Forbes, B.E. (2003). The insulin receptor isoform exon 11- (IR-A) in cancer and other diseases: a review. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* 35, 778-785.
- Deshaies, R.J., and Joazeiro, C.A. (2009). RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annual review of biochemistry* 78, 399-434.
- Dhanasekaran, D.N., Kashef, K., Lee, C.M., Xu, H., and Reddy, E.P. (2007). Scaffold proteins of MAP-kinase modules. *Oncogene* 26, 3185-3202.
- Dhanasekaran, D.N., and Reddy, E.P. (2008). JNK signaling in apoptosis. *Oncogene* 27, 6245-6251.
- Dhillon, A.S., and Kolch, W. (2002). Untying the regulation of the Raf-1 kinase. *Archives of biochemistry and biophysics* 404, 3-9.
- Dijkers, P.F., Birkenkamp, K.U., Lam, E.W., Thomas, N.S., Lammers, J.W., Koenderman, L., and Coffey, P.J. (2002). FKHR-L1 can act as a critical effector of cell death induced by cytokine withdrawal: protein kinase B-enhanced cell survival through maintenance of mitochondrial integrity. *The Journal of cell biology* 156, 531-542.

- Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R., and Zeiher, A.M. (1999). Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399, 601-605.
- Dunn, C., Wiltshire, C., MacLaren, A., and Gillespie, D.A. (2002). Molecular mechanism and biological functions of c-Jun N-terminal kinase signalling via the c-Jun transcription factor. *Cellular signalling* 14, 585-593.
- Durick, K., Gill, G.N., and Taylor, S.S. (1998). Shc and Enigma are both required for mitogenic signaling by Ret/ptc2. *Molecular and cellular biology* 18, 2298-2308.
- Durick, K., Wu, R.Y., Gill, G.N., and Taylor, S.S. (1996). Mitogenic signaling by Ret/ptc2 requires association with enigma via a LIM domain. *The Journal of biological chemistry* 271, 12691-12694.
- Ebi, H., Costa, C., Faber, A.C., Nishtala, M., Kotani, H., Juric, D., Della Pelle, P., Song, Y., Yano, S., Mino-Kenudson, M., et al. (2013). PI3K regulates MEK/ERK signaling in breast cancer via the Rac-GEF, P-Rex1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 21124-21129.
- Eguez, L., Lee, A., Chavez, J.A., Miinea, C.P., Kane, S., Lienhard, G.E., and McGraw, T.E. (2005). Full intracellular retention of GLUT4 requires AS160 Rab GTPase activating protein. *Cell metabolism* 2, 263-272.
- Engelman, J.A., Luo, J., and Cantley, L.C. (2006). The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature reviews Genetics* 7, 606-619.
- Erion, D.M., and Shulman, G.I. (2010). Diacylglycerol-mediated insulin resistance. *Nature medicine* 16, 400-402.
- Falasca, M., Hughes, W.E., Dominguez, V., Sala, G., Fostira, F., Fang, M.Q., Cazzolli, R., Shepherd, P.R., James, D.E., and Maffucci, T. (2007). The role of phosphoinositide 3-kinase C2alpha in insulin signaling. *The Journal of biological chemistry* 282, 28226-28236.
- Fan, J.S., and Zhang, M. (2002). Signaling complex organization by PDZ domain proteins. *Neuro-Signals* 11, 315-321.
- Fanger, G.R., Johnson, N.L., and Johnson, G.L. (1997). MEK kinases are regulated by EGF and selectively interact with Rac/Cdc42. *The EMBO journal* 16, 4961-4972.
- Farese, R.V., Sajan, M.P., and Standaert, M.L. (2005). Atypical protein kinase C in insulin action and insulin resistance. *Biochemical Society transactions* 33, 350-353.
- Fei, Q., Boden, S.D., Sangadala, S., Viggewarapu, M., Liu, Y., and Titus, L. (2007). Truncated human LMP-1 triggers differentiation of C2C12 cells to an osteoblastic phenotype in vitro. *Acta biochimica et biophysica Sinica* 39, 693-700.
- Feng, J., Park, J., Cron, P., Hess, D., and Hemmings, B.A. (2004). Identification of a PKB/Akt hydrophobic motif Ser-473 kinase as DNA-dependent protein kinase. *The Journal of biological chemistry* 279, 41189-41196.
- Fernandez-Marcos, P.J., and Auwerx, J. (2011). Regulation of PGC-1alpha, a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. *The American journal of clinical nutrition* 93, 884S-890.

- Ferri, P., Barbieri, E., Burattini, S., Guescini, M., D'Emilio, A., Biagiotti, L., Del Grande, P., De Luca, A., Stocchi, V., and Falcieri, E. (2009). Expression and subcellular localization of myogenic regulatory factors during the differentiation of skeletal muscle C2C12 myoblasts. *Journal of cellular biochemistry* 108, 1302-1317.
- Fey, D., Croucher, D.R., Kolch, W., and Kholodenko, B.N. (2012). Crosstalk and signaling switches in mitogen-activated protein kinase cascades. *Frontiers in physiology* 3, 355.
- Finck, B.N., and Kelly, D.P. (2006). PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *The Journal of clinical investigation* 116, 615-622.
- Francetic, T., and Li, Q. (2011). Skeletal myogenesis and Myf5 activation. *Transcription* 2, 109-114.
- Franke, T.F., Hornik, C.P., Segev, L., Shostak, G.A., and Sugimoto, C. (2003). PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene* 22, 8983-8998.
- Franke, T.F., Kaplan, D.R., Cantley, L.C., and Toker, A. (1997). Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science* 275, 665-668.
- Fujishiro, M., Gotoh, Y., Katagiri, H., Sakoda, H., Ogihara, T., Anai, M., Onishi, Y., Ono, H., Abe, M., Shojima, N., et al. (2003). Three mitogen-activated protein kinases inhibit insulin signaling by different mechanisms in 3T3-L1 adipocytes. *Molecular endocrinology* 17, 487-497.
- Fulton, D., Gratton, J.P., McCabe, T.J., Fontana, J., Fujio, Y., Walsh, K., Franke, T.F., Papapetropoulos, A., and Sessa, W.C. (1999). Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 399, 597-601.
- Gallagher, E.D., Gutowski, S., Sternweis, P.C., and Cobb, M.H. (2004). RhoA binds to the amino terminus of MEKK1 and regulates its kinase activity. *The Journal of biological chemistry* 279, 1872-1877.
- Garlid, K.D., Jaburek, M., Jezek, P., and Varecha, M. (2000). How do uncoupling proteins uncouple? *Biochimica et biophysica acta* 1459, 383-389.
- Geyer, M., and Wittinghofer, A. (1997). GEFs, GAPs, GDIs and effectors: taking a closer (3D) look at the regulation of Ras-related GTP-binding proteins. *Current opinion in structural biology* 7, 786-792.
- Gharbi, S.I., Zvelebil, M.J., Shuttleworth, S.J., Hancox, T., Saghir, N., Timms, J.F., and Waterfield, M.D. (2007). Exploring the specificity of the PI3K family inhibitor LY294002. *The Biochemical journal* 404, 15-21.
- Golden, S.H., Wand, G.S., Malhotra, S., Kamel, I., and Horton, K. (2011). Reliability of hypothalamic-pituitary-adrenal axis assessment methods for use in population-based studies. *European journal of epidemiology* 26, 511-525.
- Good, M.C., Zalatan, J.G., and Lim, W.A. (2011). Scaffold proteins: hubs for controlling the flow of cellular information. *Science* 332, 680-686.
- Gual, P., Gremeaux, T., Gonzalez, T., Le Marchand-Brustel, Y., and Tanti, J.F. (2003). MAP kinases and mTOR mediate insulin-induced phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on serine residues 307, 612 and 632. *Diabetologia* 46, 1532-1542.

