

Die Funktion von Flotillinen bei der Insulin-regulierten Genexpression

The function of flotillins in the expression of insulin-dependent genes

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Wiener, Anam, geb. Akhtar

aus Koblenz

Gießen 2018

Aus Biochemischen Institut,
unter der Leitung von Prof. Dr. Lienhard Schmitz,
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

1. Gutachter: Prof. Dr. Ritva Tikkanen
2. Gutachter: PD Dr. Martin Roderfeld

Tag der Disputation: 02.04.2019

Inhalt

1. Einleitung	1
1.1 Der klassische Insulin-Signaltransduktionsweg	1
1.2 Der alternative Insulin-Signaltransduktionsweg	3
1.3 Der EGF-Signaltransduktionsweg	4
1.4 Die Familie der <i>membrane raft</i> assoziierten Flotillin-Proteine	7
1.4.1 Vorkommen	7
1.4.2 Struktur	8
1.4.3 Funktionen	10
1.4.3.1 Die Rolle der Flotilline im Insulin-Signaltransduktionsweg	12
1.4.3.2 Die Rolle der Flotilline im EGF-Signaltransduktionsweg	12
1.5 Tiermodelle	13
1.6 Ziele der vorliegenden Studie	14
2. Materialien	15
2.1 Geräte und Materialien	15
2.2 Chemikalien und Reagenzien	15
2.3 Puffer und Lösungen	16
2.4 Synthetische DNA-Primer der Referenz- und Zielgene	17
2.5 Versuchstiere	18
2.5.1 Versuchstiere zur Untersuchung des Einflusses von Flotillinen auf die Insulin-regulierte Genexpression	18
2.5.2 Versuchstiere zur Untersuchung des Triglyzeridgehaltes im Blutserum	20
2.6 Software	21
3. Methoden	22
3.1 RNA-Isolierung aus Primärzellen von Mäusen	22
3.2 Konzentrationsbestimmung mittels Spektralphotometrie	23
3.3 Reverse Transkription	23
3.4 Quantitative Real-Time PCR	24
3.5 Agarose-Gelelektrophorese (DNA)	25

3.6	Quantitative Bestimmung von Triglyzeriden im Blutserum der Versuchstiere	26
3.7	Statistische Auswertung.....	26
4.	Ergebnisse	28
4.1	Einfluss von Flotillinen auf die mRNA-Expression von insulinabhängigen Genen in Leberzellen von Mäusen	29
4.2	Einfluss von Flotillinen auf die mRNA-Expression von insulinabhängigen Genen in Skelettmuskelzellen von Mäusen	30
4.2.1	Einfluss von Flotillin 1 und 2 auf Gene des Lipidstoffwechsels	30
4.2.2	Einfluss von Flotillin 1 und 2 auf Gene des Glukosestoffwechsels	34
4.2.3	Einfluss von Flotillin 1 und 2 auf MAP-Kinase-Weg beeinflussende Gene ..	39
4.2.4	Einfluss von Flotillin 1 und 2 auf apoptotische Signalwege	44
4.3	Einfluss von Flotillinen auf den Triglyzeridgehalt im Blutserum	46
4.3.1	Einfluss von Flotillin 1	47
4.3.2	Einfluss von Flotillin 2	48
5.	Diskussion.....	49
5.1	Flotilline und deren Einfluss auf den Insulin-Signaltransduktionsweg	50
5.2	Flotilline und deren Einfluss auf den EGF-Signaltransduktionsweg	51
5.3	Flotilline und deren Einfluss auf den Triglyzeridgehalt im Blutserum	53
5.4	Flotilline und Diabetes.....	54
5.5	Ausblick	54
I	Zusammenfassung.....	56
II	Abstract.....	57
III	Abkürzungsverzeichnis.....	58
IV	Abbildungsverzeichnis	61
V	Tabellenverzeichnis	62
VI	Literaturverzeichnis	63
VII	Eidesstaatliche Erklärung.....	75
VIII	Danksagung.....	76

1. Einleitung

1.1 Der klassische Insulin-Signaltransduktionsweg

Insulin ist ein Peptidhormon, das in den β -Zellen der Langerhans-Inseln im Pankreas synthetisiert wird und zu den wichtigsten Regulatoren des Glukosestoffwechsels zählt. Durch Mobilisierung des Glukosetransporters Typ 4 (Glut 4) sorgt es für eine vermehrte Aufnahme von Glukose in Skelettmuskel- und Fettzellen. Außerdem induziert es die Synthese von Glykogen und hemmt die Glukoneogenese¹.

Bei der Translation entsteht zunächst ein inaktives Präproinsulin, bestehend aus einem Signalpeptid, einer A- und B-Kette und einem C-Peptid. Ersteres sorgt für den Transport des Präproinsulins ins Endoplasmatische Retikulum, wo die Reifung des Peptidhormons erfolgt. Zunächst entsteht hierbei das Proinsulin, indem das Signalpeptid proteolytisch abgespalten wird und drei Disulfidbrücken gebildet werden. Im weiteren Verlauf entsteht das reife Insulin, indem auch das C-Peptid abgespalten wird. Jenes wird als Hexamer, welches durch ein Zinkion stabilisiert wird, in Vesikeln an der Zellmembran der β -Zellen gespeichert. Der wichtigste Stimulus zur Ausschüttung des Insulins ist ein gesteigerter Blutglukosewert (> 4 mmol Glukose/l Blut). Auch ein Konzentrationsanstieg von Fettsäuren und Aminosäuren im Blut sowie Hormone wie Gastrin und Sekretin tragen in geringerem Maße zu einer Insulinausschüttung bei.

Der Antagonist von Insulin ist das Glukagon. Außerdem wirken auch Glukokortikoide und Katecholamine als Antagonisten des Insulins.²

Insulin bindet mit hoher Affinität an den Insulinrezeptor, welcher sich an der Oberfläche von Fett-, Skelettmuskel- und Leberzellen befindet, und löst durch seine Bindung intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden aus.²

Diese führen neben ihrer Regulation des Glukosestoffwechsels durch eine Regulierung von SREBP-Transkriptionsfaktoren auch zur Induktion von Fettsäure- und Cholesterinsynthese. Außerdem nimmt der Insulin-Signaltransduktionsweg auch Einfluss auf das Wachstum und auf mitogene Effekte, welche hauptsächlich durch die Aktivierung der Akt/PKB-Kaskade und des Ras/MAP-Kinase-Weges vermittelt werden.³

Der klassische Insulin-Signaltransduktionsweg geht von der ursprünglichen Annahme aus, dass die Signalkaskade alleine von der Aktivierung der Lipidkinase Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) abhängig sei¹. Demnach führt die Bindung des Insulins an den Insulinrezeptor zu dessen Autophosphorylierung, wodurch er aktiviert wird. Hierzu kommt es, indem sich durch das Aufeinanderbewegen der beiden α -Untereinheiten, um das Insulinmolekül zu umschließen, gleichzeitig auch die β -

Untereinheiten, die beide jeweils eine Tyrosinkinase-Domäne enthalten, im Zellinneren annähern. Diese Annäherung führt dazu, dass die sogenannte Aktivierungsschleife der einen Kinaseuntereinheit in das aktive Zentrum der anderen Kinaseuntereinheit gedrückt wird. Bei der Aktivierungsschleife handelt es sich um eine Struktur, welche die Kinase in einer inaktiven Konformation hält. Im nächsten Schritt katalysieren die Kinase-Domänen die Bindung von Phosphorylgruppen aus ATP an Tyrosinreste, welche sich in den Aktivierungsschleifen befinden. Die Phosphorylierung der Tyrosinreste führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors. An die phosphorylierten Bereiche im Rezeptor binden dann die Insulinrezeptor-Substrate 1, 2 und 4 (IRS-1, -2 und -4). Dies sind homologe Proteine mit einer ähnlichen Struktur, die an ihrem Aminoterminus jeweils eine phosphotyrosinbindende Domäne für die Bindung an den Insulinrezeptor und eine Pleckstrinhomologie-Domäne für die Bindung an Phosphoinositidlipide enthalten. Bei Mäusen gibt es zusätzlich noch das Insulinrezeptor-Substrat 3 (ISR-3), welches beim Menschen bisher noch nicht nachgewiesen werden konnte⁴. Die Bindung der IRS an den aktivierten Insulinrezeptor führt zu deren Tyrosin-Phosphorylierung. Die PI3K kann dann über ihre SH2-Domäne, welche Phosphotyrosinreste erkennt, an die phosphorylierten IRS binden und katalysiert daraufhin durch die Addition einer Phosphorylgruppe an die Position 3 von Inositol die Umwandlung des Phosphatidylinositol(4,5)-bisphosphats (PIP₂) in das Phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphat (PIP₃). Dieses sorgt für die allosterische Aktivierung der PIP₃-abhängigen Proteinkinase (PDK1), welche dann wiederum die Proteinkinase B (Akt/PKB) und die atypische Proteinkinase C (PKC ζ) phosphoryliert. Bei der Akt/PKB handelt es sich um eine Proteinkinase, die kein Bestandteil der Membran ist und sich daher über Diffusion frei in der Zelle bewegen und Signale weiter geben kann, indem sie ihre Ziele phosphoryliert. Zwei wichtige dieser Ziele sind Zellkomponenten, die zum einen die Translokation des Glut 4 aus intrazellulären Vesikeln in die Plasmamembran der Zelle vermitteln und zum anderen Enzyme, welche die Glykogensynthese stimulieren².

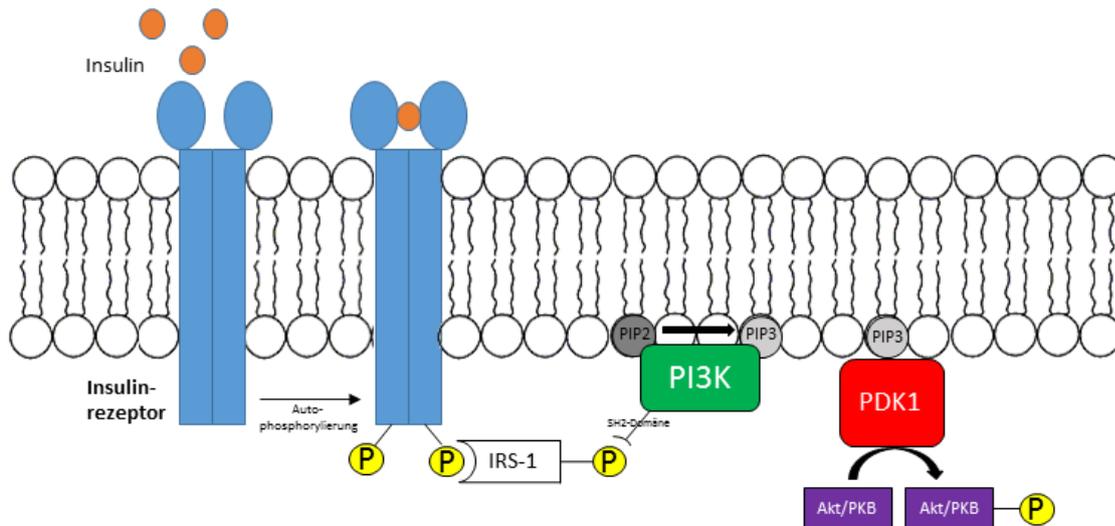


Abbildung 1: Der klassische Insulin-Signaltransduktionsweg (modifiziert nach Berg et al. 2013)². Die Bindung von Insulin an den Insulinrezeptor führt zu dessen Autophosphorylierung, welche die Bindung von Insulinrezeptor-Substraten erlaubt. Die PI3K kann wiederum über ihre SH2-Domäne an die phosphorylierten Reste der IRS binden und dann die Umwandlung von PIP2 zu PIP3 katalysieren. An PIP3 kann die PDK1 binden, welche durch Phosphorylierung verschiedene Kinasen, wie beispielsweise die Akt/PKB, aktiviert.

Zur Beendigung des klassischen Insulin-Signaltransduktionsweges kommen drei wichtige Phosphatasen zum Einsatz: Die Proteintyrosinphosphatase überführt den Insulinrezeptor wieder in einen inaktiven Zustand, indem sie Phosphorylgruppen von Tyrosinresten am Insulinrezeptor und an den IRS-Adapterproteinen entfernt, während Lipidphosphatasen eine Hydrolyse bewirken, die zur Umwandlung von PIP3 zu PIP2 führt. Proteinserinphosphatasen sorgen schließlich für eine Dephosphorylierung aktiver Proteinkinasen wie der Akt/PKB. Außerdem trägt auch die Endozytose des Insulinrezeptors mitsamt des gebundenen Insulins zur Beendigung des klassischen Insulin-Signaltransduktionsweges bei.²

1.2 Der alternative Insulin-Signaltransduktionsweg

Der alternative Insulin-Signaltransduktionsweg beschreibt eine PI3K-unabhängige Signalkaskade in Adipozyten, an welcher Flotillin 1 beteiligt ist und welche über sogenannte *membrane rafts* ausgelöst wird⁵. Er stellt eine Ergänzung zum klassischen Insulin-Signaltransduktionsweg dar und beginnt wie dieser mit der Bindung von Insulin an den Insulinrezeptor, was zu dessen Autophosphorylierung und Aktivierung führt. Nun kommt es jedoch zur Rekrutierung anderer Signalmoleküle: dem CAP (*Cbl-associated protein*) und der E3 Ubiquitin-Protein Ligase Cbl (*c-Cbl*). Das CAP bildet mithilfe einer seiner drei SH3-Domänen einen Komplex mit dem c-Cbl. Außerdem bindet jenes auch an das Adapterprotein APS, welches sich an dem aktivierten Insulinrezeptor befindet, der wiederum das c-Cbl phosphoryliert⁶. Der phosphorylierte CAP/c-Cbl Komplex bindet

dann an die *membrane rafts*. Dieser Schritt setzt die Anwesenheit von Flotillin 1 voraus, da dieses direkt mit dem CAP interagiert⁵. Innerhalb der *membrane rafts* rekrutiert das phosphorylierte c-Cbl das CrkII, welches an den GDP-GTP-Austauschfaktor namens C3G bindet. Dies führt zur Freisetzung des GDP im Austausch von GTP an der GTPase TC10, welche zur Rho-Familie gehört. Die Aktivierung dieser GTPase findet ebenfalls in den *membrane rafts* statt und ist notwendig für die Translokation des Glut 4⁷. Innerhalb dieser Signalkaskade ist das Flotillin 1 jedoch nicht nur verantwortlich für die Interaktion mit dem CAP, welche zu dessen Rekrutierung in die *membrane rafts* führt, sondern auch für die Interaktion mit dem Glut 4. In Adipozyten folgen sie der Translokation des Glut 4 aus den intrazellulären Vesikeln in die Plasmamembran⁸.

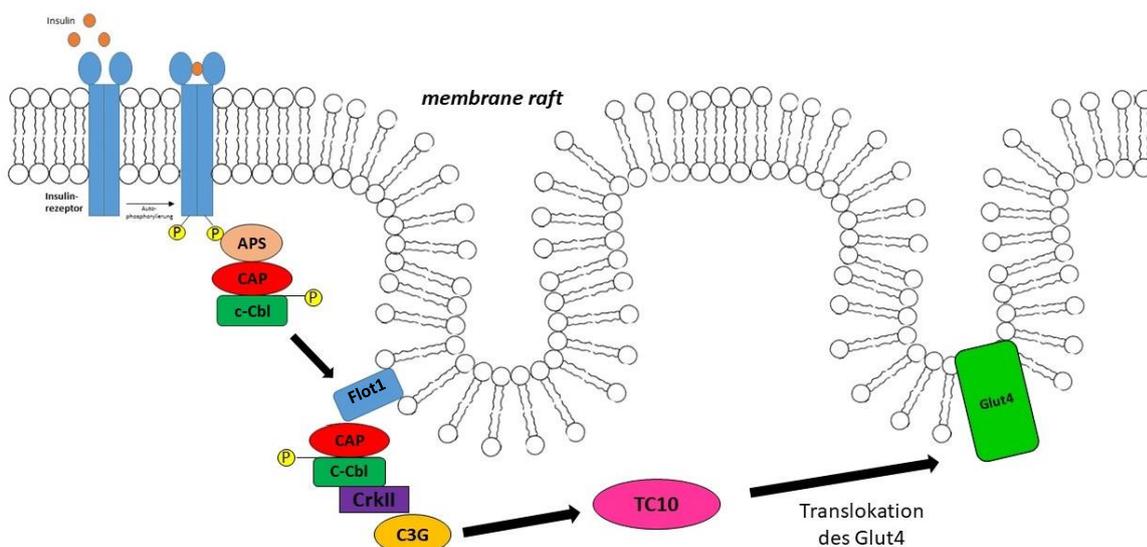


Abbildung 2: Der alternative Insulin-Signaltransduktionsweg (modifiziert nach Baumann et al. 2000)⁵. Auch hier kommt es durch die Bindung von Insulin an den Insulinrezeptor zunächst zu dessen Autophosphorylierung. An das APS, welches sich an dem aktivierten Insulinrezeptor befindet, bindet dann der CAP/c-Cbl Komplex und wird phosphoryliert. Das CAP des phosphorylierten Komplexes interagiert in den *membrane rafts* mit Flotillin 1. Diese Interaktion führt zur Rekrutierung von CrkII, welches an das C3G bindet und in der Aktivierung der GTPase TC10 resultiert. Diese ist mitverantwortlich für die Translokation des Glut 4 aus intrazellulären Vesikeln in die Plasmamembran.

1.3 Der EGF-Signaltransduktionsweg

Der Epidermale Wachstumsfaktor (EGF) ist ein Polypeptid und gehört zur EGF-Familie der Wachstumsfaktoren, welche an der Zellproliferation und an der Zelldifferenzierung beteiligt sind⁹. Er bindet auf der Zelloberfläche mit hoher Affinität an den membranständigen *epidermal growth factor receptor* (EGF-Rezeptor) und stimuliert durch seine Bindung die intrinsische Tyrosinkinase-Aktivität des EGF-Rezeptors. Dadurch werden Signaltransduktionswege in Gang gesetzt, unter denen vor allem der MAP (Mitogen-aktivierte Protein)-Kinase-Weg eine bedeutende Rolle spielt. Die

innerhalb des MAP-Kinase-Weges ausgelösten Signalübertragungen wirken sich positiv auf den Zellstoffwechsel aus, indem sie unter anderem eine gesteigerte Proteinbiosynthese und Glykolyse in der betroffenen Zelle herbeiführen¹⁰. Außerdem induzieren sie die Expression von Genen, die wichtig für die DNA-Synthese und für die Zellproliferation sind¹¹.

Der EGF-Rezeptor gehört ebenfalls zur Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen und besteht wie der Insulinrezeptor auch aus einem Dimer, welches aus zwei identischen Untereinheiten zusammengesetzt ist. Im Gegensatz zum Insulinrezeptor geht der EGF-Rezeptor jedoch eine Bindung mit zwei Ligandenmolekülen ein, da die Untereinheiten, an welchen sich die Protein-Tyrosinkinase-Domänen befinden, im inaktiven Zustand als Monomere vorliegen. Eine Bindung von EGF-Molekülen an den Rezeptor löst über die sogenannten Dimerisierungsarme, indem sie sich von einem Rezeptormolekül zum anderen erstrecken, eine Dimerisierung der zwei Monomere aus. Diese führt ähnlich wie bei dem Insulinrezeptor zu einer Autophosphorylierung des Rezeptors. Allerdings erfolgt die Phosphorylierung nicht in der Aktivierungsschleife, wie bei dem Insulinrezeptor, sondern an mehreren Stellen des C-Terminus der Kinase-Domäne. Die Dimerisierung führt dazu, dass der C-terminale Abschnitt des einen Monomers in das aktive Zentrum des anderen Monomers gelangt. Im nächsten Schritt bindet das Adapterprotein Grb-2, welches eine SH2- und zwei SH3-Domänen besitzt, über seine SH2-Domäne an die Phosphotyrosinreste des aktivierten EGF-Rezeptors. Die zwei SH3-Domänen dienen dem Adapterprotein für die Verbindung mit den polyprolinreichen Polypeptiden des Proteins Sos. Dieses aktiviert dann das Protein Ras, indem es an dieses bindet. Das Protein Ras gehört zur Klasse der kleinen G-Proteine und ist ein wichtiger Bestandteil in vielen Signaltransduktionswegen. Da das Sos dafür sorgt, dass am Ras das gebundene GDP gegen ein GTP ausgetauscht wird, wird es auch als Guaninnukleotidaustauschfaktor (GEF) bezeichnet. Dieser Austausch geht mit einer Konformationsänderung des Ras einher, welche eine Bindung des Ras an die Proteinkinase Raf hervorruft.² Dieses liegt in seiner inaktiven Form gebunden an das Regulatorprotein 14-3-3 im Zytosol vor¹². Die Bindung des Ras an die *Ras binding domain* des Raf führt zu einer Strukturveränderung des Moleküls, sodass es sich vom 14-3-3 löst¹³ und an die Plasmamembran rekrutiert wird¹⁴. Auf diese Weise wird der MAP-Kinase-Weg eingeleitet. Das aktivierte Raf wiederum phosphoryliert MEKs, welche im weiteren Verlauf die ERKs 1 und 2 aktivieren. Diese sind in der Lage, Phosphatgruppen an eine Vielfalt von Substraten, etwa 200 an der Zahl, bei denen es sich u.a. um Transkriptionsfaktoren und weitere Proteinkinasen handelt, anzuhängen und diese somit zu aktivieren.² An der strengen Regulation der Signalweitergabe durch

die ERKs sind verschiedene Rückkopplungsreaktionen und Phosphatasen, wie beispielsweise die DUSPs, welche die ERK 1/2 Aktivität direkt inhibieren, beteiligt. Der Effekt der Signalweitergabe durch die ERKs ist abhängig von dem zu aktivierenden Substrat und dessen Lokalisation und beinhaltet Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Zelladhäsion und Zellwanderung, aber auch das Überleben der Zelle und den Zelltod.¹⁵

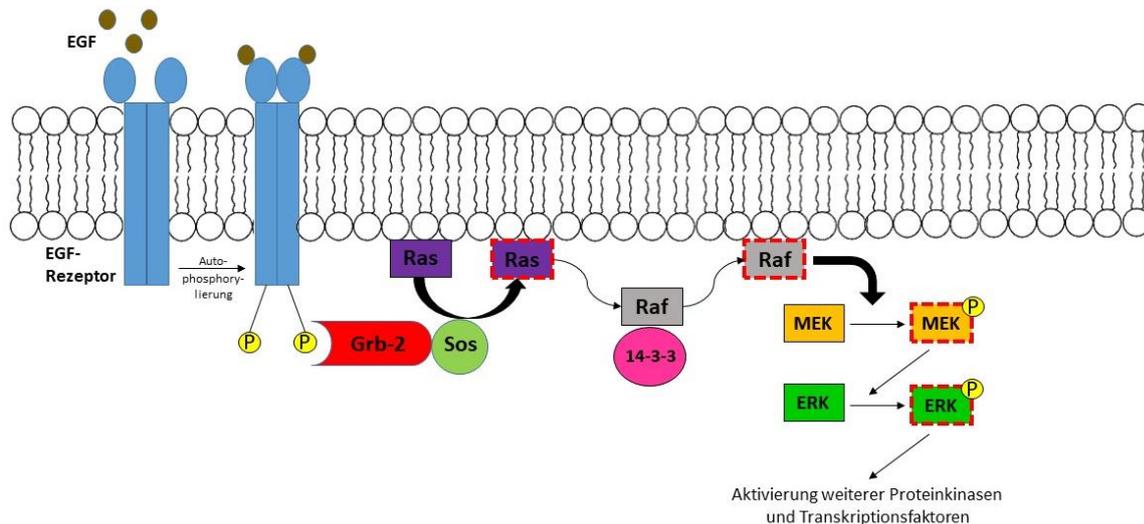


Abbildung 3: Der EGF-Signaltransduktionsweg (modifiziert nach Berg et al. 2013)². Die Bindung von zwei EGF-Molekülen an den EGF-Rezeptor führt zu dessen Autophosphorylierung. An den aktivierten EGF-Rezeptor binden die Proteine Grb-2 und Sos. Letzteres sorgt durch seine Funktion als Guaninnukleotidaustauschfaktor für die Aktivierung des Ras, welches wiederum das Raf aktiviert. Dieses setzt den MAP-Kinase-Weg in Gang, indem es MEKs durch Phosphorylierung aktiviert, welche dann ERKs ebenfalls durch Phosphorylierung aktivieren. Diese sind in der Lage, zahlreiche weitere Proteinkinasen und Transkriptionsfaktoren zu aktivieren und somit verschiedene Prozesse in der Zelle auszulösen.

Die durch EGF ausgelöste Signalkaskade wird zum einen durch Proteinphosphatasen, die im Verlauf der Signalweitergabe aktiviert werden, beendet. Zum anderen übernimmt auch das Ras, welches eine intrinsische GTPase-Aktivität besitzt, die das aktivierte Protein in der GTP-Form wieder in seine inaktive Form mit gebundenem GDP überführt, eine große Rolle bei der Beendigung des EGF-Signaltransduktionsweges. Die Dauer der Ras-Wirkung kann durch akzessorische Proteine in der Zelle, wie zum Beispiel den GTPase-aktivierenden Proteinen (GAPs), die durch ihre Bindung an das aktive Ras die Hydrolyse des GTP begünstigen und somit die Umwandlung des aktiven Ras in das inaktive stark beschleunigen, reguliert werden.²

1.4 Die Familie der *membrane raft* assoziierten Flotillin-Proteine

Die Proteinfamilie der Flotilline umfasst zwei hoch-konservierte Proteine, bei denen es sich um Flotillin 1 und Flotillin 2 handelt. Sie werden aufgrund ihrer 1997 erstmaligen Entdeckung in Goldfischen, in welchen es nach einer Sehnervläsion zu einer Hochregulation der Flotillin-Expression kam und daher eine Beteiligung der Flotilline an der Regeneration von retinalen Ganglienzellen vermutet wurde, auch als Reggie 1 und Reggie 2 bezeichnet.¹⁶ Zu den heutzutage verbreiteten Namen Flotillin 1 und Flotillin 2, bei denen es sich mittlerweile auch um die offiziellen Genbezeichnungen handelt, kommen die Proteine durch eine im gleichen Jahr postulierte Arbeit. In dieser wurden die aus Membranpräparationen von murinem Lungengewebe isolierten Proteine in flotierenden und Detergens-resistenten *membrane rafts* beobachtet, was zu deren Bezeichnung als Flotilline führte.¹⁷ Die oben genannten Entdeckungen der Proteine erfolgten zwar etwa zur gleichen Zeit, allerdings unabhängig. Daher kam es zu einer unterschiedlichen Benennung und gegenläufigen Nummerierung der Proteine, wobei Reggie 1 identisch ist mit Flotillin 2 und Reggie 2 identisch mit Flotillin 1.

Ursprünglich hat man angenommen, dass Flotilline Transmembranproteine seien, welche vor allem in Caveolae zu finden sind, bei welchen es sich um Subtypen von *membrane rafts* handelt^{17,18}. Diese Annahme wurde in weiteren Untersuchungen, welche zu dem Ergebnis führten, dass Flotilline sich in *membrane rafts* außerhalb von Caveolae befinden, widerlegt^{19,20}. Mit diesen *membrane rafts*, auch als Lipid-Mikrodomänen oder *lipid rafts* bezeichnet, sind beide Flotilline an der zytosolischen Seite der Plasmamembran fest verbunden. Bei den *membrane rafts* handelt es sich um kleine (10-20 nm), dynamisch fluktuierende und geordnete Membran-Nanostrukturen, welche aus Glykosphingolipiden, Cholesterol und bestimmten Membranproteinen bestehen.^{21,22} Die *membrane rafts* können durch Protein-Protein-, Protein-Lipid- und Lipid-Lipid-Interaktionen Plattformen bilden, deren Spezifität und Funktion durch die Zusammensetzung der einzelnen Komponenten der Plasmamembran bestimmt wird. An diese Plattformen können verschiedene Moleküle, wie zum Beispiel Adapterproteine, Enzyme, Signalproteine, Rezeptoren und Ionenkanäle binden und dadurch weitere Prozesse wie Signaltransduktionswege, Membrantransporte und virale Infektionen in Gang setzen.²²

1.4.1 Vorkommen

Flotilline werden ubiquitär exprimiert. Sie sind in Säugetieren, aber auch in Bakterien, Pflanzen, Pilzen und Metazoa zu finden. In den Modellorganismen *Saccharomyces*

cerevisae oder *Caenorhabditis elegans* konnten sie bislang noch nicht nachgewiesen werden.^{23,24} Flotilline weisen eine hohe Ähnlichkeit zwischen den Spezies auf, was beispielsweise anhand des Vergleichs der Aminosäuresequenz des Flotillin 1, welche bei Mäusen und Menschen zu 98,1% identisch ist, ersichtlich ist²³. Auch bei Wirbeltieren und wirbellosen Tieren besteht eine Ähnlichkeit von über 60%, was auf die wichtige Rolle der Flotilline innerhalb der Zellphysiologie hindeutet²⁵. Aufgrund ihrer hohen Sequenzhomologie auf mRNA- und Protein-Ebene^{18,26} lassen sie sich in allen bisher untersuchten Zelltypen nachweisen, wobei in Organen wie Gehirn, Lunge, Herz und Plazenta eine hohe Expression und in Organen wie Pankreas und Leber eine eher niedrige Expression von Flotillinen zu finden ist^{20,23}. Innerhalb von Zellen ist die Verteilung von Flotillinen sehr dynamisch. Zwar lassen sie sich unter physiologischen Wachstumsbedingungen bei den meisten Zellen, wie bei CHO-, HepG2- und HeLa-Zellen, an der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran finden²⁷, letztendlich ist ihre Lokalisation jedoch auch abhängig vom Zelltyp und deren Differenzierungsgrad, was am Beispiel von MDCK-Zellen ersichtlich ist, in welchen die Flotilline in intrazellulären Strukturen zu finden sind²⁸. Zudem lässt sich auch eine Anwesenheit von Flotillinen in Zell-Zell-Kontakten^{29,30}, in Endosomen und Lysosomen²⁷, in Exosomen³¹, im Golgi-Apparat³² und im Zusammenhang mit der PTOV-1 Phosphatase im Zellkern nachweisen³³, wobei sich der Nachweis in den letzten drei Zellorganellen auf das Flotillin 1 beschränkt. Zudem hat man herausgefunden, dass die Expression von Flotillinen während der Differenzierung von Osteoklasten³⁴, skelettalen Myoblasten¹⁸ und 3T3 Fibroblasten¹⁷ erhöht ist. Die Lokalisation von Flotillinen kann durch die Stimulierung mit Wachstumsfaktoren verändert werden, indem sie an ihren Tyrosinresten durch Src-Kinasen phosphoryliert und infolgedessen von der Plasmamembran in endosomale Strukturen aufgenommen werden³⁵.

1.4.2 Struktur

Sowohl Flotillin 1 als auch Flotillin 2 haben ein Molekulargewicht von ungefähr 48 kDa und bestehen aus 427 bzw. 428 Aminosäuren, obwohl ihre Expression von zwei verschiedenen Genen ausgeht. Ihre Sequenzen ähneln sich zu 50% auf mRNA- und zu 44% auf Protein-Ebene.³⁶

Flotilline gehören zur Familie der *SPFH domain containing proteins*^{24,37}. Bei der SPFH-Domäne handelt es sich um eine Region, die erstmals im Stomatin entdeckt wurde³⁸ und eine hohe Similarität zur Prohibitin-Familie mitochondrialer Proteine³⁹, zu Flotillinen und zu den bakteriellen Plasmamembran-Proteinen HfIK und HfIC aufweist. Daher ist sie auch nach den Initialen dieser Proteine benannt (Stomatin/Prohibitin/Flotillin/HfIK/C). Die

hoch konservierte und N-terminal lokalisierte SPFH-Domäne, auch als Prohibitin Homologie Domäne (PHB) bezeichnet, lässt sich in diversen pro- und eukaryotischen Membranproteinen finden, wobei ihre Funktion bislang noch unbekannt ist.³⁸ Die meisten Proteine mit SPFH-Domänen haben eine Assoziation mit *membrane rafts*³⁷ und neigen dazu Oligomere zu bilden, was anhand des Stomatins^{40,41}, des Prohibitins⁴² und der Flotilline gezeigt wurde, wobei bei den Flotillinen die SPFH-Domäne nicht der Auslöser deren Oligomerisation ist. Diese erfolgt bei den Flotillinen durch den Tyrosin-Rest 163 von Flotillin 2 und die C-terminal lokalisierte Flotillin-Domäne, welche aus einer charakteristischen Wiederholung eines kurzen Alanin- und Glutamat-Sequenzmotivs besteht und in der Lage ist α -Helices in einer coiled-coil-Struktur auszubilden und so Homo- und Heterooligomerisation zu vermitteln.^{43,44} Die Oligomerisation ist wichtig für viele zelluläre Prozesse, zu denen u.a. endozytotische Prozesse, Zellteilung, EGF-vermittelte Signalwege und die Assoziation mit *membrane rafts* zählen^{35,43,45}. Weiterhin besitzen Flotilline einige putative Phosphorylierungsstellen^{23,24}, welchen eine funktionelle Rolle zugeschrieben werden konnte. Hierzu zählen beispielsweise der Tyrosin-Rest 160 von Flotillin 1 und der Tyrosin-Rest 163 von Flotillin 2, welcher an der Oligomerisierung teilnimmt.^{35,45}

Die Assoziation der Flotilline mit der Plasmamembran erfolgt über Acylierungen, welche in der SPFH-Domäne der Proteine enthalten sind^{28,29}. Der Membranassoziation des Flotillin 1 dienen eine Palmytylierung am Cystein-Rest 34 sowie die beiden hydrophoben Regionen⁴⁶. Beim Flotillin 2 erfolgt die Membranassoziation hingegen über die in den hydrophoben Abschnitten der SPFH-Domäne befindlichen palmytylierten Cystein-Reste 19 und 20, welche durch multiple Lipidmodifikationen, einschließlich einer Myristylierung und mehreren Palmytylierungen, den Verbund zur Plasmamembran vermitteln²⁹.

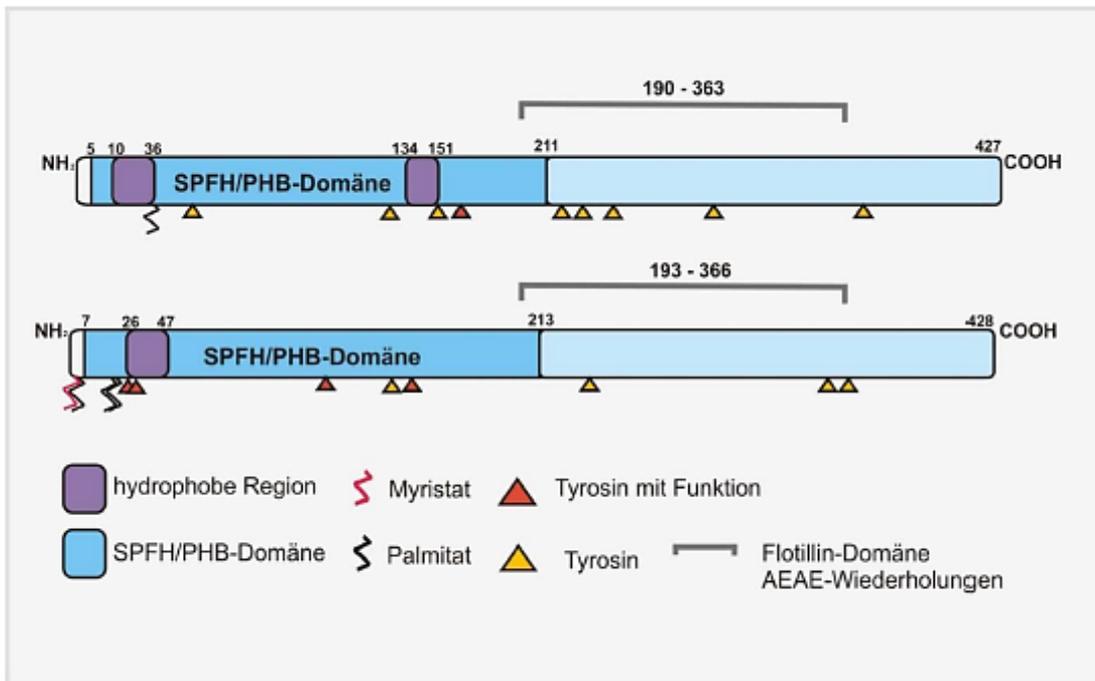


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Flotillinen (modifiziert nach Kurrle et al. 2012)⁴⁷. Flotillin 1 (oben) und Flotillin 2 (unten) besitzen eine N-terminal lokalisierte SPFH-Domäne, welche hydrophobe Regionen enthält, und eine C-terminal lokalisierte Flotillin-Domäne, welche aus einer charakteristischen Wiederholung eines kurzen Alanin (A)- und Glutamat (E)-Sequenzmotivs besteht. Die Membranassoziation der Flotilline erfolgt über posttranslationale Lipidmodifikationen. Während Flotillin 1 am Cystein-Rest 34 palmitoyliert ist, ist Flotillin 2 am Glycin-Rest 2 myristyliert und an den Cystein-Resten 4, 19 und 20 palmitoyliert. Einige Tyrosin-Reste (rote Dreiecke) haben eine funktionelle Bedeutung.

Flotilline sind in der Lage, sich gegenseitig zu stabilisieren, was in Untersuchungen mit siRNA-vermittelter Depletion von Flotillin 1 bzw. 2, welche mit einer Verminderung der Expression des jeweilig anderen Flotillins einherging, entdeckt wurde. Auffälligerweise scheint die Abhängigkeit von Flotillin 1 zu Flotillin 2 größer zu sein, da eine Depletion von Flotillin 1 zu einer geringen bis hin zu keiner verminderten Expression von Flotillin 2 führt, eine Depletion von Flotillin 2 hingegen mit einer stark verminderten Expression von Flotillin 1 einhergeht.^{44,48,49}

Aufgrund der Assoziation von Flotillinen mit *membrane rafts*, welche durch Homo- und Heterooligomerisationen, N-terminale hydrophobe Bereiche und Acylierungen vermittelt wird, werden Flotilline auch als *membrane raft*-Markerproteine betitelt.

1.4.3 Funktionen

Flotilline sind abhängig von ihrer Expression und Lokalisation an vielen Prozessen in der Zelle beteiligt. Dass sie an ihren Tyrosinresten durch Kinasen der Src-Familie phosphoryliert werden können, impliziert ihre Teilnahme an diversen Signaltransduktionswegen³⁵. Außerdem spielen sie durch die Beteiligung an Zell-Zell-

und Zell-Matrix-Kontakten auch eine Rolle bei der Zelladhäsion¹. Die Beteiligung von Flotillinen an der Cadherin-vermittelten Zelladhäsion^{50,51} ließ sich bei der Untersuchung von menschlichen Keratinocyten mit depletierten Flotillinen, welche eine verringerte Expression von Desmoglein-3 und somit eine verminderte desmosomale Zelladhäsion aufwiesen, nachweisen^{29,52}. Zudem sind sie an Membrantransportprozessen, zu welchen die Exo-, Endo- und Phagozytose zählen, und an axonalem Wachstum beteiligt^{29,35,48,53-56}. Dabei scheinen die Flotillin-Mikrodomänen vor allem mit den zytoskelettalen Proteinen Myosin IIa und α - und β -Spektrin assoziiert zu sein, was auf die Beteiligung jener an dem kortikalen Zytoskelett hindeutet.⁵⁷ Flotilline spielen hierbei besonders eine Rolle bei der Regulation der Myosin II-Aktivität. Die Lokalisation von Flotillinen in ihren eigenen Lipid-Mikrodomänen und ihre Fähigkeit Oligomere zu bilden impliziert weiterhin eine Teilnahme jener an der Lipid-Organisation der Plasmamembran⁵⁸. Ein Hinweis dafür ist beispielsweise die Rekrutierung von Cholesterin an die Plasmamembran, an welcher Flotilline aufgrund ihres Besitzes einer *cholesterol recognition interaction amino acid consensus* (CRAC)-Sequenz und der Fähigkeit von Flotillin 2 Cholesterin zu binden, beteiligt zu sein scheinen⁵⁹. Zudem werden Flotilline mit der Clathrin- und Caveolin-unabhängigen Internalisierung von verschiedenen Proteinen, wie zum Beispiel dem Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerten Protein CD59, in Zusammenhang gebracht²⁰.