- Gual, P., Le Marchand-Brustel, Y., and Tanti, J.F. (2005). Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie* 87, 99-109.
- Guo, K., Wang, J., Andres, V., Smith, R.C., and Walsh, K. (1995). MyoD-induced expression of p21 inhibits cyclin-dependent kinase activity upon myocyte terminal differentiation. *Molecular and cellular biology* 15, 3823-3829.
- Guo, X., and Wang, X.F. (2009). Signaling cross-talk between TGF-beta/BMP and other pathways. *Cell research* 19, 71-88.
- Gupta, S., Barrett, T., Whitmarsh, A.J., Cavanagh, J., Sluss, H.K., Derijard, B., and Davis, R.J. (1996). Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *The EMBO journal* 15, 2760-2770.
- Guy, P.M., Kenny, D.A., and Gill, G.N. (1999). The PDZ domain of the LIM protein enigma binds to beta-tropomyosin. *Molecular biology of the cell* 10, 1973-1984.
- Haeusgen, W., Herdegen, T., and Waetzig, V. (2011). The bottleneck of JNK signaling: molecular and functional characteristics of MKK4 and MKK7. *European journal of cell biology* 90, 536-544.
- Halevy, O., Novitch, B.G., Spicer, D.B., Skapek, S.X., Rhee, J., Hannon, G.J., Beach, D., and Lassar, A.B. (1995). Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD. *Science* 267, 1018-1021.
- Han, H.F., and Beckerle, M.C. (2009). The ALP-Enigma protein ALP-1 functions in actin filament organization to promote muscle structural integrity in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular biology of the cell* 20, 2361-2370.
- Handberg, A., Vaag, A., Vinten, J., and Beck-Nielsen, H. (1993). Decreased tyrosine kinase activity in partially purified insulin receptors from muscle of young, non-obese first degree relatives of patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 36, 668-674.
- Hanke, S., and Mann, M. (2009). The phosphotyrosine interactome of the insulin receptor family and its substrates IRS-1 and IRS-2. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 8, 519-534.
- Harris, C.C. (1996). Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *Journal of the National Cancer Institute* 88, 1442-1455.
- Hasty, P., Bradley, A., Morris, J.H., Edmondson, D.G., Venuti, J.M., Olson, E.N., and Klein, W.H. (1993). Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. *Nature* 364, 501-506.
- Hawkins, P.T., Eguinoa, A., Qiu, R.G., Stokoe, D., Cooke, F.T., Walters, R., Wennstrom, S., Claesson-Welsh, L., Evans, T., Symons, M., et al. (1995). PDGF stimulates an increase in GTP-Rac via activation of phosphoinositide 3-kinase. *Current biology : CB* 5, 393-403.
- Henique, C., Mansouri, A., Fumey, G., Lenoir, V., Girard, J., Bouillaud, F., Prip-Buus, C., and Cohen, I. (2010). Increased mitochondrial fatty acid oxidation is sufficient to protect skeletal muscle cells from palmitate-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 285, 36818-36827.

- Heron-Milhavet, L., Franckhauser, C., Rana, V., Berthenet, C., Fisher, D., Hemmings, B.A., Fernandez, A., and Lamb, N.J. (2006). Only Akt1 is required for proliferation, while Akt2 promotes cell cycle exit through p21 binding. *Molecular and cellular biology* 26, 8267-8280.
- Hitchler, M.J., Oberley, L.W., and Domann, F.E. (2008). Epigenetic silencing of SOD2 by histone modifications in human breast cancer cells. *Free radical biology & medicine* 45, 1573-1580.
- Horiuchi, Y., Arai, M., Niizato, K., Iritani, S., Noguchi, E., Ohtsuki, T., Koga, M., Kato, T., Itokawa, M., and Arinami, T. (2006). A polymorphism in the PDLIM5 gene associated with gene expression and schizophrenia. *Biological psychiatry* 59, 434-439.
- Horiuchi, Y., Ishikawa, M., Kaito, N., Iijima, Y., Tanabe, Y., Ishiguro, H., and Arinami, T. (2013). Experimental evidence for the involvement of PDLIM5 in mood disorders in hetero knockout mice. *PLoS one* 8, e59320.
- Hotamisligil, G.S. (2005). Role of endoplasmic reticulum stress and c-Jun NH2-terminal kinase pathways in inflammation and origin of obesity and diabetes. *Diabetes* 54 Suppl 2, S73-78.
- Hribal, M.L., D'Alfonso, R., Giovannone, B., Lauro, D., Liu, Y.Y., Borboni, P., Federici, M., Lauro, R., and Sesti, G. (2001). The sulfonylurea glimepiride regulates intracellular routing of the insulin-receptor complexes through their interaction with specific protein kinase C isoforms. *Molecular pharmacology* 59, 322-330.
- Huang, G., Shi, L.Z., and Chi, H. (2009). Regulation of JNK and p38 MAPK in the immune system: signal integration, propagation and termination. *Cytokine* 48, 161-169.
- Hubbard, S.R. (1997). Crystal structure of the activated insulin receptor tyrosine kinase in complex with peptide substrate and ATP analog. *The EMBO journal* 16, 5572-5581.
- Iijima, Y., Laser, M., Shiraishi, H., Willey, C.D., Sundaravadivel, B., Xu, L., McDermott, P.J., and Kuppaswamy, D. (2002). c-Raf/MEK/ERK pathway controls protein kinase C-mediated p70S6K activation in adult cardiac muscle cells. *The Journal of biological chemistry* 277, 23065-23075.
- Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J., and Guan, K.L. (2002). TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nature cell biology* 4, 648-657.
- Itani, S.I., Ruderman, N.B., Schmieder, F., and Boden, G. (2002). Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and I κ B α . *Diabetes* 51, 2005-2011.
- Jaeschke, A., Czech, M.P., and Davis, R.J. (2004). An essential role of the JIP1 scaffold protein for JNK activation in adipose tissue. *Genes & development* 18, 1976-1980.
- James, S.R., Downes, C.P., Gigg, R., Grove, S.J., Holmes, A.B., and Alessi, D.R. (1996). Specific binding of the Akt-1 protein kinase to phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate without subsequent activation. *The Biochemical journal* 315 (Pt 3), 709-713.
- Jimenez, C., Hernandez, C., Pimentel, B., and Carrera, A.C. (2002). The p85 regulatory subunit controls sequential activation of phosphoinositide 3-kinase by Tyr kinases and Ras. *The Journal of biological chemistry* 277, 41556-41562.

- Jones, P.F., Jakubowicz, T., Pitossi, F.J., Maurer, F., and Hemmings, B.A. (1991). Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 4171-4175.
- Jorgensen, S.B., Wojtaszewski, J.F., Viollet, B., Andreelli, F., Birk, J.B., Hellsten, Y., Schjerling, P., Vaulont, S., Neufer, P.D., Richter, E.A., et al. (2005). Effects of alpha-AMPK knockout on exercise-induced gene activation in mouse skeletal muscle. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19, 1146-1148.
- Jung, C.R., Lim, J.H., Choi, Y., Kim, D.G., Kang, K.J., Noh, S.M., and Im, D.S. (2010). Enigma negatively regulates p53 through MDM2 and promotes tumor cell survival in mice. *The Journal of clinical investigation* 120, 4493-4506.
- Kales, S.C., Nau, M.M., Merchant, A.S., and Lipkowitz, S. (2014). Enigma prevents Cbl-mediated ubiquitination and degradation of RETMEN2A. *PloS one* 9, e87116.
- Kaliman, P., Baron, V., Alengrin, F., Takata, Y., Webster, N.J., Olefsky, J.M., and Van Obberghen, E. (1993). The insulin receptor C-terminus is involved in regulation of the receptor kinase activity. *Biochemistry* 32, 9539-9544.
- Kang, D., Kim, S.H., and Hamasaki, N. (2007). Mitochondrial transcription factor A (TFAM): roles in maintenance of mtDNA and cellular functions. *Mitochondrion* 7, 39-44.
- Karandikar, M., Xu, S., and Cobb, M.H. (2000). MEKK1 binds raf-1 and the ERK2 cascade components. *The Journal of biological chemistry* 275, 40120-40127.
- Katagiri, T., Yamaguchi, A., Komaki, M., Abe, E., Takahashi, N., Ikeda, T., Rosen, V., Wozney, J.M., Fujisawa-Sehara, A., and Suda, T. (1994). Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *The Journal of cell biology* 127, 1755-1766.
- Kato, T., Iwayama, Y., Kakiuchi, C., Iwamoto, K., Yamada, K., Minabe, Y., Nakamura, K., Mori, N., Fujii, K., Nanko, S., et al. (2005). Gene expression and association analyses of LIM (PDLIM5) in bipolar disorder and schizophrenia. *Molecular psychiatry* 10, 1045-1055.
- Kayali, A.G., Austin, D.A., and Webster, N.J. (2000). Stimulation of MAPK cascades by insulin and osmotic shock: lack of an involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* 49, 1783-1793.
- Keller, S.R., Lamphere, L., Lavan, B.E., Kuhne, M.R., and Lienhard, G.E. (1993). Insulin and IGF-I signaling through the insulin receptor substrate 1. *Molecular reproduction and development* 35, 346-351; discussion 351-342.
- Kellerer, M., Mushack, J., Seffer, E., Mischak, H., Ullrich, A., and Haring, H.U. (1998). Protein kinase C isoforms alpha, delta and theta require insulin receptor substrate-1 to inhibit the tyrosine kinase activity of the insulin receptor in human kidney embryonic cells (HEK 293 cells). *Diabetologia* 41, 833-838.
- Kelly, D.P., and Scarpulla, R.C. (2004). Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes & development* 18, 357-368.

- Keshet, Y., and Seger, R. (2010). The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. *Methods in molecular biology* 661, 3-38.
- Khurana, A., and Dey, C.S. (2004). Involvement of c-Jun N-terminal kinase activities in skeletal muscle differentiation. *Journal of muscle research and cell motility* 25, 645-655.
- Khurana, T., Khurana, B., and Noegel, A.A. (2002). LIM proteins: association with the actin cytoskeleton. *Protoplasma* 219, 1-12.
- King, W.G., Mattaliano, M.D., Chan, T.O., Tschlis, P.N., and Brugge, J.S. (1997). Phosphatidylinositol 3-kinase is required for integrin-stimulated AKT and Raf-1/mitogen-activated protein kinase pathway activation. *Molecular and cellular biology* 17, 4406-4418.
- Klug, A., and Rhodes, D. (1987). Zinc fingers: a novel protein fold for nucleic acid recognition. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 52, 473-482.
- Klug, A., and Schwabe, J.W. (1995). Protein motifs 5. Zinc fingers. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 9, 597-604.
- Knutti, D., and Kralli, A. (2001). PGC-1, a versatile coactivator. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 12, 360-365.
- Knutti, D., Kressler, D., and Kralli, A. (2001). Regulation of the transcriptional coactivator PGC-1 via MAPK-sensitive interaction with a repressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 9713-9718.
- Koistinen, H.A., Chibalin, A.V., and Zierath, J.R. (2003). Aberrant p38 mitogen-activated protein kinase signalling in skeletal muscle from Type 2 diabetic patients. *Diabetologia* 46, 1324-1328.
- Kolch, W. (2000). Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *The Biochemical journal* 351 Pt 2, 289-305.
- Kontaridis, M.I., Liu, X., Zhang, L., and Bennett, A.M. (2002). Role of SHP-2 in fibroblast growth factor receptor-mediated suppression of myogenesis in C2C12 myoblasts. *Molecular and cellular biology* 22, 3875-3891.
- Kotani, K., Hara, K., Kotani, K., Yonezawa, K., and Kasuga, M. (1995). Phosphoinositide 3-kinase as an upstream regulator of the small GTP-binding protein Rac in the insulin signaling of membrane ruffling. *Biochemical and biophysical research communications* 208, 985-990.
- Koya, D., and King, G.L. (1998). Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes* 47, 859-866.
- Kraegen, E.W., Sowden, J.A., Halstead, M.B., Clark, P.W., Rodnick, K.J., Chisholm, D.J., and James, D.E. (1993). Glucose transporters and in vivo glucose uptake in skeletal and cardiac muscle: fasting, insulin stimulation and immunoisolation studies of GLUT1 and GLUT4. *The Biochemical journal* 295 (Pt 1), 287-293.
- Krcmery, J., Gupta, R., Sadleir, R.W., Ahrens, M.J., Misener, S., Kamide, C., Fitchev, P., Losordo, D.W., Crawford, S.E., and Simon, H.G. (2013). Loss of the cytoskeletal protein Pdlim7 predisposes mice to heart defects and hemostatic dysfunction. *PloS one* 8, e80809.