Des Weiteren besteht ein Zusammenhang von Flotillinen mit diversen pathologischen Prozessen. Aufgrund ihrer Teilnahme an der Zellproliferation^{33,60,61} und an der Formation von Filopodien^{29,62} spielen sie eine große Rolle in der Kanzerogenese. Demnach können in verschiedenen Arten von humanen Krebszellen Veränderungen bei der Expression von Flotillinen verzeichnet werden. So ist die Expression von Flotillin 1 vor allem bei Plattenepithelkarzinomen des Oesophagus⁶³, bei Brustkrebs⁶¹, bei Adenokarzinomen der Lunge und beim Hepatozellulären Karzinom⁶⁴ hochreguliert, während in Krebszellen ebenfalls bei Brustkrebs⁶⁵⁻⁶⁷, Magenkarzinomen⁶⁸ und Melanomen^{60,69} eine vermehrte Expression von Flotillin 2 ersichtlich ist. Da auch in Metastasen von Melanomen eine Überexpression von Flotillinen beschrieben wird, scheinen diese zudem auch bei der Metastasierung von Krebszellen beteiligt zu sein⁶⁰. Dies führt zu der Überlegung, Flotilline zum Angriffspunkt der Therapie von Krebszellen zu machen, was anhand der reduzierten Zellproliferation bei Prostatakarzinomzellen nach einer Depletion von Flotillin 1³³ und einer Reduktion der Lungenkrebsmetastasierung bei einer Flotillin 2 Depletion in Zellkulturen⁶⁵ schon Erfolge gezeigt hat. Allerdings muss dieser Ansatz mit großer Vorsicht verfolgt werden, da eine Depletion von Flotillinen zwar scheinbar zu einer Verminderung der Zellproliferation führt, jedoch als Kompensationsmechanismus auch

zu einer Hyperaktivität von anderen Signaltransduktionswegen führen könnte, die das Gegenteil des gewünschten Effekts hervorrufen könnten¹.

Auch bei neurodegenerativen Erkrankungen ist eine veränderte Expression von Flotillinen zu finden. Beim Morbus Alzheimer wird ein Zusammenhang zwischen Flotillinen und der Progression der Krankheit vermutet⁷⁰. Dies konnte bei Untersuchungen, welche ergaben, dass Flotilline mit der β -Sekretase BACE1, die an der Entstehung von Alzheimer beteiligt ist, direkt interagieren, bestätigt werden⁷¹. In Zellen der Substantia nigra von Patienten mit Morbus Parkinson ließ sich hingegen vermehrt Flotillin 1 finden, was auf die Rolle des Flotillins in der axonalen Regeneration der verbliebenen Zellen der Substantia nigra hindeuten könnte⁷². Eine erhöhte Expression von Flotillinen ist außerdem auch bei Patienten, die an dem schweren akuten respiratorischen Syndrom erkrankt sind, zu finden⁷³. Des Weiteren weisen auch Skelettmuskelzellen bei Typ 2 Diabetes eine erhöhte Expression von Flotillinen auf, was auf eine Beteiligung der Flotilline am Insulin-Signaltransduktionsweg hindeutet⁷⁴.

1.4.3.1 Die Rolle der Flotilline im Insulin-Signaltransduktionsweg

Es ist bekannt, dass Flotilline an Signaltransduktionswegen teilnehmen, was nicht zuletzt an ihrer Assoziation mit *membrane rafts* liegt, welche aufgrund ihrer Beherbergung von Rezeptoren oft den Ausgangspunkt von Signaltransduktionswegen darstellen. Neben dem klassischen Insulin-Signaltransduktionsweg haben Baumann et al. im Jahr 2000 erstmals einen in Adipozyten ablaufenden alternativen Insulin-Signaltransduktionsweg beschrieben. In dem unter Kapitel 1.2 beschriebenen Ablauf dieses Weges wird Flotillin 1 für die Interaktion mit dem CAP vorausgesetzt, damit es im weiteren Verlauf innerhalb der *membrane rafts* zur Rekrutierung des CrkII kommen kann⁵. Außerdem spielen Flotilline eine Rolle bei der Translokation des Glut 4 aus intrazellulären Vesikeln in die Plasmamembran, in dem sie diesem bei seiner Translokation folgen⁸.

1.4.3.2 Die Rolle der Flotilline im EGF-Signaltransduktionsweg

Zu den Signaltransduktionswegen, von denen bekannt ist, dass Flotilline in ihnen eine Rolle spielen, gehört neben dem Insulin- auch der EGF-Signaltransduktionsweg. Neben der Assoziation von Flotillinen mit *membrane rafts* liefert der Zusammenhang von Flotillinen mit Kinasen der Src-Familie²⁷, von denen jene unter der Behandlung mit Wachstumsfaktoren an ihren Tyrosinresten auch phosphoryliert werden können³⁵, einen weiteren Hinweis auf die Beteiligung von Flotillinen an Signaltransduktionswegen. Somit gehört der EGF-Signaltransduktionsweg zu einem der vielen Signalwege, in denen

Flotilline eine Rolle spielen. Während Flotillin 1 einen positiven Einfluss auf den EGF-Signaltransduktionsweg zu haben scheint⁴⁹, scheint Flotillin 2 diesen eher negativ zu beeinflussen⁷⁵.

1.5 Tiermodelle

Um die Bedeutung eines bestimmten Genproduktes im lebenden Organismus untersuchen zu können, kann das betroffene Gen in sogenannten Knock-Out (KO)-Tieren inaktiviert werden. Ist das Tier nach der Inaktivierung des jeweiligen Gens überlebensfähig und weist einen normalen Phänotyp auf, kann man es für weitere Untersuchungen einsetzen. Hierbei erfolgt dann meistens der Vergleich des KO-Tieres mit dem Wildtyp (WT)-Tier, um mögliche Veränderungen in den physiologischen Abläufen im Tier, welche durch die Deletion des jeweiligen Genes hervorgerufen werden, detektieren und vergleichen zu können.

Flot1-KO-Mäuse sind sowohl lebensfähig als auch fruchtbar und weisen einen unauffälligen Phänotyp auf⁵⁷. Jedoch ist auch die Expression von Flotillin 2 in diesen Mäusen reduziert. Die geringe Menge an übrigem Flotillin 2 ist nicht mehr in den *membrane rafts* lokalisiert, sondern gleichmäßig innerhalb der Plasmamembran verteilt. Auch lassen sich in den Flot1-KO-Mäusen keine Flotillin-Mikrodomänen mehr finden¹.

Flot2-KO-Mäuse weisen ebenfalls einen unauffälligen Phänotyp ohne sichtbare Entwicklungsstörungen auf. Die Entfernung des Flotillin 2 Gens führt außerdem zu einer erheblichen Reduktion der Expression von Flotillin 1 in diesen Mäusen. Auch hier ist das noch vorhandene Flotillin 1 nicht mehr in den *membrane rafts* lokalisiert. Vielmehr ist es isoliert in sogenannten *high density membrane fractions* zu finden, während das Caveolin 1 eine normale Verteilung aufweist. Dies führt zu der Annahme, dass die Abwesenheit von Flotillin 2 zwar zum Abbau von Flotillin-Mikrodomänen, jedoch nicht zum Abbau der Caveolae-Mikrodomänen führt⁶⁵. Daraus kann man schließen, dass sowohl Flotillin 1 als auch Flotillin 2 in der Zelle vorhanden sein muss, damit es zur Bildung der Flotillin-Mikrodomänen innerhalb der Plasmamembran kommt¹.

Zudem lässt sich in Flot2-KO-Mäusen eine signifikante Hochregulierung der Expression von Effektoren wie dem EGR1 finden, die dem ERK1/2 nachgeschaltet sind, was auf eine erhöhte Aktivität des MAP-Kinase-Weges in den Flot2-KO-Mäusen hindeutet. Andererseits weisen Flot2-KO-Mäuse eine höhere Expression von DUSP1 und DUSP5 auf, bei welchen es sich um MAPK-Phosphatasen handelt, die eine negativ regulierende Wirkung auf den MAP-Kinase-Weg haben. Dies scheint eine Kompensation des Organismus für die erhöhte ERK1/2 Aktivität zu sein⁴⁹.

1.6 Ziele der vorliegenden Studie

Die Beteiligung von Flotillinen sowohl im EGF- als auch im Insulin-Signaltransduktionsweg ist beschrieben. Welchen Effekt sie jedoch genau auf die Expression insulinabhängiger Genen haben, ist noch ungeklärt.

Innerhalb der folgenden Arbeit wurde untersucht, inwieweit ein Fehlen von Flotillin 1 bzw. Flotillin 2 sich auf die Expression verschiedener insulinabhängiger Gene auswirkt. Hierzu wurde RNA aus Leber- und Skelettmuskelzellen von Flotillin 1- und 2-KO-Mäusen und WT-Mäusen isoliert, in cDNA umgeschrieben und qRT-PCR durchgeführt, um die Expressionsmenge der einzelnen insulinabhängigen Gene zwischen WT- und Flotillin 1- bzw. 2-KO-Mäusen vergleichen zu können. Dabei kam RNA aus unbehandelten, mit Insulin behandelten und mit EGF behandelten Zellen zum Einsatz, sodass nicht nur der Einfluss von Flotillinen auf den Insulin-, sondern auch auf den EGF-Signaltransduktionsweg untersucht werden konnte.

Des Weiteren sollte die Frage geklärt werden, ob das Fehlen von Flotillin 1 bzw. 2 einen Einfluss auf den Triglyzeridgehalt im Blutserum der Tiere hat. Zur quantitativen Bestimmung des Triglyzeridgehaltes diente die Triglyzerid-Methode.

2. Materialien

2.1 Geräte und Materialien

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Geräte und Materialien sind mit den dazugehörigen Herstellern und deren Firmensitz in Tabelle 1 aufgeführt. Gebrauchsmaterialien wie u.a. Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen wurden von BD Bioscience (Heidelberg, DE), Greiner Bio-One (Frickenhausen, DE), Sarstedt (Nürnbrecht, DE) und TPP (Trasadingen, CH) bezogen.

Tabelle 1: Geräte und Materialien

Gerät- bzw. Materialbezeichnung	Hersteller
Canon Power Shot A470	Canon, Tokio (JPN)
Heiz-Thermomixer HTMR 131	HLC, Bovenden (DE)
MonoBloc Chemikalienwaage	Mettler-Toledo GmbH, Giessen (DE)
TECAN infinite M200	TECAN, Crailsheim (DE)
Ultraviolett-Flächenstrahler Nu-72 ML	Konrad Benda Laborgeräte, Wiesloch (DE)
Gelelektrophorese:	
Spannungsquelle (Electrophoresis Power Supply, EPS 301)	Amersham Bioscience, Freiburg (DE)
Agarose-Gelelektrophorese-Kammer	neoLab, Heidelberg (DE)
Polymerase-Kettenreaktion:	
TPersonal Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen (DE)
BioRad CFX Connect™ Real-Time System	BioRad Laboratories GmbH, München (DE)
Zentrifugen:	
Biofuge Pico	Heraeus, Hanau (DE)
Mikro 22 R	Hettich, Kirchlengern (DE)
Tischzentrifuge	Labnet, Langenfeld (DE)
Universal 32 R	Hettich, Kirchlengern (DE)

2.2 Chemikalien und Reagenzien

Die Chemikalien und Reagenzien, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, sind mit ihren jeweiligen Herstellernamen und deren Niederlassungsorten in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
Agarose NEEO ultra-Qualität	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (DE)
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (DE)
BSA (Bovine Serum Albumine)	GE Healthcare, München (DE)
Chloroform	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (DE)
DEPC	AppliChem, Darmstadt (DE)
DNase I	NEB, Frankfurt (DE)
DNase I Reaction Buffer (10x)	NEB, Frankfurt (DE)
DRAMA (DNA-Größenmarker)	Ralf Füllkrug, Gießen (DE)
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (DE)
Ethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (DE)
Ethidiumbromid	AppliChem, Darmstadt (DE)
iTaq™ Universal SYBR Green Supermix	BioRad Laboratories GmbH, München (DE)
M-MuLV Reverse Transcriptase	NEB, Frankfurt (DE)
M-MuLV Reverse Transcriptase Buffer (10x)	NEB, Frankfurt (DE)
Natriumacetat	AppliChem, Darmstadt (DE)
Oligo-Primer (d'T)	NEB, Frankfurt (DE)
Isopropanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (DE)
Random Hexamer-Oligonukleotide (d'NTP)	NEB, Frankfurt (DE)
RNase Inhibitor	NEB, Frankfurt (DE)
Trifast	PEQLAB GmbH, Erlangen (DE)
Tris	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (DE)

2.3 Puffer und Lösungen

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen sind mit Angabe ihrer Zusammensetzung in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (PBS)	20 mM NaH ₂ PO ₄ (pH 7,4) 150 mM NaCl

Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer	40 mM Tris (pH 8,0) 1 mM EDTA
-------------------------------	----------------------------------

2.4 Synthetische DNA-Primer der Referenz- und Zielgene

Die für die qRT-PCR verwendeten DNA-Primer wurden von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, DE) erworben und von Dr. Antje Banning mit PerlPrimer so konstruiert, dass mindestens ein Primer auf einer Exon/ Exon-Grenze in der cDNA liegt und somit keine genomische DNA erkennt. Die DNA-Primer sind mit den jeweiligen Sequenzen und Schmelztemperaturen in Tabelle 4 aufgeführt. In der Tabelle sind die Genbezeichnungen klein geschrieben, da es sich bei den DNA-Primern um Primer für Gene der Maus (*mus*) handelt und diese offiziell klein geschrieben werden. Im Folgenden werden die Genbezeichnungen jedoch in Großbuchstaben geschrieben, da es sich bei den Veröffentlichungen zu den einzelnen Genen größtenteils um Untersuchungen an humanen Zellen (*homo*) handelt. Die Genprodukte, d.h. die Proteine, erkennt man daran, dass nur der Anfangsbuchstabe großgeschrieben ist.

Tabelle 4: DNA-Primer. DNA-Primer-Sequenzen sind auf das jeweilige Gen abgestimmt. Bei den aufgeführten Genen handelt es sich um die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Referenz- und Zielgene, die mit ihren *forward* und *reverse* Sequenzen sowie mit ihren Schmelztemperaturen aufgelistet sind.

Gen	Primer forward	Primer reverse	T [°C]
acca	CTCACCCAACCCAGAAAGGCCA	ACCTGGCTCTGCCAACTACCAC	68,5
b2m	CCTGGCTCACACTGAATTCACC	ATGTCTCGATCCCAGTAGACGG	66,3
dusp1	ACATCAGCTCCTGGTTCAACGA	TGATACTCCGCCTCTGCTTCAC	67,6
egr1	GAGCGAACAACCCTATGAGCAC	TCGTTTGGCTGGGATAACTCGT	66,9
flot1 (Exon 8-9)	CAAGGCACAGAGGGACTATGAG	TCCTCGATCTGCTGCTTCGT	64,9
flot2 (RT)	AACATCAAGACAGCTGAGGCCC	CGATGAGCTCCTTGTCGGTG	68,3
glut4	CCCGAAAGAGTCTAAAGCGCCT	GGAGCTGGAGCAAGGACATTGG	68,4
hk2	GGCGAGAGGAGTTTGACCTGGA	TCCAGTGCCAACAATGAGGCCA	70,8
insr	TCTGAGAAAGAGGCAGCCGGA	CGGCACGTACACAGAAGATGGA	69,3
pfkm	ATGCCGCTGTTTCGCTCTACC	GCCAGCCTCCTCAATCTGACCT	68,6
pfkl	AAGGGTCAGGTGCAAGAAGTGG	CAGGGCGTGGATGTTGTAGGTG	68,5
pparg	AAGGCGAGGGCGATCTTGACAG	GCCACCTCTTGCTCTGCTCCT	70,0
puma	ACCAGCCCAGCAGCACTTAGAG	TTCTTGTCTCCGCCGCTCGT	68,2
rpl13a	GTTCCGGCTGAAGCCTACCAG	TTCCGTAACCTCAAGATCTGCT	63,8
srebp1c	AGAGCTTCCGGCCTGCTATGA	AGCTGTAGTGCCTCCTTTGCC	66,7

ywhaz	GACCAGTCACAGCAAGCATACC	GCAATGGCTTCATCGAAAGCTG	65,8
-------	------------------------	------------------------	------

2.5 Versuchstiere

Die für die vorliegende Arbeit zum Einsatz gekommenen Versuchstiere sind unter der JLU internen Nummer 475_M bei den Tierschutzbeauftragten der Universität zwecks Tötung von Wirbeltieren zu wissenschaftlichen Zwecken gemäß §4 Abs. 3 TierSchG eingetragen.

2.5.1 Versuchstiere zur Untersuchung des Einflusses von Flotillinen auf die Insulin-regulierte Genexpression

Die RNA für die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit wurde aus Skelettmuskel- und Leber-Primärzellen von Mäusen isoliert. Hierbei handelt es sich sowohl um WT-Mäuse, die Flotillin 1 und Flotillin 2 enthalten, als auch um KO-Mäuse, bei denen das Gen, welches für Flotillin 1 bzw. Flotillin 2 kodiert, inaktiviert wurde.

Die eingesetzten Mäuse für die Untersuchung des Einflusses von Flotillin 1 sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Flotillin 1 Versuchstiere. Die RNA für die weiterführenden Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit wurde aus folgenden Mäusen isoliert, welche mit ihrer Nummer, ihrem Geschlecht, Genotyp und Alter aufgeführt sind.

Nummer	Geschlecht	Genotyp	Alter (Tage)
1	weiblich	Flot1 WT	207
2	weiblich	Flot1 WT	207
3	weiblich	Flot1 WT	208
4	männlich	Flot1 WT	208
5	männlich	Flot1 WT	150
20	weiblich	Flot1 KO	237
21	weiblich	Flot1 KO	237
23	weiblich	Flot1 KO	303
24	männlich	Flot1 KO	214
25	weiblich	Flot1 KO	221
28	weiblich	Flot1 KO	98
29	weiblich	Flot1 KO	97
32	männlich	Flot1 KO	187
39	weiblich	Flot1 KO	141

40	weiblich	Flot1 KO	141
43	männlich	Flot1 KO	142
44	männlich	Flot1 KO	142
750	weiblich	Flot1 WT	129
751	weiblich	Flot1 WT	129
752	weiblich	Flot1 WT	128
753	männlich	Flot1 WT	128
770	weiblich	Flot1 WT	118

Die Auflistung der eingesetzten Mäuse für die Untersuchung des Einflusses von Flotillin 2 auf die mRNA-Expression insulinabhängiger Gene erfolgt in Tabelle 6.

Tabelle 6: Flotillin 2 Versuchstiere. Die RNA für die weiterführenden Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit wurde aus folgenden Mäusen isoliert, welche mit ihrer Nummer, ihrem Geschlecht, Genotyp und Alter aufgeführt sind.

Nummer	Geschlecht	Genotyp	Alter (Tage)
252	Männlich	Flot2 KO	252
271	Männlich	Flot2 KO	210
272	Männlich	Flot2 KO	212
277	Männlich	Fot2 WT	221
284	männlich	Flot2 WT	198
285	männlich	Flot2 KO	198
286	männlich	Flot2 KO	198
318	männlich	Flot2 WT	141
319	männlich	Flot2 WT	143
322	männlich	Flot2 WT	144
323	männlich	Flot2 WT	144
324	männlich	Flot2 WT	148
325	männlich	Flot2 WT	148
329	männlich	Flot2 KO	136
331	männlich	Flot2 WT	128
335	weiblich	Flot2 KO	120
336	männlich	Flot2 KO	119
337	männlich	Flot2 KO	119
341	weiblich	Flot2 WT	117
342	weiblich	Flot2 WT	117

349	männlich	Flot2 WT	116
350	männlich	Flot2 WT	116
354	weiblich	Flot2 KO	80

2.5.2 Versuchstiere zur Untersuchung des Triglyzeridgehaltes im Blutserum

Für die Untersuchung des Triglyzeridgehaltes wurde das Blutserum der Mäuse verwendet, die in Tabelle 7 aufgelistet sind.

Tabelle 7: Flotillin 1 und Flotillin 2 Versuchstiere. Das Blutserum, welches für die Bestimmung des Triglyzeridgehaltes in der vorliegenden Arbeit verwendet wird, stammt aus folgenden Mäusen, welche mit ihrer Nummer, ihrem Geschlecht, Genotyp und Alter aufgeführt sind.

Nummer	Geschlecht	Genotyp	Alter (Tage)
1	weiblich	Flot1 WT	201
2	männlich	Flot1 WT	201
3	weiblich	Flot1 WT	201
4	weiblich	Flot1 WT	201
5	männlich	Flot1 WT	308
23	weiblich	Flot1 KO	297
25	weiblich	Flot1 KO	215
32	männlich	Flot1 KO	180
39	weiblich	Flot1 KO	135
40	weiblich	Flot1 KO	135
43	männlich	Flot1 KO	135
44	männlich	Flot1 KO	148
58	männlich	Flot2 WT	322
63	männlich	Flot2 WT	359
94	weiblich	Flot2 WT	231
96	männlich	Flot2 WT	299
101	weiblich	Flot2 KO	231
107	weiblich	Flot2 WT	231
115	weiblich	Flot2 WT	231
116	weiblich	Flot2 KO	231
121	weiblich	Flot2 WT	231
122	weiblich	Flot2 WT	231
132	männlich	Flot2 KO	210

141	männlich	Flot2 WT	222
160	weiblich	Flot2 KO	231
163	männlich	Flot2 WT	196
164	männlich	Flot2 WT	1196
166	weiblich	Flot2 KO	231
190	weiblich	Flot2 KO	231

2.6 Software

Bei der für die statistische Auswertung verwendeten Software handelt es sich um das Programm GraphPad Prism 5 der Firma GraphPad Software, Inc mit Hauptsitz in San Diego, CA (USA).

3. Methoden

3.1 RNA-Isolierung aus Primärzellen von Mäusen

Die RNA-Isolierung aus Zellen ermöglicht eine Analyse der momentanen Zelltätigkeit zu einem bestimmten Zeitpunkt, da nur die Gene, die auch aktuell in der Zelle transkribiert werden, im Moment der Isolierung als RNA vorliegen.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die RNA-Isolierung aus Mäusezellen. Die Isolierung und Kultivierung der Leber-Primärzellen wurde nach Guguen-Guillouzo⁷⁶ und die der Skelettmuskel-Satellitenzellen nach Danoviz und Yablonka-Reuveni⁷⁷ durchgeführt. Bei den Mäusen handelte es sich um Wildtyp- und Knockout-Mäuse. Bei beiden Gruppen fand eine Vorbehandlung der Primärzellen statt: Von den drei Proben, bei welchen es sich jeweils um eine 6 cm Petrischale mit Zellen handelte, blieb eine unstimuliert, während die zweite für ca. 5 Stunden mit Insulin (100 nM) und die dritte mit EGF (10 ng/ml) stimuliert wurde.

Die RNA-Isolierung erfolgte nach der peqGOLD TriFastTMFL-Methode (peqlab, VWR International GmbH, Erlangen, DE). Zunächst wurden die Proben mit PBS gewaschen. Unter dem Abzug erfolgte dann die Zugabe von 800 µl Trifast pro Probe, um eine Lyse der Zellen zu erzielen. Die Proben wurden 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend konnten die Proben bei -80 °C für bis zu 4 Wochen eingefroren werden oder die RNA-Isolierung direkt fortgeführt werden. Bei dem nächsten Schritt wurde den Proben in einem Reagiergefäß jeweils 160 µl Chloroform hinzugefügt, dieses 15 Sekunden geschüttelt und dann 3 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dann folgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 12000 g und 4 °C. Die obere, RNA-enhaltende wässrige Phase wurde in ein neues Reagiergefäß überführt. In dieses wurden 400 µl Isopropanol hinzugefügt. Das Reagiergefäß wurde geschwenkt und bei Raumtemperatur für 10 Minuten stehen gelassen. Danach erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 12000 g und 4 °C. Der Überstand wurde verworfen. Anschließend fand eine Zugabe von 800 µl Ethanol (75%) in das Reagiergefäß statt, welches gevortext und anschließend für 5 Minuten bei 7500 g und 4 °C zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde wieder verworfen. Nach einer Wiederholung dieses Waschschrattes sollte sich im Reagiergefäß am Boden ein Pellet gebildet haben, welches 15-20 Minuten kopfüber luftgetrocknet wurde. Abschließend wurde das Pellet in 50 µl DEPC-H₂O gelöst. Falls sich die RNA nicht löst, kann eine Inkubation für 10 Minuten bei 55-60°C durchgeführt werden.

Um einer Kontamination der RNA mit genomischer DNA vorzubeugen, wurde im Anschluss an die RNA-Isolierung ein DNA-Verdau durchgeführt. Zur DNA-Eliminierung wurden 50 µl RNA, 0,5 µl DNase I (1 U) sowie 10 µl vom dazugehörigen DNase I Reaction Buffer (10x) und 39,5 µl DEPC-H₂O hinzugefügt. Es folgte eine Inkubation für 10 Minuten bei 37 °C. Nach der Zugabe von 2,5 µl EDTA (0,2 M, pH 8) und der Hitzeinaktivierung der DNase durch Erhitzung der Probe für 10 Minuten auf 75 °C war der DNA-Verdau beendet.

3.2 Konzentrationsbestimmung mittels Spektralphotometrie

Bei der spektralphotometrischen Konzentrationsbestimmung erfolgt die Messung der optischen Dichte der jeweiligen Probe bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ (OD_{260}), dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren (RNA, DNA) und bei $\lambda = 280 \text{ nm}$ (OD_{280}), dem Absorptionsmaximum von Proteinen. Der Grad der Verunreinigung der Probe durch Proteine kann mithilfe des Quotienten aus OD_{260} und OD_{280} bestimmt werden. Bei reiner RNA sollte das Verhältnis im Bereich von 1,9 bis 2,2 liegen. Bei Ratiowerten unter 1,3 ist die Probe mit Proteinen und/oder aromatischen Substanzen kontaminiert. Daher sollte in diesem Fall eine erneute Aufreinigung der RNA erfolgen. Mithilfe des oben genannten Wertes OD_{260} kann man zudem die RNA-Konzentration der Probe bestimmen. Da eine OD_{260} von 1 einer Konzentration von 40 µg/ml RNA entspricht erfolgt die Berechnung der RNA-Konzentration nach folgender Formel:

$$\text{Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = OD_{260} \times 40 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Die spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung der einzelnen RNA-Proben erfolgte im Photometer der Firma TECAN.

3.3 Reverse Transkription

Um RNA im Rahmen einer PCR vervielfältigen zu können, muss diese zunächst in DNA umgeschrieben werden. Da in der vorliegenden Arbeit eine Untersuchung der Genexpression stattfindet, wurden die jeweiligen Genfragmente mithilfe der qRT-PCR amplifiziert. Dazu musste zunächst die einzelsträngige RNA durch Zugabe von reverser Transkriptase in ein komplementäres DNA-Molekül (cDNA) umgeschrieben werden. Dieses diente in der qRT-PCR als Matrize.

Für die cDNA-Synthese wurden jeweils 1 bzw. 2 µg RNA verwendet. Dazu wurden die heterogen konzentrierten RNA-Proben nach Bedarf mit Wasser verdünnt, sodass

einheitliche Mengen von 19,5 µl gebildet wurden, die jeweils 1 bzw. 2 µg RNA enthielten. Nach der Zugabe von 1,5 µl Oligo-Primer (d'T) mit einer Konzentration von 1 pmol/µl wurde der Ansatz bei 72 °C für 4 Minuten vorinkubiert und dann auf 37 °C abgekühlt. Anschließend erfolgte die Zugabe eines Reaktionsmixes, bestehend aus 3 µl Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTP) aus einer Stammlösung mit einer Konzentration von 10 mM pro Nukleotid, 0,45 µl BSA (10 mg/ml), 0,50 µl RNase Inhibitor, 4,50 µl M-MuLV Reverse Transcriptase Buffer (10x), 0,50 µl M-MuLV Reverse Transcriptase und 15,05 µl Wasser. Dieser Ansatz wurde für 2 Stunden bei 37°C inkubiert, dann für 10 Minuten auf 94 °C erhitzt und abschließend auf 4 °C abgekühlt.

3.4 Quantitative Real-Time PCR

Die qRT-PCR macht eine zuverlässige Bestimmung und Messung von Produkten, die in den einzelnen PCR Zyklen gebildet werden, möglich.

Als Vorbereitung für die qRT-PCR wurden DNA-Gebrauchslösungen hergestellt. Dazu wurden je 22,5 µl cDNA, die aus 1 µg RNA gewonnen wurde, mit 100 µl DEPC-H₂O verdünnt und je 22,5 µl cDNA, die aus 2 µg RNA gewonnen wurde, mit 200 µl DEPC-H₂O verdünnt. Dann wurde pro Well zu je 4,6 µl verdünnter cDNA (22,5 µl cDNA + 100 bzw. 200 µl DEPC-H₂O) 5,3 µl eines Mastermixes, bestehend aus iTaq™Universal SYBR Green Supermix und dem entsprechenden DNA-Primer-Paar (forward und reverse), wobei die jeweilige Primerstammlösung eine Konzentration von jeweils 25 µM hatte, pipettiert. Alle Proben wurden als Duplikate pipettiert. Zur Kontrollmessung dienten NTCs. Dies sind Wells, in denen die cDNA durch H₂O ersetzt wird. Anschließend erfolgte die qRT-PCR im *Biorad CFX Connect™ Real-Time System*.

Als *Annealing*-Temperatur bezeichnet man die maximale Temperatur, bei der sich die Polynukleotidsequenz des Primers noch an den komplementären DNA-Strang anlagern kann. Sie ist direkt abhängig von der Länge und der Basenabfolge der Primer. Eine optimale *Annealing*-Temperatur ist Voraussetzung für eine fehlerlose PCR, bei der nur die erwünschten Produkte entstehen. Im Allgemeinen wird eine *Annealing*-Temperatur gewählt, die etwa 5 °C unter der niedrigeren der zwei Schmelztemperaturen des Primerpaares liegt⁷⁸. Bei sämtlichen durchgeführten qRT-PCRs der vorliegenden Arbeit kam eine *Annealing*-Temperatur von 60 °C zum Einsatz.

Der gesamte Ablauf des qRT-PCR-Prozesses ist schematisch in Abbildung 5 dargestellt.

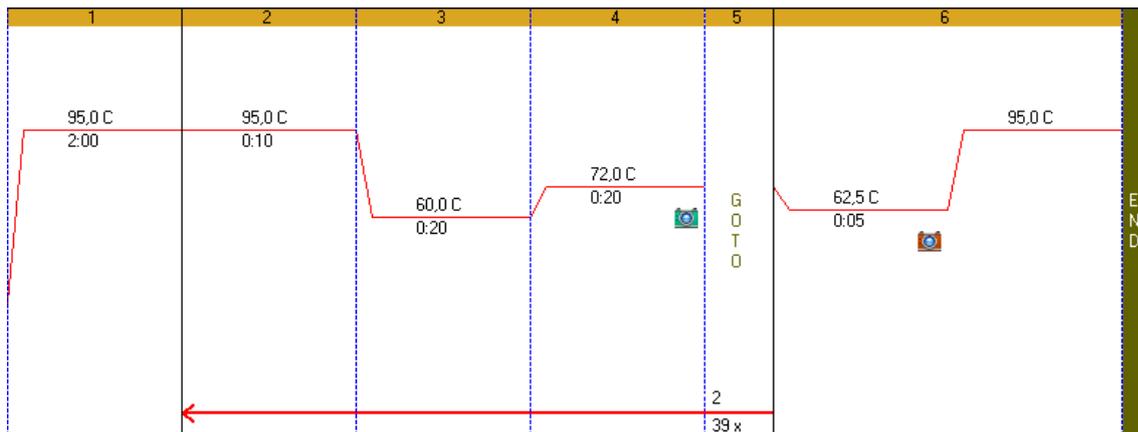


Abbildung 5: Ablaufschema der qRT-PCR im Biorad CFX Connect™ Real-Time System

Die Quantifizierung und Analyse der qPCR-Produkte erfolgt nach der ΔC_t -Methode. Als geometrisches Mittel wurden für die Normalisierung die drei Referenzgene RPL13a, B2M und YWAHZ, welche als Standard-Referenzgene in der AG Tikkanen zum Einsatz kommen, da man mit ihnen bisher die besten Ergebnisse erzielt hat, verwendet ⁷⁹.

3.5 Agarose-Gelelektrophorese (DNA)

Bei der Agarose-Gelelektrophorese handelt es sich um eine molekularbiologische Methode zur Auftrennung von Nukleinsäuren (DNA und RNA) ihrer Größe nach. Zudem kann durch den Vergleich mit Strängen bekannter Größe auch die Größe der jeweiligen Nukleinsäurestränge bestimmt werden.

Zur Herstellung des Agarosegels wurde 2 g Agarose in 100 ml TAE (0,5x) aufgelöst. Zum Gießen eines großen Gels wurde 80 ml der Lösung benötigt, zu der zusätzlich 8 μ l Ethidiumbromid hinzugefügt wurden. Die fertige Lösung wurde in eine Agarose-Gelelektrophorese-Kammer gefüllt und härtete dort aus. Den DNA-Proben wurden jeweils 2 μ l eines Ladepuffers, der u.a. auch Bromphenolblau enthält, welches als Farbmarder dient, hinzugefügt. Nachdem das Gel fest war, wurde es mit jeweils 8 μ l DNA beladen. Zusätzlich erfolgte die Beladung mit einem in der AG Tikkanen selbst hergestellten DNA-Größenmarker (DRAMA). Dann wurde die Agarose-Gelelektrophorese-Kammer an eine Spannungsquelle angeschlossen und das Gel bei 80 V und 400 mA für etwa 45 bis 60 Minuten laufen gelassen.

Das Ergebnis der Gelelektrophorese wurde auf einem UV-Flächenstrahler mittels Digitalkamera festgehalten.

3.6 Quantitative Bestimmung von Triglyzeriden im Blutserum der Versuchstiere

Als Vorbereitung für die Messung der Triglyzeride im Blutserum der Versuchstiere wurden die Serumproben von WT-Mäusen, Flot1-KO- und Flot2-KO-Mäusen je nach vorhandenem Probenvolumen 1:4 (75 µl Serum + 225 µl H₂O) oder 1:10 (30 µl Serum + 270 µl H₂O) verdünnt. Die Messung des Triglyzerid-Gehaltes im Serum der Versuchstiere erfolgte nach der Triglyzerid-Methode (TRIG) gemäß der Standardarbeitsanweisung des Gießener Instituts für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie in der Abteilung Molekulare Diagnostik. Als Analysegerät kam das ADVIA 1650 der Firma Siemens Medical Solutions Diagnostics zum Einsatz. Die Triglyzerid-Methode basiert auf einer dreistufigen enzymatischen Reaktion nach Fossati mit Endpunktverfahren nach Trinder. Bei dieser werden die Triglyzeride zunächst durch Lipasen in Glycerin und freie Fettsäuren umgewandelt. Dann wird das Glycerin durch die Glycerinkinase zu Glycerin-3-Phosphat umgewandelt und dieses durch Glycerin-3-Phosphat-Oxidase zu Wasserstoffperoxid umgesetzt. Unter dem katalytischen Einfluss von Peroxidase entsteht aus dem Wasserstoffperoxid, 4-Aminophenazon und 4-Chlorphenol ein Farbkomplex. Die Absorption des Komplexes wird in einer Endpunktreaktion bei 505 nm und 694 nm gemessen. Somit erfolgt eine quantitative Bestimmung der Gesamt-Triglyzeridkonzentration, einschließlich der Mono- und Diglyzeride sowie der freien Glycerinfraktion⁸⁰.

3.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse der qRT-PCR erfolgte mit der GraphPad Prism Software, wobei eine zweiseitige Varianzanalyse (ANOVA) angewandt wurde. Die Ergebnisse sind anhand des Mittelwerts ± Standardabweichung dargestellt. Die folglich resultierenden Signifikanzen sind auf die Werte der jeweiligen WT-Mäuse bezogen, wobei Werte mit $p < 0,001$ als hoch signifikant (***) oder ###, Werte mit $p < 0,01$ als sehr signifikant (**) oder ## und Werte mit $p < 0,05$ als signifikant (*) oder # angegeben werden.

Zur statistischen Auswertung der gemessenen Triglyzeridwerte im Blutserum der Versuchstiere diente der zweiseitige ungepaarte T-Test. Die Ergebnisse sind anhand des Mittelwerts ± Standardabweichung dargestellt. Auch hier sind die folglich resultierenden Signifikanzen auf die jeweiligen Werte der WT-Mäuse bezogen, wobei ebenfalls Werte mit $p < 0,001$ als hoch signifikant (***) oder ###, Werte mit $p < 0,01$ als

sehr signifikant (** oder # #) und Werte mit $p < 0,05$ als signifikant (* oder #) angegeben werden.

4. Ergebnisse

Um den Einfluss von Flotillinen auf die mRNA-Expression insulinabhängiger Gene zu untersuchen, wurde aus WT-Mäusen und Flot1- bzw. Flot2-KO-Mäusen isolierte RNA in cDNA umgeschrieben, sodass mit diesen Proben und den jeweiligen DNA-Primern der Zielgene qRT-PCRs durchgeführt werden konnten, um festzustellen, ob bei der Expression des jeweiligen Zielgens ein Unterschied zwischen WT und KO-Mäusen besteht.

Zur Normalisierung bei der Quantifizierung und Analyse der qPCR-Produkte, welche nach der Δ Ct-Methode erfolgte⁸¹, wurden Referenzgene als geometrisches Mittel herangezogen⁸¹. Die Wahl der Referenzgene, bei denen es sich um Haushaltsgene, welche konstitutiv exprimiert werden, handelt, ist abhängig vom zu untersuchenden Gewebe und sollte mit größter Sorgfalt erfolgen, damit es aufgrund von Instabilitäten der Referenzgene in ihrer Expression nicht zu einer Verfälschung der Auswertung der qRT-PCR-Ergebnisse kommt. Weiterhin sollten zur Berechnung des Normalisierungsfaktors (NF) mindestens drei Referenzgene verwendet werden.⁷⁹ In der vorliegenden Arbeit dienten hierzu die drei Referenzgene B2M, RPL13a und YWAHZ, deren Einsatz in der Arbeitsgruppe Tikkanen bisher zu den genauesten Ergebnissen geführt haben und sie hier daher als Standardreferenzgene eingesetzt werden.

Bei dem **Beta-2 Mikroglobulin** (B2M) handelt es sich um ein Protein, welches als Bestandteil des MHC I an nahezu allen Oberflächen zellkernhaltiger Zellen zu finden ist und der Antigenpräsentation dient⁸².

Das **Ribosomale Protein L13a** (RPL13a) ist ein Bestandteil von Ribosomen. Ribosomen sind intrazelluläre Strukturen, in denen die Proteinbiosynthese stattfindet. Sie bestehen aus einer kleinen 40S und einer großen 60S Untereinheit. Diese sind wiederum aus RNA und Proteinen aufgebaut. Das Rpl13a ist am Aufbau der 60S Untereinheit beteiligt⁸³. Außerdem gehört es zum *IFN-gamma-activated inhibitor of translation (GAIT)* Komplex und spielt dabei eine Rolle bei der Unterdrückung von Entzündungsvorgängen⁸⁴.

Das **Ywhaz** gehört zu der Familie der 14.3.3 Proteine, welche durch ihre Bindung an phosphoserin- und phosphothreoninhaltige Proteine eine große Vielfalt an allgemeinen und speziellen Signaltransduktionswegen auslösen⁸⁵. Es ist bekannt, dass Ywhaz mit dem IRS-1 interagiert und somit eine Rolle bei der Regulation der Insulinempfindlichkeit spielt, indem es die Assoziation vom Insulinrezeptor mit dem IRS-1 unterbricht⁸⁶. Weiterhin konnte in YWAHZ-KO-Mäusen eine erhöhte Glukosetoleranz nachgewiesen werden, welche Resultat einer erhöhten GLP-1 (*glucagon-like peptide-1*)-Synthese und

-Freisetzung war. Dies impliziert einen negativen Einfluss von Ywaz auf die Glukosetoleranz. GLP-1 ist ein Peptidhormon, welches von den neuroendokrinen L-Zellen im Ileum und Colon synthetisiert und freigesetzt wird und zu einer glukoseabhängigen Freisetzung von Insulin führt.⁸⁷

4.1 Einfluss von Flotillinen auf die mRNA-Expression von insulinabhängigen Genen in Leberzellen von Mäusen

Die Untersuchung des Einflusses von Flotillin 1 und Flotillin 2 auf die mRNA-Expression von insulinabhängigen Genen in Leberzellen von Mäusen führte zu keinem Ergebnis, da die RNA-Menge der Proben zur Durchführung der qRT-PCR zu gering war und somit keine aussagekräftigen Werte bei der qRT-PCR erzielt werden konnten. Daher wird im Folgenden der Fokus auf den Einfluss von Flotillin 1 und Flotillin 2 auf die mRNA-Expression von insulinabhängigen Genen in Skelettmuskelzellen von Mäusen gelegt.