- Krook, A., Roth, R.A., Jiang, X.J., Zierath, J.R., and Wallberg-Henriksson, H. (1998). Insulin-stimulated Akt kinase activity is reduced in skeletal muscle from NIDDM subjects. *Diabetes* 47, 1281-1286.
- Kucharczak, J., Charrasse, S., Comunale, F., Zappulla, J., Robert, B., Teulon-Navarro, I., Pelegrin, A., and Gauthier-Rouviere, C. (2008). R-Cadherin expression inhibits myogenesis and induces myoblast transformation via Rac1 GTPase. *Cancer research* 68, 6559-6568.
- Kumar, N., and Dey, C.S. (2002). Metformin enhances insulin signalling in insulin-dependent and-independent pathways in insulin resistant muscle cells. *British journal of pharmacology* 137, 329-336.
- Kuroda, S., Tokunaga, C., Kiyohara, Y., Higuchi, O., Konishi, H., Mizuno, K., Gill, G.N., and Kikkawa, U. (1996). Protein-protein interaction of zinc finger LIM domains with protein kinase C. *The Journal of biological chemistry* 271, 31029-31032.
- Kyriakis, J.M., and Avruch, J. (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiological reviews* 81, 807-869.
- Larsson, N.G., Wang, J., Wilhelmsson, H., Oldfors, A., Rustin, P., Lewandoski, M., Barsh, G.S., and Clayton, D.A. (1998). Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nature genetics* 18, 231-236.
- Lavrentyev, E.N., Matta, S.G., and Cook, G.A. (2004). Expression of three carnitine palmitoyltransferase-I isoforms in 10 regions of the rat brain during feeding, fasting, and diabetes. *Biochemical and biophysical research communications* 315, 174-178.
- Lawler, S., Fleming, Y., Goedert, M., and Cohen, P. (1998). Synergistic activation of SAPK1/JNK1 by two MAP kinase kinases in vitro. *Current biology : CB* 8, 1387-1390.
- Le Marchand-Brustel, Y., Gremeaux, T., Ballotti, R., and Van Obberghen, E. (1985). Insulin receptor tyrosine kinase is defective in skeletal muscle of insulin-resistant obese mice. *Nature* 315, 676-679.
- Lee, H.J., and Zheng, J.J. (2010). PDZ domains and their binding partners: structure, specificity, and modification. *Cell communication and signaling : CCS* 8, 8.
- Lemmon, M.A., and Schlessinger, J. (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 141, 1117-1134.
- Lenormand, P., Sardet, C., Pages, G., L'Allemain, G., Brunet, A., and Pouyssegur, J. (1993). Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases (p42mapk and p44mapk) but not of their activator MAP kinase kinase (p45mapkk) in fibroblasts. *The Journal of cell biology* 122, 1079-1088.
- Leone, T.C., Lehman, J.J., Finck, B.N., Schaeffer, P.J., Wende, A.R., Boudina, S., Courtois, M., Wozniak, D.F., Sambandam, N., Bernal-Mizrachi, C., et al. (2005). PGC-1alpha deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis. *PLoS biology* 3, e101.

- Li, W., Han, M., and Guan, K.L. (2000). The leucine-rich repeat protein SUR-8 enhances MAP kinase activation and forms a complex with Ras and Raf. *Genes & development* 14, 895-900.
- Liang, H., and Ward, W.F. (2006). PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism. *Advances in physiology education* 30, 145-151.
- Liang, J., Zubovitz, J., Petrocelli, T., Kotchetkov, R., Connor, M.K., Han, K., Lee, J.H., Ciarallo, S., Catzavelos, C., Beniston, R., et al. (2002). PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nature medicine* 8, 1153-1160.
- Lieberman, Z., Plotkin, B., Tennenbaum, T., and Eldar-Finkelman, H. (2008). Coordinated phosphorylation of insulin receptor substrate-1 by glycogen synthase kinase-3 and protein kinase C beta1 in the diabetic fat tissue. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 294, E1169-1177.
- Lin, J., Wu, P.H., Tarr, P.T., Lindenberg, K.S., St-Pierre, J., Zhang, C.Y., Mootha, V.K., Jager, S., Vianna, C.R., Reznick, R.M., et al. (2004). Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1alpha null mice. *Cell* 119, 121-135.
- Ling, C., Poulsen, P., Carlsson, E., Ridderstrale, M., Almgren, P., Wojtaszewski, J., Beck-Nielsen, H., Groop, L., and Vaag, A. (2004). Multiple environmental and genetic factors influence skeletal muscle PGC-1alpha and PGC-1beta gene expression in twins. *The Journal of clinical investigation* 114, 1518-1526.
- Liu, H., Bargouti, M., Zughair, S., Zheng, Z., Liu, Y., Sangadala, S., Boden, S.D., and Titus, L. (2010). Osteoinductive LIM mineralization protein-1 suppresses activation of NF-kappaB and selectively regulates MAPK pathways in pre-osteoclasts. *Bone* 46, 1328-1335.
- Liu, Y., Hair, G.A., Boden, S.D., Vigneswarapu, M., and Titus, L. (2002). Overexpressed LIM mineralization proteins do not require LIM domains to induce bone. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 17, 406-414.
- Lizcano, J.M., and Alessi, D.R. (2002). The insulin signalling pathway. *Current biology : CB* 12, R236-238.
- Lu, Z., and Xu, S. (2006). ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis. *IUBMB life* 58, 621-631.
- Luo, M., Reyna, S., Wang, L., Yi, Z., Carroll, C., Dong, L.Q., Langlais, P., Weintraub, S.T., and Mandarino, L.J. (2005). Identification of insulin receptor substrate 1 serine/threonine phosphorylation sites using mass spectrometry analysis: regulatory role of serine 1223. *Endocrinology* 146, 4410-4416.
- Mahajan, K., and Mahajan, N.P. (2012). PI3K-independent AKT activation in cancers: a treasure trove for novel therapeutics. *Journal of cellular physiology* 227, 3178-3184.
- Malhi, H., Bronk, S.F., Werneburg, N.W., and Gores, G.J. (2006). Free fatty acids induce JNK-dependent hepatocyte lipoapoptosis. *The Journal of biological chemistry* 281, 12093-12101.