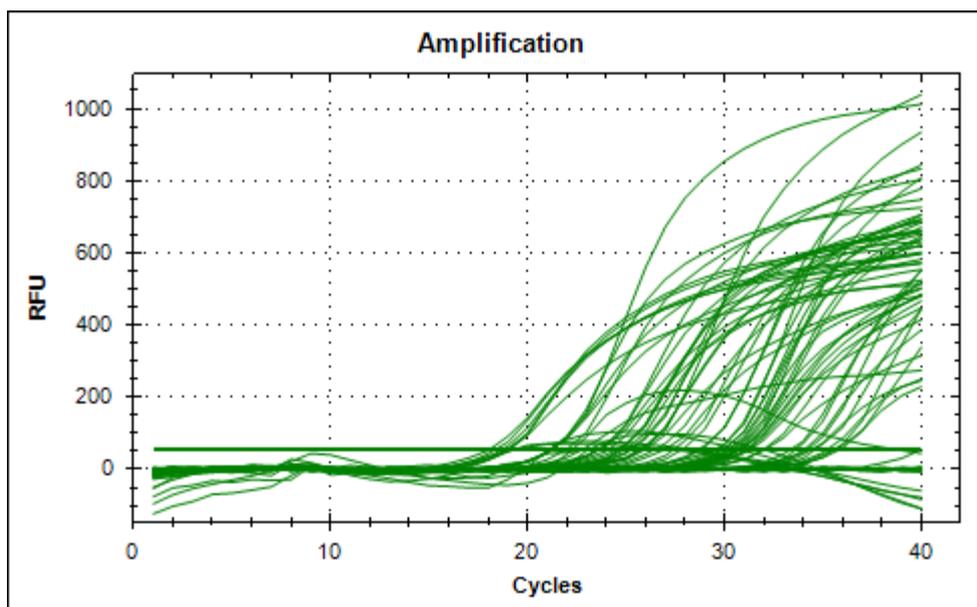


Abbildung 6: Ergebnis der qRT-PCR von aus Leberzellen isolierter RNA am Beispiel eines Referenzgenes. Auf der x-Achse wird angezeigt, um den wievielten PCR-Zyklus es sich handelt, während die y-Achse die Fluoreszenz der Amplifikationsreaktion anzeigt, welche proportional ist zu der Menge an amplifiziertem Produkt. Zu Beginn der Zyklen ist keine Steigerung der Fluoreszenz ersichtlich, obwohl es zur exponentiellen Ansammlung von Produkten kommt. Der Zyklus, bei welchem ausreichend Produkte amplifiziert wurden, um ein sichtbares Fluoreszenzsignal zu erzielen, wird als der threshold cycle (C_T) bezeichnet. Da der C_T -Wert während der exponentiellen Phase gemessen wird, kann er bei der qRT-PCR verwendet werden, um die initiale Probenmenge zu berechnen. Der C_T -Wert einer Reaktion wird hauptsächlich durch die Probenmenge zu Beginn der Amplifikationsreaktion bestimmt. Ist genug cDNA vorhanden, werden nur wenige Amplifikationszyklen benötigt, um genügend Produkte anzusammeln, die ein Fluoreszenzsignal erzielen, sodass in dem Fall ein niedriger C_T -Wert erzielt wird. Ist allerdings nur wenig cDNA zu Beginn der Amplifikationsreaktion vorhanden, dauert es länger, genügend Produkte anzusammeln, um ein Fluoreszenzsignal zu erzielen, sodass hierbei ein hoher C_T -Wert erzielt wird. Dass die initiale Probenmenge der aus den Leberzellen isolierten RNA größtenteils

zu gering war, ist an den ausbleibenden bzw. sehr hohen C_T -Werte zu erkennen, welche keine aussagekräftige Auswertung der qRT-PCR-Ergebnisse zulassen.

4.2 Einfluss von Flotillinen auf die mRNA-Expression von insulinabhängigen Genen in Skelettmuskelzellen von Mäusen

Im Gegensatz zu den Leberprimärzellen wiesen die Skelettmuskelzellen eine ausreichende Menge an RNA auf, sodass die jeweiligen qRT-PCRs zu spezifischen Genprodukten führten und somit auch auswertbar waren.

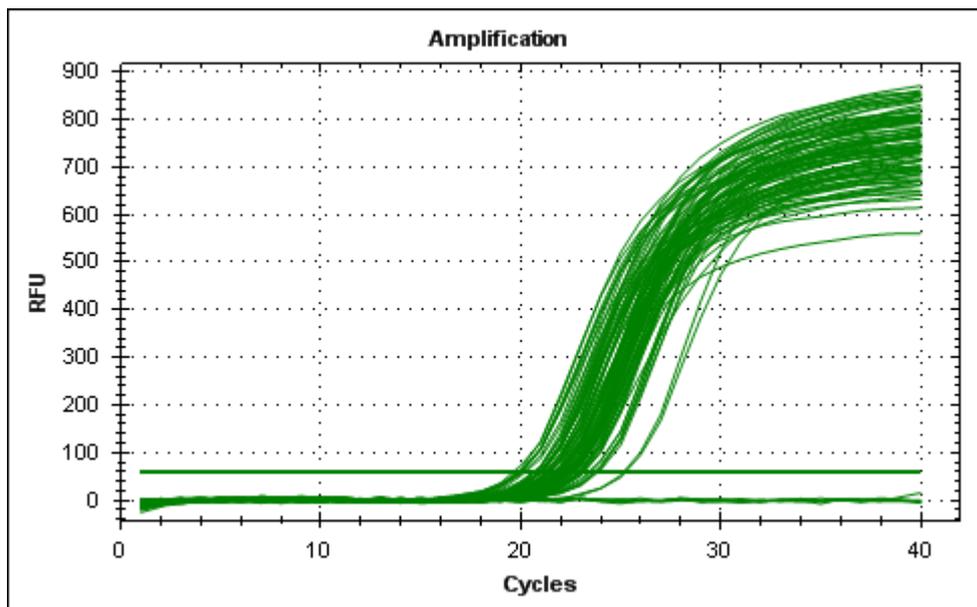


Abbildung 7: Ergebnis der qRT-PCR von aus Skelettmuskelzellen isolierter RNA am Beispiel eines Zielgenes. Die C_T -Werte der einzelnen Proben liegen etwa zwischen 18 und 26 und sind somit gut auswertbar. Die Graphen ohne Steigung verdeutlichen die NTC-Proben, bei denen eine Amplifikation ausbleibt, da sie keine cDNA enthalten.

Bei den zu untersuchenden Zielgenen handelt es sich um Gene, deren Expression durch das Vorhandensein von Insulin beeinflusst wird. Anhand der relativen Menge der exprimierten Gene, die man mithilfe der qRT-PCR bestimmen kann, kann man den Einfluss von Flotillinen auf jene insulinabhängige Gene beurteilen, indem man die Ergebnisse der WT-Proben mit den KO-Proben vergleicht. Neben Flotillin 1 und Flotillin 2 kamen noch elf weitere Zielgene in dieser Arbeit zum Einsatz, welche im Folgenden nach ihrer Funktion unterteilt sind.

4.2.1 Einfluss von Flotillin 1 und 2 auf Gene des Lipidstoffwechsels

Bei den Zielgenen ACCA, PPARG und SREBP1c handelt es sich um Gene, deren Genprodukte am Lipidstoffwechsel beteiligt sind. Anhand des Vergleichs derer

Expression in WT- und den jeweiligen KO-Mäusen kann man den Einfluss von Flotillin 1 bzw. Flotillin 2 auf diese insulinabhängigen Gene des Lipidstoffwechsels beschreiben.

Die **Acetyl-CoA-Carboxylase** (ACCA) ist ein Biotin-abhängiges Enzym, welches die Schrittmacherreaktion der Fettsäuresynthese katalysiert, bei der es sich um die irreversible Carboxylierung von Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA handelt. Daher spielt sie eine große Rolle im Metabolismus von Fettsäuren. Sie wird durch Phosphorylierung inaktiviert und durch Dephosphorylierung wieder aktiviert. Diese Aufgabe übernimmt eine AMP-abhängige Proteinkinase, welche wiederum durch AMP aktiviert und durch ATP inaktiviert wird, sodass die Fettsäuresynthese nur stattfindet, wenn ausreichend Energie in Form von ATP vorhanden ist. Die Acca reguliert den Metabolismus, indem sie, wenn sie aktiv ist, die Fettsäuresynthese stimuliert und die β -Oxidation von Fettsäuren in den Mitochondrien inhibiert. Die Carboxylase kann außerdem durch Citrat aktiviert und durch Glukose und Insulin induziert werden. Eine Inhibition der Acca erfolgt neben AMP auch durch die Antagonisten Palmitoyl-CoA, Glukagon und Adrenalin².

Peroxisome proliferator activator receptors sind intrazelluläre im Zellkern lokalisierte Rezeptoren, welche durch ihre Funktion als Transkriptionsfaktoren eine Rolle im Fettstoffwechsel und bei metabolischen Erkrankungen spielen⁸⁸. Sie sind in der Lage, Peroxisomproliferatoren wie hypolipidämische Medikamente und Fettsäuren zu binden. Es gibt drei Subtypen der *Peroxisome proliferator activator receptors*, bei denen es sich um den *Peroxisome proliferator activator receptor alpha*, den *Peroxisome proliferator activator receptor beta*, auch unter dem Namen *Peroxisome proliferator activator receptor delta* bekannt, und den ***Peroxisome proliferator activator receptor gamma*** (PPARG) handelt.⁸⁹ Von dem letzteren sind zwei Isoformen bekannt, die scheinbar von den gleichen Liganden aktiviert werden.⁹⁰ Während der PPARG 1 in vielen Geweben exprimiert wird, beschränkt sich die Expression des PPARG 2 unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich auf Adipozyten. Sobald der *Peroxisome proliferator activator receptor gamma* durch einen Liganden aktiviert wird, bindet er als Heterodimer mit dem Retinoid X Rezeptor (RXR) an DNA spezifische *PPAR response regulatory elements* und reguliert die Transkription einer Vielzahl von Zielgenen, wie z.B. die Transkription des Gens, das für die Acyl-CoA-Oxidase kodiert. Somit nimmt der Pparg an der Regulation der peroxisomalen β -Oxidation von Fettsäuren teil.⁹¹ Außerdem nimmt er auch eine Schlüsselrolle bei der Differenzierung von Adipozyten⁹² und im Glukosehaushalt ein, indem er eine vermehrte Expression des GLUT4 und des CAP hervorruft⁹¹. Durch seine Regulation der Expression vieler Faktoren, die im Fettgewebe sekretiert werden, wie beispielsweise Adiponektin, Resistin, Leptin und TNF- α , beeinflusst er die Insulinempfindlichkeit⁹³⁻⁹⁶. Daher stellt er einen guten Angriffspunkt für antidiabetische

Medikamente dar⁹⁷. Zudem zählt der Ppar γ neben den Transkriptionsfaktoren Egr1, SRF, RXR α und RAR α zu den positiven Regulatoren der Expression von Flotillin 1 und 2⁹⁸.

Der *sterol regulatory element binding transcription factor 1* (SREBF1), auch unter dem Namen ***sterol regulatory element binding protein 1c*** (SREBP1c) bekannt, gehört zu einem der drei Transkriptionsfaktoren der SREBP Familie, welche die Synthese von Sterinen und ungesättigten Fettsäuren induzieren⁹⁹. Das Srebp1c bindet an das *sterol regulatory element-1*, welches an den Genen, die für den *low density lipoprotein receptor* und für Proteine der Sterinbiosynthese kodieren, lokalisiert ist¹⁰⁰. Insulin-Signaltransduktionswege führen zu einer positiven Regulation der Expression von SREBP1c¹⁰¹.

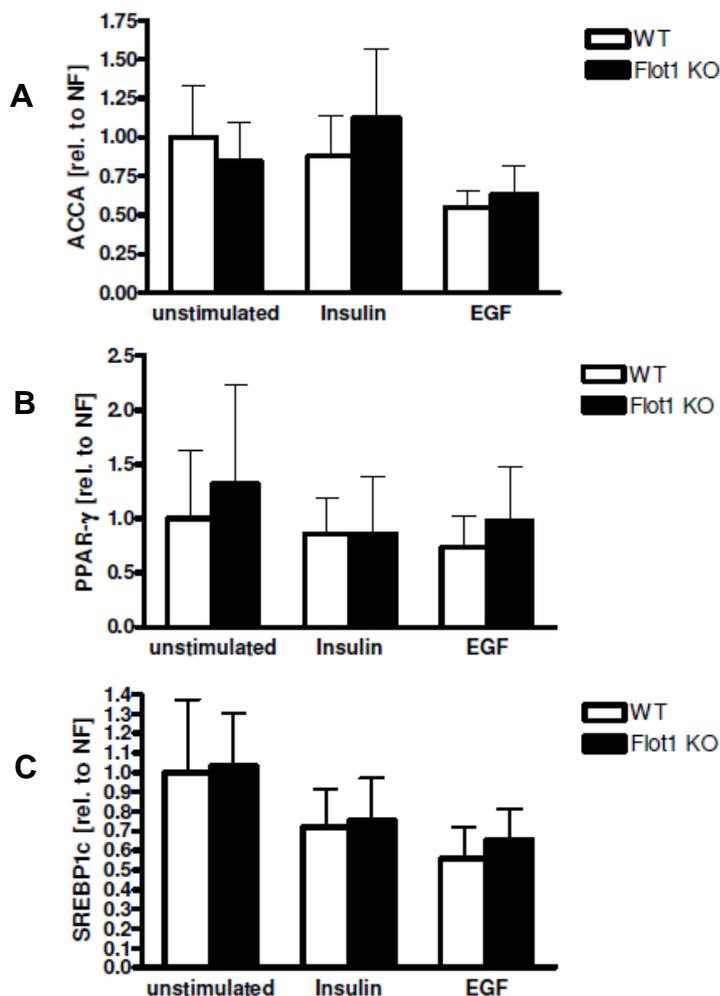


Abbildung 8: Einfluss von Flotillin 1 auf die mRNA-Expression von insulinabhängigen Genen des Lipidstoffwechsels. Der Einfluss auf die Expression von ACCA (A), PPARG (B) und SREBP1c (C) wird mithilfe der qRT-PCR-Analyse bestimmt. Die Säulendiagramme (≥ 5 Mäuse pro Gruppe) stellen den Mittelwert \pm die Standardabweichung der jeweiligen Auswertung dar. Die statistische Auswertung der qRT-PCR-Werte erfolgt mittels der zweiseitigen Varianzanalyse (ANOVA) bezogen auf die jeweilige WT-Gruppe ($p < 0,001$ ***, $p < 0,01$ **, $p < 0,05$ *).

Diagramm A zeigt, dass es zwischen den WT- und Flot1-KO-Mäusen keinen signifikanten Unterschied bei der Expression des ACCA gibt. Die mit EGF behandelten

Proben zeigen tendenziell eine geringere Expression von ACCA als die unstimulierten und die mit Insulin stimulierten Proben.

Auch bei der Expression von PPARG gibt es, wie Diagramm B zeigt, weder einen signifikanten Unterschied zwischen den WT- und Flot1-KO-Mäusen, noch einen bei der Expression zwischen den unstimulierten, mit EGF und mit Insulin stimulierten Proben.

Die Expression von SREBP1c ist in Diagramm C dargestellt. Es ist kein signifikanter Unterschied bei der Menge des exprimierten Gens zwischen den Proben der unstimulierten Skelettmuskelzellen, den mit Insulin stimulierten und den mit EGF stimulierten Zellen zu erkennen. Die Expression von SREBP1c weist ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen den WT- und Flot1-KO-Mäusen auf.

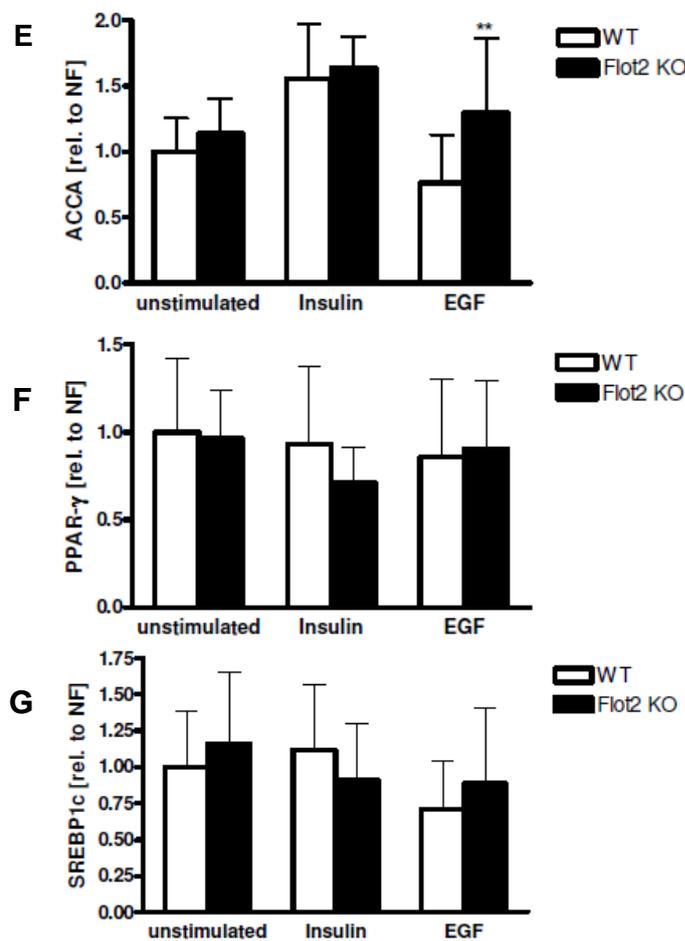


Abbildung 9: Einfluss von Flotillin 2 auf die mRNA-Expression von insulinabhängigen Genen des Lipidstoffwechsels. Der Einfluss auf die Expression von ACCA (A), PPARG (B) und SREBP1c (C) wird mithilfe der qRT-PCR-Analyse bestimmt. Die Säulendiagramme (≥ 4 Mäuse pro Gruppe) stellen den Mittelwert \pm die Standardabweichung der jeweiligen Auswertung dar. Die statistische Auswertung der qRT-PCR-Werte erfolgt mittels der zweiseitigen Varianzanalyse (ANOVA) bezogen auf die jeweilige WT-Gruppe ($p < 0,001$ ***, $p < 0,01$ **, $p < 0,05$ *).

Diagramm E verdeutlicht, dass die Expression der ACCA, wie erwartet, in den mit Insulin stimulierten Proben tendenziell am höchsten ist. Während zwischen den WT- und Flot2-KO-Mäusen bei unstimulierten und mit Insulin stimulierten Proben kein signifikanter

Unterschied zu erkennen ist, liegt bei der Expression von ACCA zwischen den WT- und Flot2-KO-Mäusen bei den mit EGF behandelten Proben ein sehr signifikanter Unterschied vor. ACCA wird in den Flot2-KO-Mäusen in höherer Menge exprimiert als in den WT-Mäusen.

Die Unterschiede bei der Expression des PPARG zwischen WT- und Flot2-KO-Mäusen sind, wie in Diagramm F erkennbar, nicht signifikant. Die Expression des Gens ist in den unstimulierten, den mit Insulin stimulierten und den mit EGF stimulierten Proben ähnlich.

Das letzte Diagramm G verdeutlicht, dass es auch keine signifikanten Unterschiede bei der Expression des SREBP1c zwischen WT- und Flot2-KO-Mäusen gibt. Die Expression ist sowohl in den unstimulierten als auch in den mit EGF und mit Insulin behandelten Proben in etwa gleich.

Insgesamt lassen sich keine Unterschiede bei der mRNA-Expression der oben genannten Gene des Lipidstoffwechsels zwischen den unstimulierten, den mit Insulin stimulierten und den mit EGF stimulierten Proben zeigen. Ein Einfluss durch das Fehlen von Flotillin 1 oder 2 lässt sich lediglich bei der Expression der ACCA bei den mit EGF stimulierten Proben zwischen Flot-2-KO- und WT-Mäusen erkennen. Hierbei weisen die Proben der WT-Mäuse eine signifikant geringere Expressionsmenge der ACCA auf als die der Flot-2-KO-Mäuse.