- Manning, B.D., and Cantley, L.C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129, 1261-1274.
- Manning, B.D., Tee, A.R., Logsdon, M.N., Blenis, J., and Cantley, L.C. (2002). Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. *Molecular cell* 10, 151-162.
- Matheny, R.W., Jr., and Adamo, M.L. (2009). Effects of PI3K catalytic subunit and Akt isoform deficiency on mTOR and p70S6K activation in myoblasts. *Biochemical and biophysical research communications* 390, 252-257.
- Matschinsky, F.M. (1990). Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic beta-cells and hepatocytes. *Diabetes* 39, 647-652.
- Matsuda, M., and DeFronzo, R.A. (1999). Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes care* 22, 1462-1470.
- Matthews, D.R., Hosker, J.P., Rudenski, A.S., Naylor, B.A., Treacher, D.F., and Turner, R.C. (1985). Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28, 412-419.
- Maturana, A.D., Walchli, S., Iwata, M., Ryser, S., Van Lint, J., Hoshijima, M., Schlegel, W., Ikeda, Y., Tanizawa, K., and Kuroda, S. (2008). Enigma homolog 1 scaffolds protein kinase D1 to regulate the activity of the cardiac L-type voltage-gated calcium channel. *Cardiovascular research* 78, 458-465.
- Mauro, A., Ciccarelli, C., De Cesaris, P., Scoglio, A., Bouche, M., Molinaro, M., Aquino, A., and Zani, B.M. (2002). PKCalpha-mediated ERK, JNK and p38 activation regulates the myogenic program in human rhabdomyosarcoma cells. *Journal of cell science* 115, 3587-3599.
- Mayer, U. (2003). Integrins: redundant or important players in skeletal muscle? *The Journal of biological chemistry* 278, 14587-14590.
- Mayo, L.D., and Donner, D.B. (2001). A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 11598-11603.
- McGarry, J.D., and Brown, N.F. (1997). The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *European journal of biochemistry / FEBS* 244, 1-14.
- Mebratu, Y., and Tesfaigzi, Y. (2009). How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer? *Cell cycle* 8, 1168-1175.
- Meloche, S., and Pouyssegur, J. (2007). The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene* 26, 3227-3239.
- Mendoza, M.C., Er, E.E., and Blenis, J. (2011). The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends in biochemical sciences* 36, 320-328.

- Meriane, M., Roux, P., Primig, M., Fort, P., and Gauthier-Rouviere, C. (2000). Critical activities of Rac1 and Cdc42Hs in skeletal myogenesis: antagonistic effects of JNK and p38 pathways. *Molecular biology of the cell* 11, 2513-2528.
- Metz, H.E., and Houghton, A.M. (2011). Insulin receptor substrate regulation of phosphoinositide 3-kinase. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17, 206-211.
- Miao, L., and St Clair, D.K. (2009). Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free radical biology & medicine* 47, 344-356.
- Michael, L.F., Wu, Z., Cheatham, R.B., Puigserver, P., Adelmant, G., Lehman, J.J., Kelly, D.P., and Spiegelman, B.M. (2001). Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 3820-3825.
- Michaud, N.R., Therrien, M., Cacace, A., Edsall, L.C., Spiegel, S., Rubin, G.M., and Morrison, D.K. (1997). KSR stimulates Raf-1 activity in a kinase-independent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 12792-12796.
- Minamide, A., Boden, S.D., Viggewarapu, M., Hair, G.A., Oliver, C., and Titus, L. (2003). Mechanism of bone formation with gene transfer of the cDNA encoding for the intracellular protein LMP-1. *The Journal of bone and joint surgery American volume* 85-A, 1030-1039.
- Mitra, S.K., and Schlaepfer, D.D. (2006). Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Current opinion in cell biology* 18, 516-523.
- Moeschel, K., Beck, A., Weigert, C., Lammers, R., Kalbacher, H., Voelter, W., Schleicher, E.D., Haring, H.U., and Lehmann, R. (2004). Protein kinase C-zeta-induced phosphorylation of Ser318 in insulin receptor substrate-1 (IRS-1) attenuates the interaction with the insulin receptor and the tyrosine phosphorylation of IRS-1. *The Journal of biological chemistry* 279, 25157-25163.
- Molkentin, J.D., and Olson, E.N. (1996). Defining the regulatory networks for muscle development. *Current opinion in genetics & development* 6, 445-453.
- Moore, M.L., Park, E.A., and McMillin, J.B. (2003). Upstream stimulatory factor represses the induction of carnitine palmitoyltransferase-1 β expression by PGC-1. *The Journal of biological chemistry* 278, 17263-17268.
- Mor, A., and Philips, M.R. (2006). Compartmentalized Ras/MAPK signaling. *Annual review of immunology* 24, 771-800.
- Morbideilli, L., Donnini, S., and Ziche, M. (2003). Role of nitric oxide in the modulation of angiogenesis. *Current pharmaceutical design* 9, 521-530.
- Morrison, D.K. (2012). MAP kinase pathways. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4.
- Morrison, D.K., and Davis, R.J. (2003). Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annual review of cell and developmental biology* 19, 91-118.

- Mu, Y., Jing, R., Peter, A.K., Lange, S., Lin, L., Zhang, J., Ouyang, K., Fang, X., Veevers, J., Zhou, X., et al. (2015). Cypher and Enigma homolog protein are essential for cardiac development and embryonic survival. *Journal of the American Heart Association* 4.
- Murre, C., McCaw, P.S., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L.Y., Jan, Y.N., Cabrera, C.V., Buskin, J.N., Hauschka, S.D., Lassar, A.B., et al. (1989). Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* 58, 537-544.
- Mussig, K., Fiedler, H., Staiger, H., Weigert, C., Lehmann, R., Schleicher, E.D., and Haring, H.U. (2005). Insulin-induced stimulation of JNK and the PI 3-kinase/mTOR pathway leads to phosphorylation of serine 318 of IRS-1 in C2C12 myotubes. *Biochemical and biophysical research communications* 335, 819-825.
- Mussig, K., Staiger, H., Fiedler, H., Moeschel, K., Beck, A., Kellerer, M., and Haring, H.U. (2005). Shp2 is required for protein kinase C-dependent phosphorylation of serine 307 in insulin receptor substrate-1. *The Journal of biological chemistry* 280, 32693-32699.
- Niba, E.T., Nagaya, H., Kanno, T., Tsuchiya, A., Gotoh, A., Tabata, C., Kuribayashi, K., Nakano, T., and Nishizaki, T. (2013). Crosstalk between PI3 kinase/PDK1/Akt/Rac1 and Ras/Raf/MEK/ERK pathways downstream PDGF receptor. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 31, 905-913.
- Owerbach, D., Bell, G.I., Rutter, W.J., and Shows, T.B. (1980). The insulin gene is located on chromosome 11 in humans. *Nature* 286, 82-84.
- Page, J.L., Wang, X., Sordillo, L.M., and Johnson, S.E. (2004). MEKK1 signaling through p38 leads to transcriptional inactivation of E47 and repression of skeletal myogenesis. *The Journal of biological chemistry* 279, 30966-30972.
- Palomer, X., Alvarez-Guardia, D., Rodriguez-Calvo, R., Coll, T., Laguna, J.C., Davidson, M.M., Chan, T.O., Feldman, A.M., and Vazquez-Carrera, M. (2009). TNF-alpha reduces PGC-1alpha expression through NF-kappaB and p38 MAPK leading to increased glucose oxidation in a human cardiac cell model. *Cardiovascular research* 81, 703-712.
- Pan, H., Li, X., Wang, J., Zhang, K., Yang, H., Li, Z., Zheng, Z., and Liu, H. (2015). LIM Mineralization Protein-1 Enhances Bone Morphogenetic Protein-2-Mediated Osteogenesis Through Activation of ERK1/2 MAPK Pathway and Upregulation of Runx2 Transactivity. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 30, 1523-1535.
- Pandini, G., Frasca, F., Mineo, R., Sciacca, L., Vigneri, R., and Belfiore, A. (2002). Insulin/insulin-like growth factor I hybrid receptors have different biological characteristics depending on the insulin receptor isoform involved. *The Journal of biological chemistry* 277, 39684-39695.
- Pawson, T. (1995). Protein modules and signalling networks. *Nature* 373, 573-580.
- Paz, K., Hemi, R., LeRoith, D., Karasik, A., Elhanany, E., Kanety, H., and Zick, Y. (1997). A molecular basis for insulin resistance. Elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and

impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 272, 29911-29918.

Pearce, L.R., Komander, D., and Alessi, D.R. (2010). The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nature reviews Molecular cell biology* 11, 9-22.

Pende, M. (2006). mTOR, Akt, S6 kinases and the control of skeletal muscle growth. *Bulletin du cancer* 93, E39-43.

Pias, E.K., Ekshyyan, O.Y., Rhoads, C.A., Fuseler, J., Harrison, L., and Aw, T.Y. (2003). Differential effects of superoxide dismutase isoform expression on hydroperoxide-induced apoptosis in PC-12 cells. *The Journal of biological chemistry* 278, 13294-13301.

Playford, M.P., Vadali, K., Cai, X., Burridge, K., and Schaller, M.D. (2008). Focal adhesion kinase regulates cell-cell contact formation in epithelial cells via modulation of Rho. *Experimental cell research* 314, 3187-3197.

Potter, C.J., Pedraza, L.G., and Xu, T. (2002). Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2. *Nature cell biology* 4, 658-665.

Qadri, I., Iwahashi, M., Capasso, J.M., Hopken, M.W., Flores, S., Schaack, J., and Simon, F.R. (2004). Induced oxidative stress and activated expression of manganese superoxide dismutase during hepatitis C virus replication: role of JNK, p38 MAPK and AP-1. *The Biochemical journal* 378, 919-928.

Ranganathan, R., and Ross, E.M. (1997). PDZ domain proteins: scaffolds for signaling complexes. *Current biology : CB* 7, R770-773.

Ravichandran, K.S. (2001). Signaling via Shc family adapter proteins. *Oncogene* 20, 6322-6330.

Rescan, P.Y. (2001). Regulation and functions of myogenic regulatory factors in lower vertebrates. *Comparative biochemistry and physiology Part B, Biochemistry & molecular biology* 130, 1-12.

Rial, E., Rodriguez-Sanchez, L., Gallardo-Vara, E., Zaragoza, P., Moyano, E., and Gonzalez-Barroso, M.M. (2010). Lipotoxicity, fatty acid uncoupling and mitochondrial carrier function. *Biochimica et biophysica acta* 1797, 800-806.

Rincon, M., and Davis, R.J. (2009). Regulation of the immune response by stress-activated protein kinases. *Immunological reviews* 228, 212-224.

Rivlin, N., Brosh, R., Oren, M., and Rotter, V. (2011). Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Important Milestones at the Various Steps of Tumorigenesis. *Genes & cancer* 2, 466-474.

Rondinone, C.M., Carvalho, E., Wesslau, C., and Smith, U.P. (1999). Impaired glucose transport and protein kinase B activation by insulin, but not okadaic acid, in adipocytes from subjects with Type II diabetes mellitus. *Diabetologia* 42, 819-825.

Roskoski, R., Jr. (2010). RAF protein-serine/threonine kinases: structure and regulation. *Biochemical and biophysical research communications* 399, 313-317.

- Roskoski, R., Jr. (2012). ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society* 66, 105-143.
- Roskoski, R., Jr. (2012). MEK1/2 dual-specificity protein kinases: structure and regulation. *Biochemical and biophysical research communications* 417, 5-10.
- Sacco, A., Morcavallo, A., Pandini, G., Vigneri, R., and Belfiore, A. (2009). Differential signaling activation by insulin and insulin-like growth factors I and II upon binding to insulin receptor isoform A. *Endocrinology* 150, 3594-3602.
- Sajan, M.P., Standaert, M.L., Miura, A., Bandyopadhyay, G., Vollenweider, P., Franklin, D.M., Lea-Currie, R., and Farese, R.V. (2004). Impaired activation of protein kinase C-zeta by insulin and phosphatidylinositol-3,4,5-(PO4)₃ in cultured preadipocyte-derived adipocytes and myotubes of obese subjects. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 89, 3994-3998.
- Saltiel, A.R., and Kahn, C.R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414, 799-806.
- Samuel, V.T., Liu, Z.X., Wang, A., Beddow, S.A., Geisler, J.G., Kahn, M., Zhang, X.M., Monia, B.P., Bhanot, S., and Shulman, G.I. (2007). Inhibition of protein kinase Cepsilon prevents hepatic insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of clinical investigation* 117, 739-745.
- Sangadala, S., Boden, S.D., Viggewarapu, M., Liu, Y., and Titus, L. (2006). LIM mineralization protein-1 potentiates bone morphogenetic protein responsiveness via a novel interaction with Smurf1 resulting in decreased ubiquitination of Smads. *The Journal of biological chemistry* 281, 17212-17219.
- Sangadala, S., Yoshioka, K., Enyo, Y., Liu, Y., Titus, L., and Boden, S.D. (2014). Characterization of a unique motif in LIM mineralization protein-1 that interacts with jun activation-domain-binding protein 1. *Molecular and cellular biochemistry* 385, 145-157.
- Sano, H., Kane, S., Sano, E., Miinea, C.P., Asara, J.M., Lane, W.S., Garner, C.W., and Lienhard, G.E. (2003). Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation. *The Journal of biological chemistry* 278, 14599-14602.
- Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M., and Sabatini, D.M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307, 1098-1101.
- Sasaoka, T., and Kobayashi, M. (2000). The functional significance of Shc in insulin signaling as a substrate of the insulin receptor. *Endocrine journal* 47, 373-381.
- Scarpulla, R.C. (2008). Nuclear control of respiratory chain expression by nuclear respiratory factors and PGC-1-related coactivator. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1147, 321-334.
- Scarpulla, R.C. (2011). Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochimica et biophysica acta* 1813, 1269-1278.
- Schonwasser, D.C., Marais, R.M., Marshall, C.J., and Parker, P.J. (1998). Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by