4.2.2 Einfluss von Flotillin 1 und 2 auf Gene des Glukosestoffwechsels

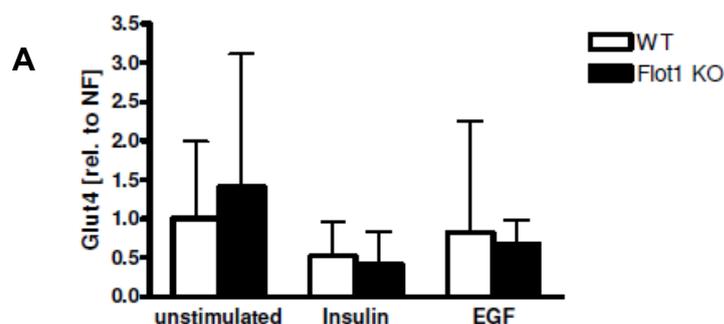
Zu den eingesetzten Zielgenen, deren Genprodukte am Glukosestoffwechsel beteiligt sind, zählen GLUT4, HK2, INSR, PFKL und PFKM. Anhand des Vergleichs derer Expression in WT- und den jeweiligen KO-Mäusen kann man den Einfluss von Flotillin 1 bzw. Flotillin 2 auf diese insulinabhängigen Gene des Glukosestoffwechsels beschreiben.

Der **Glukose Transporter Typ 4** (GLUT4) übernimmt die Schlüsselrolle bei der Regulation der Glukose-Homöostase des gesamten Körpers. Er wird vor allem im Fettgewebe, im Skelettmuskel und in Zellen des Myokards in großer Menge exprimiert. Der Glut 4 ermöglicht eine ATP-unabhängige erleichterte Diffusion von Hexosen über die Zellmembran. Im inaktiven Zustand liegt der Glut 4 in intrazellulären Vesikeln vor. Sobald er durch Insulin oder andere Stimuli, wie z.B. körperliche Anstrengung, aktiviert wird, kommt es zur Translokation des Transporters aus den intrazellulären Vesikeln in die Plasmamembran der Zelle, in die er sich einbaut und dann den Transport von Glukose in die Zelle ermöglicht¹⁰².

Hexokinasen sind Enzyme, die größtenteils den ersten Schritt des Glukosestoffwechsels katalysieren. Sie sorgen für die Phosphorylierung von Glukose zu Glukose-6-Phosphat². Die **Hexokinase 2** (HK2) ist die vorherrschende Form im Skelettmuskel. Sie ist an der äußeren Membran der Mitochondrien lokalisiert und ihre Expression wird durch Insulin induziert¹⁰³.

Bei dem **Insulinrezeptor** (INSR) handelt es sich um einen Transmembranrezeptor, der zur Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen gehört. Die Expression des Gens, das für den Insulinrezeptor kodiert, führt zur Bildung eines Präproteins, aus welchem durch proteolytische Prozesse α - und β -Untereinheiten entstehen². Der reife Insulinrezeptor ist ein Dimer, der aus zwei Untereinheiten besteht, welche wiederum aus je einer α - und β -Untereinheit zusammengesetzt sind, die über Disulfidbrücken kovalent miteinander verbunden sind. Die α -Untereinheiten liegen außerhalb der Zelle und bilden zusammen die Ligandbindungsstelle. Die β -Untereinheiten hingegen liegen größtenteils innerhalb der Zelle und enthalten jeweils eine Proteinkinase-Domäne.¹⁰⁴ Bei dieser Proteinkinase handelt es sich um eine Tyrosinkinase, welche den Transfer einer Phosphorylgruppe von ATP auf die Hydroxylgruppe eines Tyrosinrestes katalysiert. Da die Tyrosinkinase ein Bestandteil des Rezeptors ist, wird der Insulinrezeptor auch als Rezeptor-Tyrosinkinase bezeichnet. Er kann durch Insulin, IGF-I und II aktiviert werden. Bei einer Ligandbindung bewegen sich die zwei α -Untereinheiten aufeinander zu². Dies löst verschiedene Signaltransduktionswege aus, die wichtig für die Zelldifferenzierung, das Zellwachstum und den Stoffwechsel sind¹⁰⁵.

Die Phosphofruktokinase ist ein Enzym, das unter ATP-Verbrauch die Umwandlung von Fructose-6-Phosphat zu Fructose-1,6-Bisphosphat katalysiert. Hierbei handelt es sich um einen wichtigen Schritt im Glukosestoffwechsel.² Je nach dem Reaktionsort unterscheidet man die **Phosphofruktokinase Leber** (PFKL) und die **Phosphofruktokinase Muskel** (PFKM) Die Expression der für diese Proteine kodierenden Gene wird durch Insulin induziert¹⁰⁶.



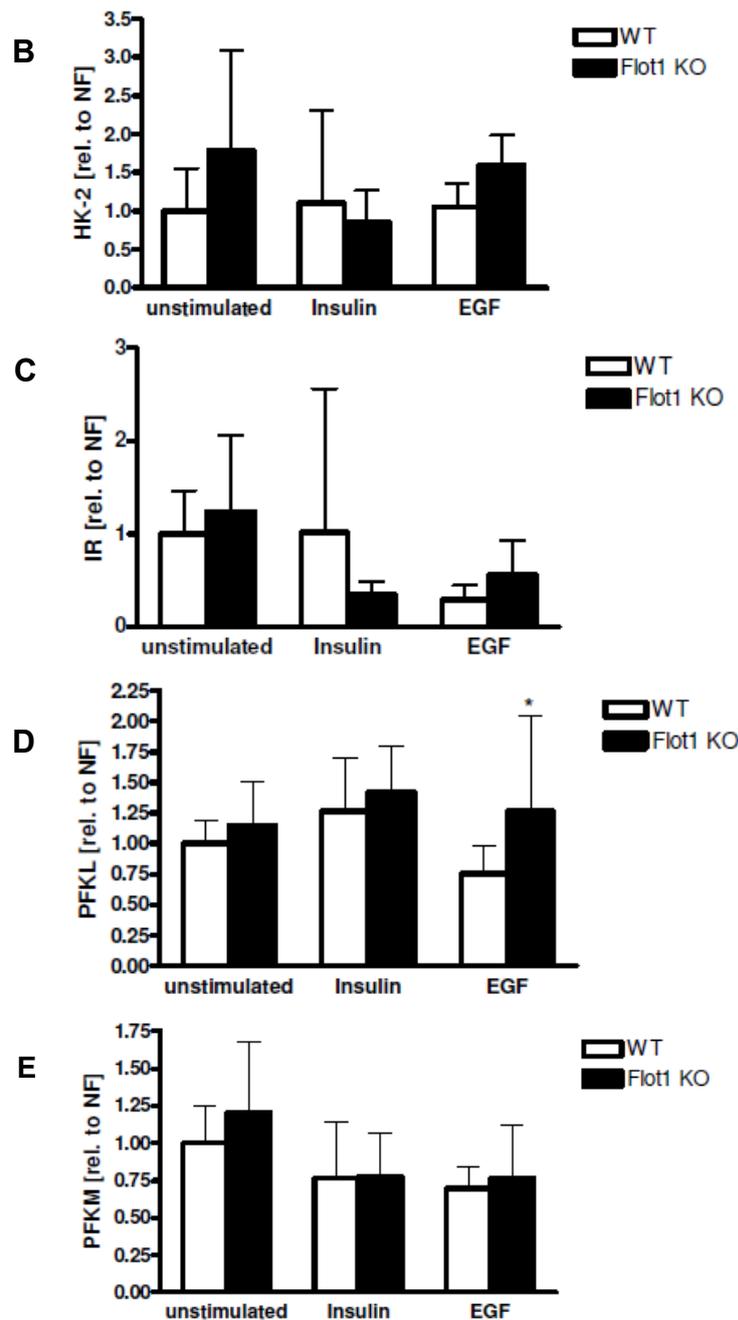


Abbildung 10: Einfluss von Flotillin 1 auf die mRNA-Expression von insulinabhängigen Genen des Glukosestoffwechsels. Der Einfluss auf die Expression von GLUT4 (A), HK2 (B), INSR (C), PFKL (D) und PFKM (E) wird mithilfe der qRT-PCR-Analyse bestimmt. Die Säulendiagramme (≥ 5 Mäuse pro Gruppe) stellen den Mittelwert \pm die Standardabweichung der jeweiligen Auswertung dar. Die statistische Auswertung der qRT-PCR-Werte erfolgt mittels der zweiseitigen Varianzanalyse (ANOVA) bezogen auf die jeweilige WT-Gruppe ($p < 0,001$ ***, $p < 0,01$ **, $p < 0,05$ *).

Diagramm A bringt die Expression des GLUT4 zum Ausdruck. Es zeigt, dass das Gen in allen drei Proben in etwa in gleicher Menge exprimiert wird. Bei keiner der Proben ist ein signifikanter Unterschied zwischen WT- und Flot1-KO-Mäusen zu erkennen.

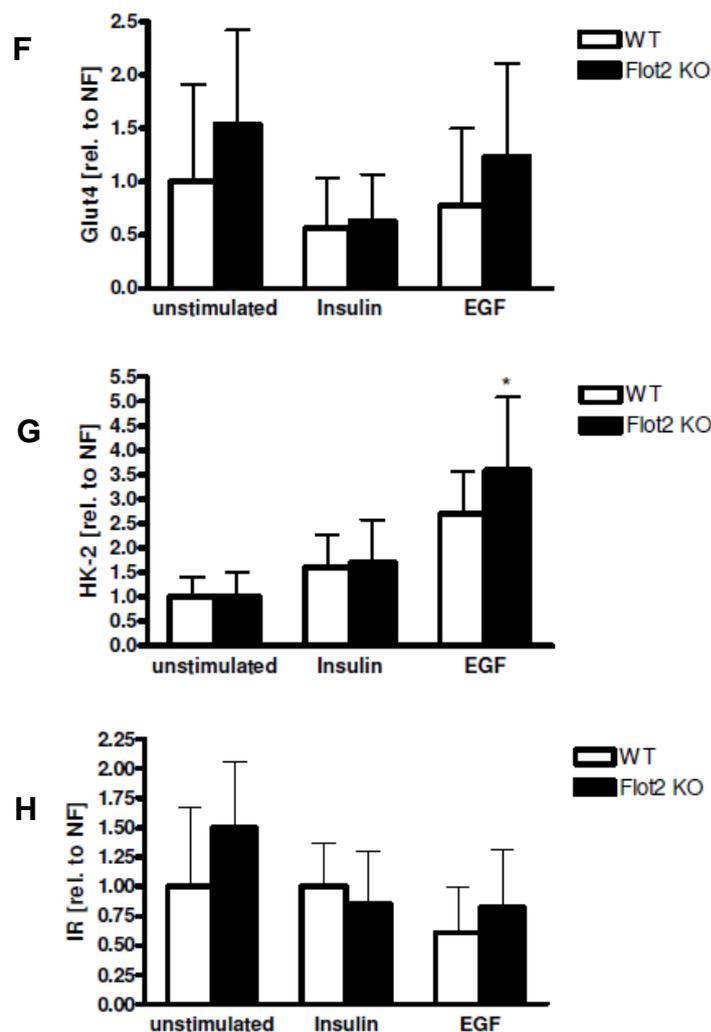
Diagramm B verdeutlicht, dass sowohl in den unstimulierten als auch in den mit EGF stimulierten Proben die Flot1-KO-Mäuse eine tendenziell, aber nicht signifikant höhere

Expression der HK2 aufweisen als die WT-Mäuse. Allerdings handelt es sich auch hier um keinen signifikanten Unterschied zwischen WT- und Flot1-KO-Mäusen.

Bei der Expression des Insulinrezeptors liegt, wie in Diagramm C ersichtlich ist, ebenfalls kaum ein Unterschied zwischen den drei Proben vor. Auch hier lässt sich kein signifikanter Unterschied bei der Expression zwischen WT- und Flot1-KO-Mäusen feststellen.

Die Expression der PFKL ist in Diagramm D dargestellt. Sie wird sowohl in den unstimulierten als auch in den mit Insulin und EGF stimulierten Proben in etwa in der gleichen Menge exprimiert, wobei es sich nur bei den mit EGF stimulierten Proben um einen signifikanten Unterschied zwischen WT- und Flot1-KO-Mäusen handelt. Hierbei weisen die Flot1-KO-Mäuse eine höhere Expression von PFKL auf als die WT-Mäuse.

Die Menge der exprimierten PFKM, in Diagramm E aufgeführt, ist wie bei PFKL in den unstimulierten, den mit Insulin und den mit EGF stimulierten Proben ähnlich. Allerdings besteht hier bei keiner der Proben ein signifikanter Unterschied zwischen den WT- und Flot1-KO-Mäusen.



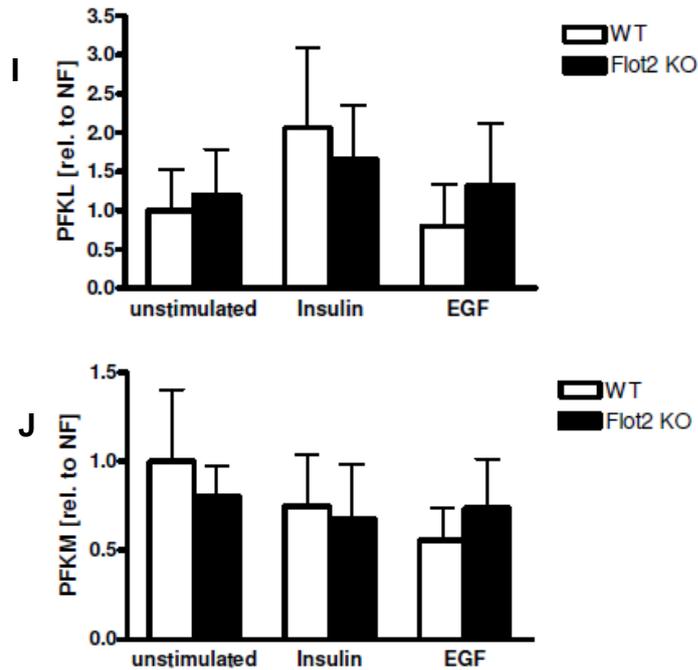


Abbildung 11: Einfluss von Flotillin 2 auf die mRNA-Expression von insulinabhängigen Genen des Glukosestoffwechsels. Der Einfluss auf die Expression von GLUT4 (F), HK2 (G), INSR (H), PFKL (I) und PFKM (J) wird mithilfe der qRT-PCR-Analyse bestimmt. Die Säulendiagramme (≥ 4 Mäuse pro Gruppe) stellen den Mittelwert \pm die Standardabweichung der jeweiligen Auswertung dar. Die statistische Auswertung der qRT-PCR-Werte erfolgt mittels der zweiseitigen Varianzanalyse (ANOVA) bezogen auf die jeweilige WT-Gruppe ($p < 0,001$ ***, $p < 0,01$ **, $p < 0,05$ *).

Diagramm F verdeutlicht, dass der GLUT4 bei allen Proben in den Flot2-KO-Mäusen tendenziell vermehrt exprimiert wird, wobei es sich jedoch um keinen signifikanten Unterschied gegenüber den WT-Mäusen handelt. Zwar lässt sich im Vergleich zu den WT-Mäusen tendenziell eine höhere Expressionsrate des Gens in den mit EGF behandelten Proben der Flot2-KO-Mäuse erkennen, wobei es sich allerdings auch um keinen signifikanten Unterschied handelt.

Die Expression der HK2 ist in Diagramm G dargestellt. Sie nimmt von den unstimulierten über die mit Insulin stimulierten hin zu den mit EGF stimulierten Proben tendenziell zu. Bei den ersteren liegt kein signifikanter Unterschied zwischen WT- und Flot2-KO-Mäusen vor, während es sich bei den mit EGF stimulierten Proben um einen signifikanten Unterschied zwischen WT- und Flot2-KO-Mäusen handelt, bei dem die mit EGF behandelten Proben der Flot2-KO-Mäuse eine höhere Menge an exprimierter HK2 aufweisen als die WT-Mäuse.

Diagramm H zeigt, dass der Insulinrezeptor sowohl in den unstimulierten als auch in den mit Insulin und mit EGF stimulierten Proben in etwa in der gleichen Menge exprimiert

wird. Bei keiner der Proben liegt ein signifikanter Unterschied zwischen WT- und Flot2-KO-Mäusen.

Die PFKL wird, wie Diagramm I veranschaulicht, wie erwartet, in den mit Insulin behandelten Proben tendenziell in höchster Menge exprimiert. Die mit EGF behandelten Proben der Flot2-KO-Mäuse weisen im Vergleich zu den Proben der WT-Mäuse tendenziell eine höhere Expression des Gens auf. Allerdings besteht weder bei diesen noch bei den unstimulierten oder mit Insulin behandelten Proben ein signifikanter Unterschied bei der Expression der PFKL zwischen WT- und Flot2-KO-Mäusen.

Auch bei der Expression der PFKM, welche in Diagramm J angezeigt ist, besteht kein signifikanter Unterschied zwischen sämtlichen Proben der WT- und Flot2-KO-Mäuse, wobei jedoch auch bei diesem Gen wieder eine tendenziell höhere Expressionsrate in den mit EGF behandelten Proben der Flot2-KO-Mäuse im Vergleich zu den WT-Mäusen zu finden ist.

Bei den Genen des Glukosestoffwechsels lässt sich durch das Fehlen von Flotillin 1 oder 2 somit ebenfalls kein offensichtlicher Einfluss auf deren Expression beobachten, da es auch hier keine signifikanten Unterschiede bei der Expression der Gene zwischen den unstimulierten und den mit Insulin behandelten Proben der KO- und WT-Mäusen gibt. Die mit EGF behandelten WT-Mäuse weisen im Vergleich zu den jeweiligen KO-Mäusen tendenziell eine geringere Expression des jeweiligen Gens auf, wobei es sich bei der Expression der HK2 in den Flot2-KO-Mäusen und der Expression der PFKL in den Flot1-KO-Mäusen um signifikante Unterschiede bezogen auf die jeweilige WT-Probe handelt.

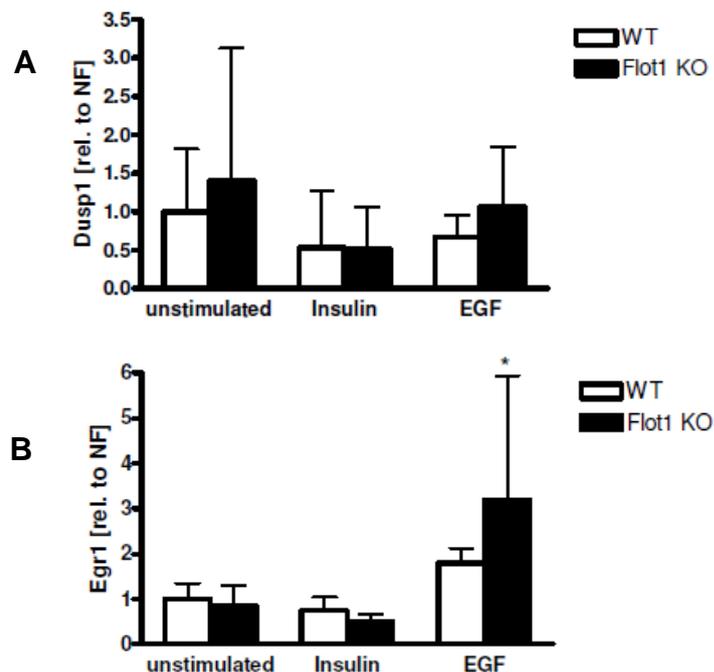
4.2.3 Einfluss von Flotillin 1 und 2 auf MAP-Kinase-Weg beeinflussende Gene

Unter den verwendeten Zielgenen nehmen nicht nur DUSP1 und EGR1 an der Expression von Genprodukten teil, die den MAP-Kinase-Weg beeinflussen, sondern auch FLOT1 und FLOT2.