- conventional, novel, and atypical protein kinase C isotypes. *Molecular and cellular biology* 18, 790-798.
- Schrauwen, P., Schrauwen-Hinderling, V., Hoeks, J., and Hesselink, M.K. (2010). Mitochondrial dysfunction and lipotoxicity. *Biochimica et biophysica acta* 1801, 266-271.
- Sehgal, V., and Ram, P.T. (2013). Network Motifs in JNK Signaling. *Genes & cancer* 4, 409-413.
- Seino, S., Seino, M., and Bell, G.I. (1990). Human insulin-receptor gene. *Diabetes* 39, 129-133.
- Seino, S., Seino, M., and Bell, G.I. (1990). Human insulin-receptor gene. Partial sequence and amplification of exons by polymerase chain reaction. *Diabetes* 39, 123-128.
- Selcen, D., and Engel, A.G. (2005). Mutations in ZASP define a novel form of muscular dystrophy in humans. *Annals of neurology* 57, 269-276.
- Shao, D., Liu, Y., Liu, X., Zhu, L., Cui, Y., Cui, A., Qiao, A., Kong, X., Liu, Y., Chen, Q., et al. (2010). PGC-1 beta-regulated mitochondrial biogenesis and function in myotubes is mediated by NRF-1 and ERR alpha. *Mitochondrion* 10, 516-527.
- Shin, I., Yakes, F.M., Rojo, F., Shin, N.Y., Bakin, A.V., Baselga, J., and Arteaga, C.L. (2002). PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nature medicine* 8, 1145-1152.
- Shoelson, S.E., White, M.F., and Kahn, C.R. (1988). Tryptic activation of the insulin receptor. Proteolytic truncation of the alpha-subunit releases the beta-subunit from inhibitory control. *The Journal of biological chemistry* 263, 4852-4860.
- Siddle, K. (2012). Molecular basis of signaling specificity of insulin and IGF receptors: neglected corners and recent advances. *Frontiers in endocrinology* 3, 34.
- Slaaby, R., Schaffer, L., Lautrup-Larsen, I., Andersen, A.S., Shaw, A.C., Mathiasen, I.S., and Brandt, J. (2006). Hybrid receptors formed by insulin receptor (IR) and insulin-like growth factor I receptor (IGF-IR) have low insulin and high IGF-1 affinity irrespective of the IR splice variant. *The Journal of biological chemistry* 281, 25869-25874.
- Solaini, G., Sgarbi, G., and Baracca, A. (2011). Oxidative phosphorylation in cancer cells. *Biochimica et biophysica acta* 1807, 534-542.
- Somwar, R., Perreault, M., Kapur, S., Taha, C., Sweeney, G., Ramlal, T., Kim, D.Y., Keen, J., Cote, C.H., Klip, A., et al. (2000). Activation of p38 mitogen-activated protein kinase alpha and beta by insulin and contraction in rat skeletal muscle: potential role in the stimulation of glucose transport. *Diabetes* 49, 1794-1800.
- Song, G., Ouyang, G., and Bao, S. (2005). The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *Journal of cellular and molecular medicine* 9, 59-71.
- Song, M.S., Salmena, L., and Pandolfi, P.P. (2012). The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nature reviews Molecular cell biology* 13, 283-296.
- Southgate, R.J., Bruce, C.R., Carey, A.L., Steinberg, G.R., Walder, K., Monks, R., Watt, M.J., Hawley, J.A., Birnbaum, M.J., and Febbraio, M.A. (2005). PGC-1alpha gene expression is

down-regulated by Akt- mediated phosphorylation and nuclear exclusion of FoxO1 in insulin-stimulated skeletal muscle. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19, 2072-2074.

Staal, S.P. (1987). Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 5034-5037.

Stewart, S., Sundaram, M., Zhang, Y., Lee, J., Han, M., and Guan, K.L. (1999). Kinase suppressor of Ras forms a multiprotein signaling complex and modulates MEK localization. *Molecular and cellular biology* 19, 5523-5534.

Strack, V., Hennige, A.M., Krutzfeldt, J., Bossenmaier, B., Klein, H.H., Kellerer, M., Lammers, R., and Haring, H.U. (2000). Serine residues 994 and 1023/25 are important for insulin receptor kinase inhibition by protein kinase C isoforms beta2 and theta. *Diabetologia* 43, 443-449.

Strohbach, C., Kleinman, S., Linkhart, T., Amaar, Y., Chen, S.T., Mohan, S., and Strong, D. (2008). Potential involvement of the interaction between insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-6 and LIM mineralization protein (LMP)-1 in regulating osteoblast differentiation. *Journal of cellular biochemistry* 104, 1890-1905.

Stronach, B. (2014). Extensive nonmuscle expression and epithelial apicobasal localization of the Drosophila ALP/Enigma family protein, Zasp52. *Gene expression patterns : GEP* 15, 67-79.

Stumvoll, M., Mitrakou, A., Pimenta, W., Jenssen, T., Yki-Jarvinen, H., Van Haefen, T., Renn, W., and Gerich, J. (2000). Use of the oral glucose tolerance test to assess insulin release and insulin sensitivity. *Diabetes care* 23, 295-301.

Sun, X.J., Rothenberg, P., Kahn, C.R., Backer, J.M., Araki, E., Wilden, P.A., Cahill, D.A., Goldstein, B.J., and White, M.F. (1991). Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* 352, 73-77.

Suwa, M., Nakano, H., and Kumagai, S. (2003). Effects of chronic AICAR treatment on fiber composition, enzyme activity, UCP3, and PGC-1 in rat muscles. *Journal of applied physiology* 95, 960-968.

Taha, C., Tsakiridis, T., McCall, A., and Klip, A. (1997). Glucose transporter expression in L6 muscle cells: regulation through insulin- and stress-activated pathways. *The American journal of physiology* 273, E68-76.

Taniguchi, C.M., Emanuelli, B., and Kahn, C.R. (2006). Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nature reviews Molecular cell biology* 7, 85-96.

Tartare-Deckert, S., Sawka-Verhelle, D., Murdaca, J., and Van Obberghen, E. (1995). Evidence for a differential interaction of SHC and the insulin receptor substrate-1 (IRS-1) with the insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor in the yeast two-hybrid system. *The Journal of biological chemistry* 270, 23456-23460.

te Velthuis, A.J., and Bagowski, C.P. (2007). PDZ and LIM domain-encoding genes: molecular interactions and their role in development. *TheScientificWorldJournal* 7, 1470-1492.

- Tennagels, N., Bergschneider, E., Al-Hasani, H., and Klein, H.W. (2000). Autophosphorylation of the two C-terminal tyrosine residues Tyr1316 and Tyr1322 modulates the activity of the insulin receptor kinase in vitro. *FEBS letters* 479, 67-71.
- Therrien, M., Michaud, N.R., Rubin, G.M., and Morrison, D.K. (1996). KSR modulates signal propagation within the MAPK cascade. *Genes & development* 10, 2684-2695.
- Tran, H., Brunet, A., Griffith, E.C., and Greenberg, M.E. (2003). The many forks in FOXO's road. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2003, RE5.
- Tschopp, O., Yang, Z.Z., Brodbeck, D., Dummler, B.A., Hemmings-Mieszczak, M., Watanabe, T., Michaelis, T., Frahm, J., and Hemmings, B.A. (2005). Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis. *Development* 132, 2943-2954.
- Tsunoda, S., Sun, Y., Suzuki, E., and Zuker, C. (2001). Independent anchoring and assembly mechanisms of INAD signaling complexes in Drosophila photoreceptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21, 150-158.
- Tu, Z., Mooney, S.M., and Lee, F.S. (2003). A subdomain of MEKK1 that is critical for binding to MKK4. *Cellular signalling* 15, 65-77.
- Ueda, Y., Hirai, S., Osada, S., Suzuki, A., Mizuno, K., and Ohno, S. (1996). Protein kinase C activates the MEK-ERK pathway in a manner independent of Ras and dependent on Raf. *The Journal of biological chemistry* 271, 23512-23519.
- Ueki, N., Seki, N., Yano, K., Masuho, Y., Saito, T., and Muramatsu, M. (1999). Isolation, tissue expression, and chromosomal assignment of a human LIM protein gene, showing homology to rat enigma homologue (ENH). *Journal of human genetics* 44, 256-260.
- Valdez, M.R., Richardson, J.A., Klein, W.H., and Olson, E.N. (2000). Failure of Myf5 to support myogenic differentiation without myogenin, MyoD, and MRF4. *Developmental biology* 219, 287-298.
- Vander Haar, E., Lee, S.I., Bandhakavi, S., Griffin, T.J., and Kim, D.H. (2007). Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nature cell biology* 9, 316-323.
- Vatta, M., Mohapatra, B., Jimenez, S., Sanchez, X., Faulkner, G., Perles, Z., Sinagra, G., Lin, J.H., Vu, T.M., Zhou, Q., et al. (2003). Mutations in Cypher/ZASP in patients with dilated cardiomyopathy and left ventricular non-compaction. *Journal of the American College of Cardiology* 42, 2014-2027.
- Vega, R.B., Huss, J.M., and Kelly, D.P. (2000). The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. *Molecular and cellular biology* 20, 1868-1876.
- Ventura-Clapier, R., Garnier, A., and Veksler, V. (2008). Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1alpha. *Cardiovascular research* 79, 208-217.

- Wada, T., and Penninger, J.M. (2004). Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene* 23, 2838-2849.
- Wang, H., Xu, Q., Xiao, F., Jiang, Y., and Wu, Z. (2008). Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase alpha, beta, and gamma isoforms in myogenic differentiation. *Molecular biology of the cell* 19, 1519-1528.
- Wang, L., Gout, I., and Proud, C.G. (2001). Cross-talk between the ERK and p70 S6 kinase (S6K) signaling pathways. MEK-dependent activation of S6K2 in cardiomyocytes. *The Journal of biological chemistry* 276, 32670-32677.
- Wang, X., Martindale, J.L., Liu, Y., and Holbrook, N.J. (1998). The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival. *The Biochemical journal* 333 (Pt 2), 291-300.
- Weigert, C., Kron, M., Kalbacher, H., Pohl, A.K., Runge, H., Haring, H.U., Schleicher, E., and Lehmann, R. (2008). Interplay and effects of temporal changes in the phosphorylation state of serine-302, -307, and -318 of insulin receptor substrate-1 on insulin action in skeletal muscle cells. *Molecular endocrinology* 22, 2729-2740.
- Welch, H.C., Coadwell, W.J., Stephens, L.R., and Hawkins, P.T. (2003). Phosphoinositide 3-kinase-dependent activation of Rac. *FEBS letters* 546, 93-97.
- Wen-Sheng, W. (2006). Protein kinase C alpha trigger Ras and Raf-independent MEK/ERK activation for TPA-induced growth inhibition of human hepatoma cell HepG2. *Cancer letters* 239, 27-35.
- Weyrich, P., Neuscheler, D., Melzer, M., Hennige, A.M., Haring, H.U., and Lammers, R. (2007). The Par6alpha/aPKC complex regulates Akt1 activity by phosphorylating Thr34 in the PH-domain. *Molecular and cellular endocrinology* 268, 30-36.
- White, M.F. (1997). The insulin signalling system and the IRS proteins. *Diabetologia* 40 Suppl 2, S2-17.
- Wu, R., Durick, K., Songyang, Z., Cantley, L.C., Taylor, S.S., and Gill, G.N. (1996). Specificity of LIM domain interactions with receptor tyrosine kinases. *The Journal of biological chemistry* 271, 15934-15941.
- Wu, R.Y., and Gill, G.N. (1994). LIM domain recognition of a tyrosine-containing tight turn. *The Journal of biological chemistry* 269, 25085-25090.
- Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., Troy, A., Cinti, S., Lowell, B., Scarpulla, R.C., et al. (1999). Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 98, 115-124.
- Wullschleger, S., Loewith, R., and Hall, M.N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124, 471-484.
- Xu, S., and Cobb, M.H. (1997). MEKK1 binds directly to the c-Jun N-terminal kinases/stress-activated protein kinases. *The Journal of biological chemistry* 272, 32056-32060.
- Yang, H.W., Shin, M.G., Lee, S., Kim, J.R., Park, W.S., Cho, K.H., Meyer, T., and Heo, W.D. (2012). Cooperative activation of PI3K by Ras and Rho family small GTPases. *Molecular cell* 47, 281-290.

- Yoon, S., and Seger, R. (2006). The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth factors* 24, 21-44.
- Yu, C., Chen, Y., Cline, G.W., Zhang, D., Zong, H., Wang, Y., Bergeron, R., Kim, J.K., Cushman, S.W., Cooney, G.J., et al. (2002). Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *The Journal of biological chemistry* 277, 50230-50236.
- Yu, S., Huang, X., Miao, L., Zhu, J., Yin, Y., Luo, Q., Xu, J., Shen, J., and Liu, J. (2010). A supramolecular bifunctional artificial enzyme with superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities. *Bioorganic chemistry* 38, 159-164.
- Yujiri, T., Sather, S., Fanger, G.R., and Johnson, G.L. (1998). Role of MEKK1 in cell survival and activation of JNK and ERK pathways defined by targeted gene disruption. *Science* 282, 1911-1914.
- Zehorai, E., Yao, Z., Plotnikov, A., and Seger, R. (2010). The subcellular localization of MEK and ERK--a novel nuclear translocation signal (NTS) paves a way to the nucleus. *Molecular and cellular endocrinology* 314, 213-220.
- Zhang, S., Han, J., Sells, M.A., Chernoff, J., Knaus, U.G., Ulevitch, R.J., and Bokoch, G.M. (1995). Rho family GTPases regulate p38 mitogen-activated protein kinase through the downstream mediator Pak1. *The Journal of biological chemistry* 270, 23934-23936.
- Zhang, W., and Liu, H.T. (2002). MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell research* 12, 9-18.
- Zhang, W., Thompson, B.J., Hietakangas, V., and Cohen, S.M. (2011). MAPK/ERK signaling regulates insulin sensitivity to control glucose metabolism in *Drosophila*. *PLoS genetics* 7, e1002429.
- Zhang, Y., Li, F., Liu, S., Wang, H., Mahavadi, S., Murthy, K.S., Khalili, K., and Hu, W. (2012). MEKK1-MKK4-JNK-AP1 pathway negatively regulates Rgs4 expression in colonic smooth muscle cells. *PloS one* 7, e35646.
- Zhou, B.P., Liao, Y., Xia, W., Spohn, B., Lee, M.H., and Hung, M.C. (2001). Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nature cell biology* 3, 245-252.
- Zhou, B.P., Liao, Y., Xia, W., Zou, Y., Spohn, B., and Hung, M.C. (2001). HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nature cell biology* 3, 973-982.