Die Expression der **dual specificity phosphatase 1** (DUSP1) wird durch p53 reguliert¹⁰⁷⁻¹¹⁰ und erfolgt in Fibroblasten menschlicher Haut als Reaktion auf oxidativen Stress, Hitze oder Wachstumsfaktoren¹¹¹. Die Dusp1 kann aufgrund ihrer Phosphatase-Eigenschaft Substrate sowohl an ihren Tyrosin- als auch an ihren Serin/Threonin-Resten dephosphorylieren, was ihre Bezeichnung als *dual specificity* Phosphatase erklärt, und nimmt so einen negativen Einfluss auf die MAP-Kinase-Aktivität. Daher scheint sie eine wichtige Rolle in der negativen Regulation der Zellproliferation zu spielen¹¹². Sie reguliert primär die Aktivität von p38 und JNKs und hat nur wenig Effekt auf die Regulation von

ERKs^{113,114}. Indem sie p38 und JNKs direkt dephosphoryliert, nimmt sie einen negativ regulierenden Einfluss auf die angeborene Immunantwort¹¹⁵. Die Dusp1 ist hauptsächlich im Zellkern lokalisiert und wird von *immediate-early genes* kodiert. Da ihre Expression durch die gleichen Stimuli induziert wird, welche den MAP-Kinase-Weg aktivieren, wird die Funktion von Dusps im Rahmen eines Rückkopplungs-Kontrollmechanismus innerhalb des MAP-Kinase-Weges diskutiert.^{116,117} Hierbei scheinen die Dusps durch die negative Rückkopplung im MAP-Kinase-Weg vor allem bei langanhaltender Stimulation bzw. onkogener Transformation einer Überfunktion der ERKs vorzubeugen¹¹⁸. Eine Phosphorylierung der Dusp1 ist zwar nicht notwendig für ihre Aktivität, kann diese jedoch verstärken, was anhand von Untersuchungen, bei der die Dusp1 durch ERKs phosphoryliert wurde und daraufhin eine zwei- bis dreifach erhöhte Halbwertszeit aufwies, gezeigt wurde^{119,120}.

Das Gen **early growth response 1** (EGR1) kodiert für ein Protein, welches als Transkriptionsfaktor fungiert. Es gehört zur Familie der Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren und wird besonders durch proliferative Stimuli, aber auch durch Stress induziert. Es sorgt für die Aktivierung von Genen, die für Proteine kodieren, die zur Differenzierung und Mitogenese benötigt werden¹²¹. Dazu gehören beispielsweise das p53 und der TGF β 1, daher wird eine Funktion des EGR1 als Tumorsuppressorgen diskutiert¹²². Insulin hat einen positiven Einfluss auf die Expression des EGR1 in Gefäßendothelien¹²³. Egr1 wiederum zählt zu den Transkriptionsfaktoren, die einen positiv regulierenden Einfluss auf die Expression von Flotillinen haben⁹⁸.



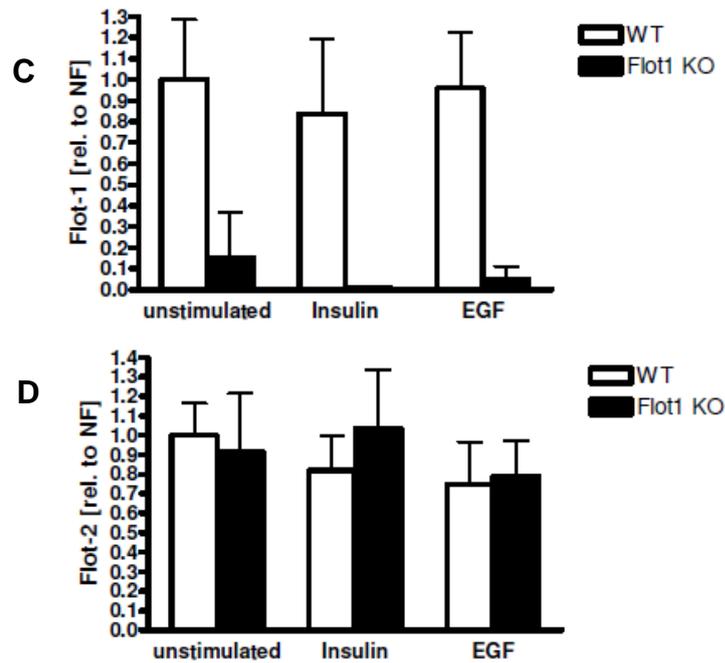


Abbildung 12: Einfluss von Flotillin 1 auf die mRNA-Expression von MAP-Kinase-Weg beeinflussenden Genen. Der Einfluss auf die Expression von DUSP1 (A), EGR1 (B), FLOT1 (C) und FLOT2 (D) wird mithilfe der qRT-PCR-Analyse bestimmt. Die Säulendiagramme (≥ 5 Mäuse pro Gruppe) stellen den Mittelwert \pm die Standardabweichung der jeweiligen Auswertung dar. Die statistische Auswertung der qRT-PCR-Werte erfolgt mittels der zweiseitigen Varianzanalyse (ANOVA) bezogen auf die jeweilige WT-Gruppe ($p < 0,001$ ***, $p < 0,01$ **, $p < 0,05$ *).

Die Expression der DUSP1 ist in Diagramm A dargestellt. Es besteht kein signifikanter Unterschied bei der Expression des Gens zwischen den WT- und den Flot1-KO-Mäusen. Es lassen sich kaum Unterschiede bei der Expression von DUSP1 zwischen den unstimulierten, den mit Insulin stimulierten und den mit EGF stimulierten Proben erkennen.

Bei der Expression von EGR1, welche in Diagramm B dargestellt ist, lässt sich ein signifikanter Unterschied bei der Expression des Gens zwischen WT- und Flot1-KO-Mäusen bei den mit EGF behandelten Proben erkennen, wobei die Expressionsmenge von EGR1 in den Flot1-KO-Mäusen höher ist. Des Weiteren wird EGR1 in den mit EGF behandelten Proben insgesamt in einer größeren Menge exprimiert als in den unstimulierten und den mit Insulin stimulierten Proben, welche in etwa die gleiche Menge an exprimiertem EGR1 aufweisen.

Dass es sich bei der Gruppe neben den WT-Mäusen um Flot1-KO-Mäuse handelt, wird in Diagramm C deutlich, welches die Expression von FLOT1 verdeutlicht. Das Gen wird bei den WT-Mäusen exprimiert, während es bei den Flot1-KO-Mäusen, welche das Gen nicht besitzen, wie erwartet, so gut wie gar nicht exprimiert wird.

FLOT2 wird sowohl in den WT- als auch in den Flot1-KO-Mäusen in etwa in gleichem Maße exprimiert, was aus Diagramm D ersichtlich wird. Auch hier besteht kein signifikanter Unterschied bei der Expression zwischen WT- und Flot1-KO-Mäusen. Auch innerhalb der unstimulierten, mit Insulin und mit EGF stimulierten Proben lassen sich keine großen Unterschiede erkennen.

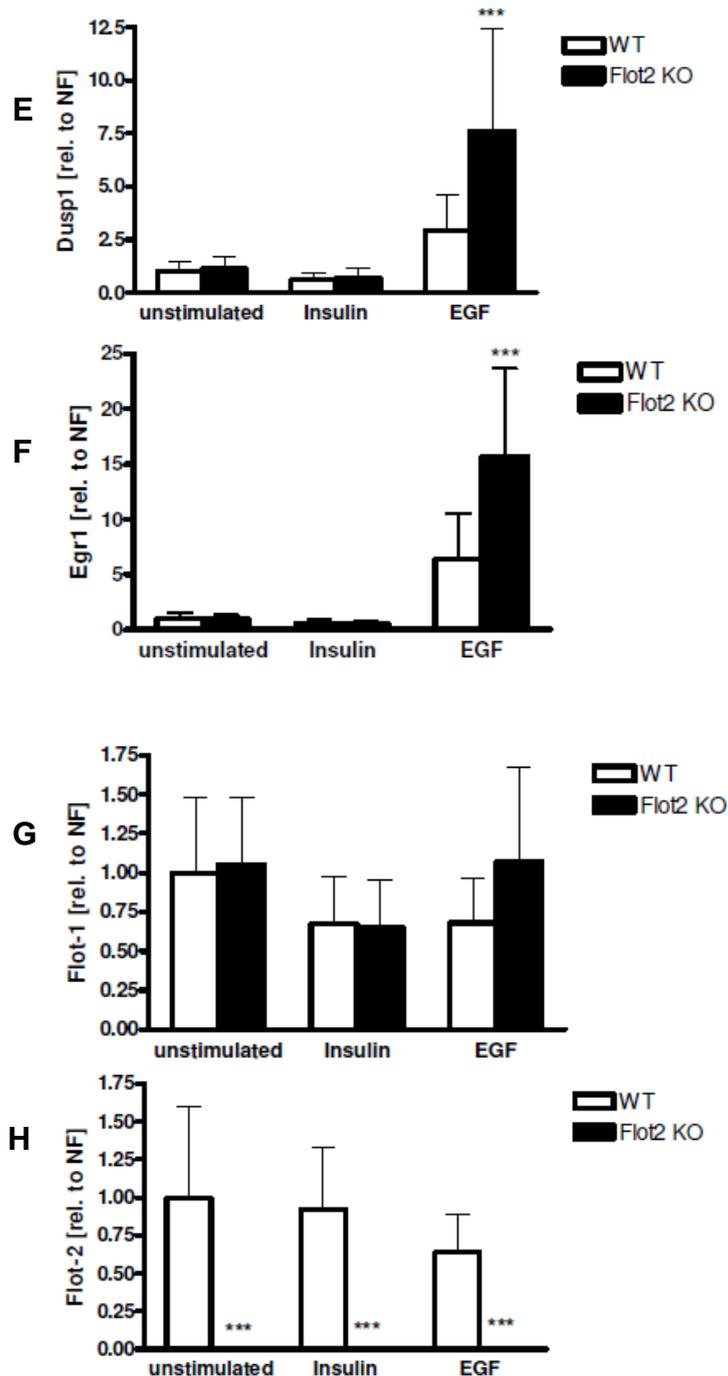


Abbildung 13: Einfluss von Flotillin 2 auf die mRNA-Expression von MAP-Kinase-Weg beeinflussenden Genen. Der Einfluss auf die Expression von DUSP1 (E), EGR1 (F), FLOT1 (G) und FLOT2 (H) wird mithilfe der qRT-PCR-Analyse bestimmt. Die Säulendiagramme (≥ 4 Mäuse pro Gruppe) stellen den Mittelwert \pm die Standardabweichung der jeweiligen Auswertung dar. Die statistische Auswertung der qRT-PCR-Werte erfolgt mittels der zweiseitigen Varianzanalyse (ANOVA) bezogen auf die jeweilige WT-Gruppe ($p < 0,001$ ***, $p < 0,01$ **, $p < 0,05$ *).

Bei der Expression der DUSP1 besteht bei den unstimulierten und den mit Insulin stimulierten Proben kein signifikanter Unterschied zwischen WT- und Flot2-KO-Mäusen, wie in Diagramm E ersichtlich ist. Weiterhin ist die Expression in jenen Proben geringer als die in den mit EGF behandelten Proben. Hier liegt zudem ein hoch signifikanter Unterschied bei der Expression des DUSP1 zwischen WT- und Flot2-KO-Mäusen vor. Letztere weisen eine sehr viel höhere Expressionsrate des Gens auf als die WT-Mäuse.

Das EGR1 wird, wie Diagramm F zeigt, ebenfalls wie die DUSP1 in den unstimulierten und den mit Insulin stimulierten Proben in sehr viel geringerer Menge exprimiert als in den mit EGF behandelten Proben. Weiterhin liegt in jenen Proben kein signifikanter Unterschied zwischen WT- und Flot2-KO-Mäusen vor, während die mit EGF behandelten Proben einen hoch signifikanten Unterschied bei der Expression des EGR1 zwischen WT- und Flot2-KO-Mäusen aufweisen.

Diagramm G verdeutlicht die Expression von FLOT1. Obwohl die mit EGF stimulierten Proben der Flot2-KO-Mäuse tendenziell eine höhere Expression von FLOT1 als die WT-Mäuse aufweisen, besteht weder hier, noch in den unstimulierten und den mit Insulin behandelten Proben ein signifikanter Unterschied bei der Expression des FLOT1 zwischen WT- und Flot2-KO-Mäusen.

Dass es sich bei den KO-Mäusen um Flot2-KO-Mäuse handelt, wird in Diagramm H ersichtlich. Während das FLOT2 in den WT-Mäusen aller Proben in etwa in gleicher Menge exprimiert wird, lässt sich, wie erwartet, keine Expression von FLOT2 in sämtlichen Proben der Flot2-KO-Mäuse erkennen. Hier besteht ein hoch signifikanter Unterschied bei der Expression des Gens zwischen allen Proben der WT- und Flot2-KO-Mäuse.

Insgesamt betrachtet lässt sich auch bei den MAP-Kinase-Weg beeinflussenden Genen kein deutlicher Einfluss von fehlendem Flotillin 1 oder 2 auf die unstimulierten und mit Insulin stimulierten Proben erkennen. Hingegen ist deren Einfluss auf die Expression MAP-Kinase-Weg beeinflussender Gene bei den oben aufgeführten Diagrammen anhand der mit EGF behandelten Proben deutlich zu erkennen. So ist die Expression von DUSP1 und EGR1 bei den mit EGF behandelten Proben der KO-Mäuse erhöht, wobei die Expression vor allem bei den Flot2-KO-Mäusen im Vergleich zu den jeweiligen WT-Mäusen hoch signifikant erhöht ist, was den negativ regulierenden Einfluss von Flot2 auf den MAP-Kinase-Weg bestätigt.

4.2.4 Einfluss von Flotillin 1 und 2 auf apoptotische Signalwege

Als Zielgen, dessen Genprodukt an apoptotischen Signalwegen beteiligt ist, wird in der vorliegenden Arbeit lediglich das Gen PUMA eingesetzt.

Bei dem ***p53-upregulated modulator of apoptosis*** (PUMA), auch als Bcl2-binding component 3 (BBC3) bekannt, handelt es sich um einen Mediator sowohl der p53-abhängigen als auch der p53-unabhängigen Apoptose, der durch eine Vielzahl an Stimuli, wie beispielsweise durch p53 und Egr1, induziert werden kann. Puma ist ein proapoptotisches Protein, welches Apoptosesignale hauptsächlich an Mitochondrien übermittelt. Hier nimmt es indirekt Einfluss auf Proteine der Bcl2-Familie, dem Bax und/oder Bak, indem er deren Hemmung durch antiapoptotische Proteine der Bcl2-Familie aufhebt. Puma ist in der Lage, alle bekannten antiapoptotischen Proteine der Bcl2-Familie zu antagonisieren, indem es direkt an sie bindet. Dies führt zu einer Dysfunktion der Mitochondrien und zu einer Aktivierung der Caspasen, sodass der Zelltod eingeleitet wird¹²⁴.

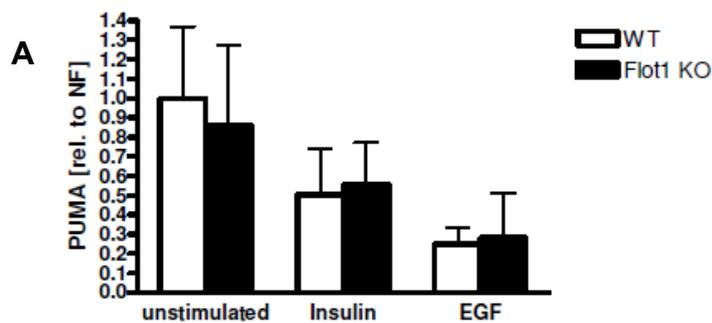


Abbildung 14: Einfluss von Flotillin 1 auf die mRNA-Expression von apoptotischen Signalwegen beeinflussenden Genen. Der Einfluss auf die Expression von PUMA (A) wird mithilfe der qRT-PCR-Analyse bestimmt. Die Säulendiagramme (≥ 5 Mäuse pro Gruppe) stellen den Mittelwert \pm die Standardabweichung der jeweiligen Auswertung dar. Die statistische Auswertung der qRT-PCR-Werte erfolgt mittels der zweiseitigen Varianzanalyse (ANOVA) bezogen auf die jeweilige WT-Gruppe ($p < 0,001$ ***, $p < 0,01$ **, $p < 0,05$ *).

Die Expression des PUMA ist in Diagramm A dargestellt. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen WT- und Flot1-KO-Mäusen, allerdings lässt sich tendenziell eine Abstufung hinsichtlich der Menge des exprimierten Gens von der Probe der unstimulierten Skelettmuskelzellen über die mit Insulin stimulierten hin zu den mit EGF stimulierten Zellen erkennen.

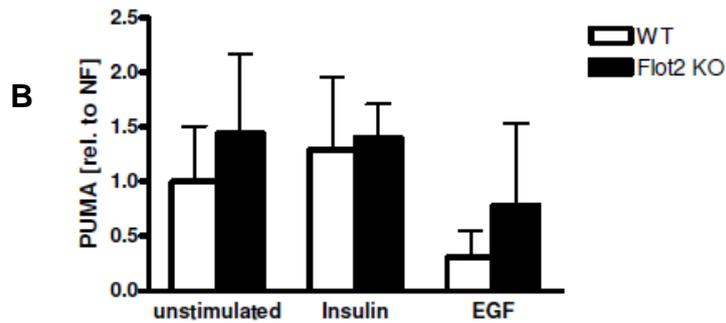


Abbildung 15: Einfluss von Flotillin 2 auf die mRNA-Expression von apoptotischen Signalwegen beeinflussenden Genen. Der Einfluss auf die Expression von PUMA (B) wird mithilfe der qRT-PCR-Analyse bestimmt. Die Säulendiagramme (≥ 4 Mäuse pro Gruppe) stellen den Mittelwert \pm die Standardabweichung der jeweiligen Auswertung dar. Die statistische Auswertung der qRT-PCR-Werte erfolgt mittels der zweiseitigen Varianzanalyse (ANOVA) bezogen auf die jeweilige WT-Gruppe ($p < 0,001$ ***, $p < 0,01$ **, $p < 0,05$ *).

Diagramm B zeigt, dass die Expression des PUMA in den mit EGF behandelten Proben am geringsten ist. Die Proben der Flot2-KO-Mäuse weisen hier tendenziell eine höhere Expression auf als die der WT-Mäuse. Jedoch liegt wie bei den unstimulierten und den mit Insulin behandelten Proben kein signifikanter Unterschied bei der Expression zwischen WT- und Flot2-KO-Mäusen vor. Es ist im Gegensatz zu Diagramm A kaum ein Unterschied bei der Expression des PUMA zwischen den unstimulierten und den mit Insulin stimulierten Proben zu erkennen.

Infolgedessen scheint das Fehlen von Flotillin 1 oder 2 auch keinen Einfluss auf insulinabhängige Gene apoptotischer Signalwege zu nehmen, da kein signifikanter Unterschied bei der Expression des PUMA zwischen den unstimulierten, den mit Insulin stimulierten und den mit EGF stimulierten Proben der KO- und WT-Mäuse besteht. Wie beim Großteil aller untersuchter Gene weisen auch hier die mit EGF behandelten Proben der KO-Mäuse bezüglich der WT-Mäuse tendenziell eine höhere Expressionsrate auf. Dass sich in den mit EGF behandelten Proben die geringste Expressionsrate des PUMA erkennen lässt, ist auf die fehlende Aktivierung von Egr1, welches wiederum zu einer vermehrten Expression von PUMA führt, zurückzuführen. Die Expression von EGR1 wird durch Insulin induziert, daher weisen die mit Insulin behandelten Proben tendenziell eine höhere Expressionsrate des PUMA auf als die mit EGF behandelten Proben.

Die teilweise hohen Standardabweichungen bei den in den Diagrammen aufgeführten Ergebnissen lassen sich durch die Tier zu Tier Schwankungen erklären, da in den dargestellten Diagrammen der Mittelwert der ausgewerteten qRT-PCR-Ergebnisse aller Tiere dargestellt ist.

Zur Qualitätskontrolle wurden neben den qRT-PCRs auch Gelelektrophoresen durchgeführt. Diese dienen als Vergleichskontrolle, um aufzuzeigen, dass alle qRT-

PCRs auch zu einem Endprodukt führten. Ein Beispiel für das Ergebnis einer solchen Gelelektrophorese ist in Abbildung 16 aufgeführt.

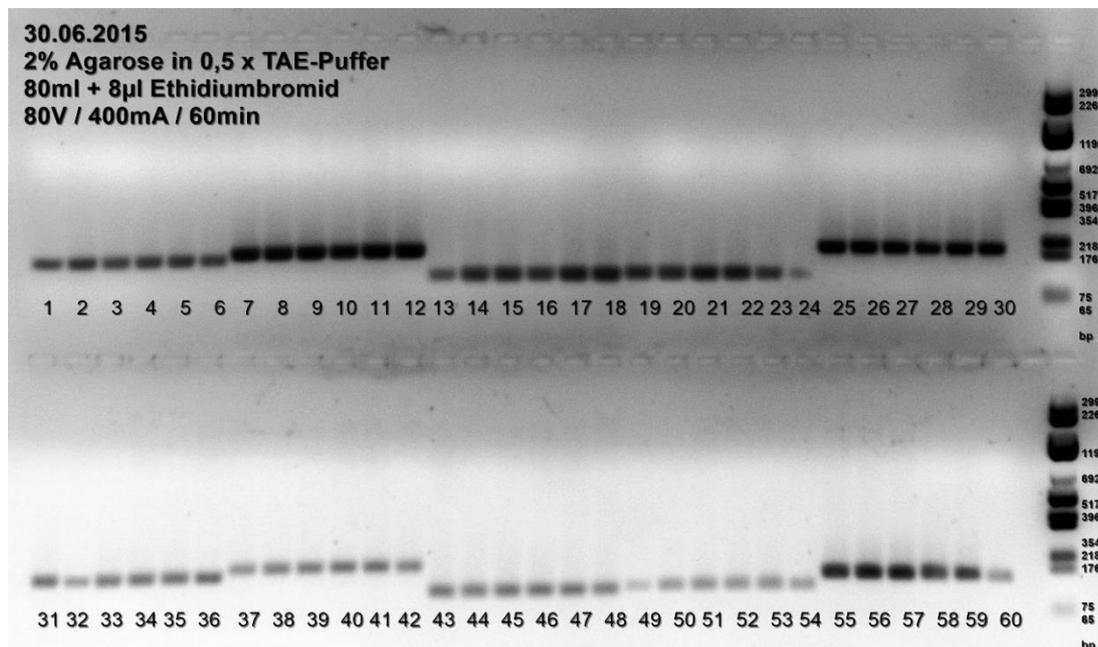


Abbildung 16: Gelelektrophorese. Das Gel wird aus 80 ml Agarose (2%), gelöst in 0,5 x TAE-Puffer und mit 8µl Ethidiumbromid versetzt, gegossen. Nach Zugabe der DNA-Proben und eines Farbmärkers sowie eines DNA-Größenmarkers (letzte Spalte rechts) wird das Gel bei 80 V und 400 mA für etwa 45-60 Minuten laufen gelassen. Jeweils 6 Spalten stehen für ein Gen, wobei sich in den ersteren 3 die unstimulierten, mit Insulin stimulierten und mit EGF stimulierten DNA-Proben der WT-Mäuse und in den letzteren 3 die unstimulierten, mit Insulin stimulierten und mit EGF stimulierten DNA-Proben der KO-Mäuse befinden. Bei dem vorliegenden Gel sind die Produkte der Gene RPL13a (1-6), YWAHZ (7-12), B2M (13-18), PFKM (19-24), DUSP1 (25-30), FLOT2 (31-36), PUMA (37-42), ACCA (43-48), HK2 (49-54) und SREBP1c (55-60) von WT- und Flot1-KO-Mäusen dargestellt.

Auch für alle anderen untersuchten Gene konnte bestätigt werden, dass die einzelnen qRT-PCRs ein spezifisches Produkt ergeben haben.

Die Auswertung der qRT-PCR -Ergebnisse erfolgte erneut, nachdem die Proben nach weiblichem und männlichen Geschlecht getrennt wurden, doch sie führte zu keinen neuen Ergebnissen und ist daher in der vorliegenden Arbeit nicht aufgeführt.

4.3 Einfluss von Flotillinen auf den Triglyzeridgehalt im Blutserum

Die Signalübertragung durch Insulin löst in der Zelle verschiedene Prozesse aus. Dabei kommt es zur Translokation von Glukosetransportern aus intrazellulären Vesikeln in die Zellmembran, damit Glukose in die Zelle aufgenommen werden kann. Intrazellulär kann nun die Verstoffwechslung der Glukose erfolgen. Hierzu laufen nicht nur vermehrt Glykolyse, Citratzyklus und Atmungskette ab, sondern es kommt auch zur Steigerung

der Glykogensynthese in Leber und Muskel und zu einer vermehrten Triglyzeridsynthese im Fettgewebe und Muskel. Weiterhin kommt es zu einer Hemmung der hepatischen Glukoneogenese sowie zur Hemmung der Glykogenolyse und Proteolyse.¹²⁵

Dass Flotilline einen Einfluss auf den Insulin-Signaltransduktionsweg haben, ist bekannt. Um zu untersuchen, inwieweit ihre Anwesenheit Einfluss auf die Triglyzeridsynthese des Organismus nimmt, wurde der Triglyzeridgehalt im Blutserum von WT-Mäusen mit dem im Blut von Flot1- bzw. Flot2-KO-Mäusen verglichen.

4.3.1 Einfluss von Flotillin 1

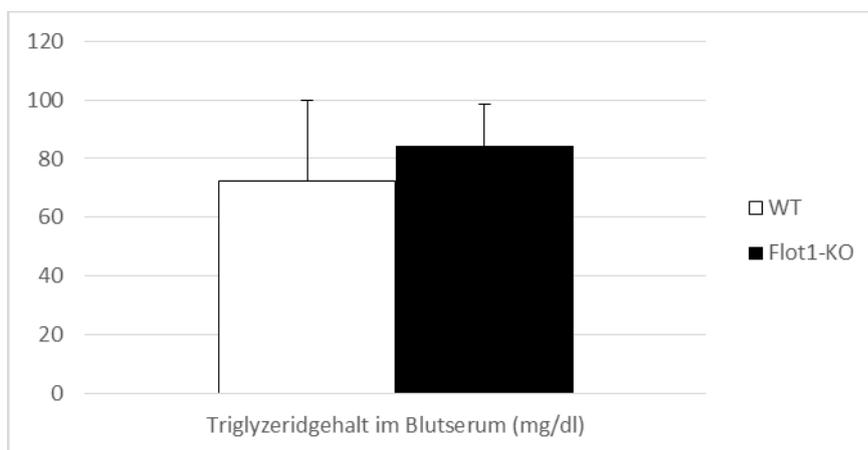


Abbildung 17: Einfluss von Flotillin 1 auf den Triglyzeridgehalt im Blutserum der Versuchstiere. Die Bestimmung des Triglyzeridgehaltes im Blutserum der WT- und Flot1-KO-Mäuse erfolgte nach der Triglyzerid-Methode (TRIG) gemäß der Standardarbeitsanweisung des Gießener Instituts für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie in der Abteilung Molekulare Diagnostik. Die Säulendiagramme (≥ 5 Tiere pro Gruppe) stellen den Mittelwert \pm die Standardabweichung aller gemessener Werte in mg/dl dar. Die statistische Auswertung der Werte erfolgt mittels des zweiseitigen ungepaarten T-Tests bezogen auf die jeweilige WT-Gruppe ($p < 0,001$ ***, $p < 0,01$ **, $p < 0,05$ *).

Die Flot1-KO-Mäuse weisen tendenziell einen höheren durchschnittlichen Triglyzeridgehalt im Blutserum auf als die WT-Mäusen, wobei der Unterschied jedoch nicht signifikant ist.

4.3.2 Einfluss von Flotillin 2

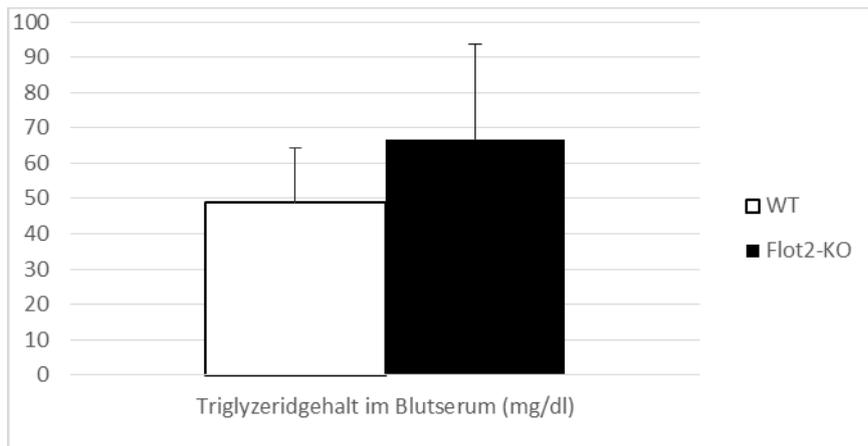


Abbildung 18: Einfluss von Flotillin 2 auf den Triglyzeridgehalt im Blutserum der Versuchstiere. Die Bestimmung des Triglyzeridgehaltes im Blutserum der WT- und Flot2-KO-Mäuse erfolgte nach der Triglyzerid-Methode (TRIG) gemäß der Standardarbeitsanweisung des Gießener Instituts für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie in der Abteilung Molekulare Diagnostik. Die Säulendiagramme (≥ 6 Tiere pro Gruppe) stellen den Mittelwert \pm die Standardabweichung aller gemessener Werte in mg/dl dar. Die statistische Auswertung der Werte erfolgt mittels des zweiseitigen ungepaarten T-Tests bezogen auf die jeweilige WT-Gruppe ($p < 0,001$ ***, $p < 0,01$ **, $p < 0,05$ *).

Auch bei dem durchschnittlichen Triglyzeridgehalt zwischen dem Blutserum der Flot2-KO-Mäuse und dem der WT-Mäuse besteht kein signifikanter Unterschied, wobei hier die Flot2-KO-Mäuse ebenfalls einen tendenziell höheren Triglyzeridgehalt aufweisen. Dass der Triglyzeridgehalt im Blutserum der bei diesem Vergleich verwendeten WT-Mäusen geringer ist als bei den WT-Mäusen, die zum Vergleich mit den Flot1-KO-Mäusen dienen, lässt sich dadurch erklären, dass die Flot1- und Flot2-KO-Mäuse sowie deren jeweilige Wildtyp-Wurfgeschwister aus unterschiedlichen Tierhaltungen stammen und somit auch deren Futterzusammensetzung geringfügige Unterschiede aufwies.

5. Diskussion

Insulin nimmt die Schlüsselrolle in der Glukose-Homöostase des Körpers ein. Es sorgt für die Aufrechterhaltung des Plasma-Glukosegehaltes innerhalb eines physiologischen Bereiches, indem es die hepatische Glukose-Abgabe inhibiert und die Aufnahme von Glukose in Skelettmuskel und Fettgewebe induziert. Eine Störung der Glukose-Homöostase, wie beispielweise durch eine Insulinresistenz oder durch die Zerstörung von pankreatischen insulinproduzierenden β -Zellen, führt verheerende Konsequenzen für den Organismus mit sich, welche unbehandelt den Tod zur Folge haben können. Daher beschäftigen sich schon seit vielen Jahren Forscher mit den intrazellulären Molekülen und Signalwegen, die mit Insulin und der Glukose-Homöostase im Zusammenhang stehen. Trotzdem bestehen bis heute noch viele Ungewissheiten bezüglich der genauen molekularen Mechanismen, die innerhalb des Insulin-Signaltransduktionsweges ablaufen und zur Aufnahme von Glukose in Skelettmuskel- und Fettzellen führen.

Es steht fest, dass die Aktivierung der PI3-Kinase notwendig ist für den insulinabhängigen Transport von Glukose in Adipozyten, allerdings scheint diese alleine nicht auszureichen¹²⁶. Neben dem klassischen PI3-Kinase-abhängigen Insulin-Signaltransduktionsweg zeigten Baumann et al. im Jahre 2000 anhand von Zellkulturen, dass es neben dem klassischen PI3-Kinase-abhängigen Insulin-Signaltransduktionsweg einen weiteren alternativen CAP-assoziierten Insulin-Signaltransduktionsweg gibt. Bei diesem wird der insulinabhängige Glukosetransport durch die Bildung eines Flotillin-CAP-Cbl-Komplexes erzielt. Leider wurden hierzu keine weiteren Untersuchungen durchgeführt, sodass bisher keine Aussage über den Ablauf des alternativen Insulin-Signaltransduktionsweges im physiologischen Tiermodell getroffen werden konnte.

Eine weitere Schwierigkeit stellen die weit verbreiteten Signalmoleküle dar, die an der Transduktion des Insulinsignals teilnehmen, da sie zwar auch an vielen anderen Signalwegen, ausgelöst an anderen Rezeptoren, beteiligt sind, aber bei keinem dieser anderen Signalwege metabolische Effekte in dem Maße auslösen, wie sie in Folge der Insulin-Signaltransduktion entstehen¹²⁷. Eine Erklärung hierfür stellt die Überlegung dar, dass spezielle Gerüst-, Anker und Adapterproteine dafür sorgen, dass die weit verbreiteten Signalmoleküle beispielsweise durch Protein-Protein-Interaktionen in spezielle Zellkompartimente geführt werden, in denen sie andere Wirkungen erzielen als innerhalb von Signaltransduktionswegen, die nicht vom Insulinrezeptor ausgehen¹²⁸. Ein Beispiel für solch ein spezielles Zellkompartiment stellen die *membrane rafts* dar, bei welchen es sich um eine Phase der Plasmamembran handelt, die vor allem mit Cholesterin und gesättigten Fettsäuren wie Sphingolipiden und Glykosphingolipiden

angereichert ist, während Phospholipide weitestgehend fehlen^{21,129}. Nach einem Modell von Simons und Ikonen sind diese dynamischen *membrane rafts* in der Lage, bestimmte Moleküle, unter anderem auch Signalmoleküle, zu integrieren oder auszuschließen²¹. Aufgrund dieser Fähigkeit der *membrane rafts* Proteine zu sortieren, scheinen sie als Ausgangspunkt an vielen Zellfunktionen beteiligt zu sein.

Aufgrund der Entdeckungen von Baumann et al. und Chiang et al. kann davon ausgegangen werden, dass es zumindest in Adipozyten neben dem klassischen PI3-Kinase-abhängigen Insulin-Signaltransduktionsweg auch noch einen alternativen PI3-Kinase-unabhängigen Insulin-Signaltransduktionsweg gibt, dessen Ablauf jedoch abhängig ist von der Lokalisation bestimmter Signalmoleküle in *membrane rafts*, zu welchen auch die Flotilline zählen^{5,7}.

5.1 Flotilline und deren Einfluss auf den Insulin-Signaltransduktionsweg

Die Beteiligung von Flotillinen am Insulin-Signaltransduktionsweg in Adipozyten wurde von Baumann et al. postuliert. Die für die vorliegende Arbeit durchgeführten Untersuchungen am Tiermodell zeigen jedoch, dass sowohl Flotillin 1 als auch Flotillin 2 in Skelettmuskelzellen gesunder adulter Versuchstiere allgemein betrachtet nur wenig bis keinen Einfluss auf die Expression insulinabhängiger Gene nehmen.

Ein Grund dafür könnte sein, dass im lebenden Organismus einer der vielen komplexen Kompensationsmechanismen zum Einsatz kommen und den Mangel an Flotillin 1 bzw. 2 beispielsweise durch die Hochregulation eines anderen Moleküls ausgleichen, sodass letztlich kein Effekt aufgrund des Fehlens von Flotillin 1 oder 2 zu erkennen ist. Denkbar wäre auch, dass das noch vorhandene Flotillin für den Ablauf des Signaltransduktionsweges ausreicht und somit das Fehlen des anderen Flotillins kompensiert. Um diese Hypothese zu belegen, müssten Untersuchungen an Doppel-KO-Mäusen erfolgen, bei welchen sowohl das Flotillin 1 als auch das Flotillin 2 inaktiviert wurden. Es ist hingegen möglich, dass das Fehlen dieser Proteine in Zellkulturen zu anderen Ergebnissen führt, da die Kompensationsmechanismen, welche im lebenden Organismus greifen, in diesen nicht zum Einsatz kommen könnten. Hierzu müssten Untersuchungen an Kulturen von Skelettmuskelzellen erfolgen.

Außerdem wurde in der vorliegenden Arbeit nur die Expression insulinabhängiger Gene in Skelettmuskelzellen untersucht, da die aus den Leberzellen isolierten RNA-Mengen zur Durchführung der qRT-PCRs zu gering waren, um aussagekräftige Werte erzielen zu können. Es ist möglich, dass Untersuchungen in Leber- und vor allem in Fettzellen

zu anderen Ergebnissen führen, da die Entdeckung des alternativen Insulin-Signaltransduktionsweges durch Baumann et al. tatsächlich bei Untersuchungen von Zellkulturen von Adipozyten erzielt wurden⁵.

Zum anderen kamen bei den Untersuchungen nur Skelettmuskelzellen gesunder adulter Tiere zum Einsatz, die normales Futter bekamen. Es ist unklar, ob Flotilline bei der Insulin-Signaltransduktion im Krankheitsfall genauso wenig Einfluss haben wie im gesunden Fall. Um dies zu untersuchen, könnte man die Expression derselben Gene in einem anderen Tiermodell, welches beispielsweise diabetische KO- und WT-Tiere umfasst, beobachten, um dann einen Vergleich zu der Expression der Gene in den gesunden adulten Tieren zu ziehen und eventuell Unterschiede entdecken zu können.

5.2 Flotilline und deren Einfluss auf den EGF-Signaltransduktionsweg

Eine Stimulation der Zelle mit EGF ruft verschiedene Veränderungen der Flotilline hervor. Dazu zählen die Vergrößerung der Flotillin-Heterooligomere⁴³ und die Phosphorylierung von Flotillin 2 an seinen Tyrosinresten durch die Kinasen der Src-Familie³⁵. Des Weiteren führt die EGF-Stimulation zu einer Endozytose von Flotillinen aus der Plasmamembran, die in der Ausbildung von späten Endosomen resultiert. Obwohl die Anwesenheit von Flotillinen für die Endozytose des EGF-Rezeptors nicht obligat ist⁴⁸, ist eine verminderte Endozytose des EGF-Rezeptors in Zellen mit depletiertem Flotillin 2, welche eine Überexpression von EGF-Rezeptoren zeigen, beschrieben¹³⁰.

Die Untersuchung von Zellen mit depletiertem Flotillin 1, in welchen sowohl die EGF-induzierte Phosphorylierung des EGF-Rezeptors als auch die Aktivierung von ERKs vermindert ist, führt zu der Annahme, dass der EGF-Signaltransduktionsweg nur dann in vollem Maße ablaufen kann, wenn Flotillin 1 anwesend ist. Dieses bildet einen konstitutiven Komplex mit dem EGF-Rezeptor und unterstützt diesen bei seiner Aktivierung. Es ist bekannt, dass das Flotillin 1 mit mehreren Komponenten des MAP-Kinase-Wegs direkt interagiert, wobei es sich um die Komplexbildung des Flotillin 1 mit cRAF, MEK1, ERKs und dem Kinase-Suppressor des Ras handelt.⁴⁸ Dies deutet darauf hin, dass Flotillin 1 als ein MAP-Kinase-Gerüstprotein fungiert und somit auch bei dem Ablauf des EGF-Signaltransduktionsweges, welcher den MAP-Kinase-Weg beinhaltet, beteiligt ist^{56,75}. Diese Tatsache wird in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nicht ersichtlich, da alle mit EGF behandelten Proben der Flot1-KO-Mäuse tendenziell eine

höhere Expressionsmenge der MAP-Kinase abhängigen Gene aufweisen als die der WT-Mäuse, wobei es sich bei EGR1 um einen signifikanten Unterschied handelt.

Untersuchungen haben gezeigt, dass das Fehlen von Flotillin 2 hingegen keinen negativen Einfluss auf den Ablauf des EGF-Signaltransduktionsweges zu haben scheint.⁴⁴ Im Gegenteil sogar - während Flotillin 1 den MAP-Kinase-Weg positiv beeinflusst, scheint Flotillin 2 einen negativ regulierenden Effekt auf jenen zu haben, was bei Untersuchungen von Flotillin 2 depletierten Zellen zum Vorschein kam. Diese wiesen eine erhöhte Menge an phosphorylierten cRAF-Kinasen, MEKs und ERKs auf, was auf eine Überfunktion des MAP-Kinase-Wegs hindeutet. Weiterhin wiesen diese Zellen auch eine vermehrte Phosphorylierung von Substraten der MAP-Kinase und eine erhöhte Proliferationsrate auf.⁴⁹ Auch kam es in diesen Zellen zu einer vermehrten Expression der Transkriptionsfaktoren SRF, Egr1 und Fos, welche typische Ziele des MAP-Kinase-Weges sind und zu den positiven Regulatoren von Zellproliferation und -überleben gehören^{131,132}. Der beschriebene negativ regulierende Effekt des Flotillin 2 auf den MAP-Kinase-Weg ist auch bei den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ersichtlich. Hierbei weisen die mit EGF behandelten Proben der Flot2-KO-Mäuse tendenziell eine vermehrte Expression der MAP-Kinase abhängigen Gene auf, wobei es sich bei DUSP1 und EGR1 um signifikante Unterschiede handelt. Dass auch die Expression von DUSP1 und DUSP5, welche als MAP-Kinase-Phosphatasen zu den negativen Regulatoren des MAP-Kinase-Weges zählen, in den Flotillin 2 depletierten Zellen vermehrt ist, lässt sich bei der vorliegenden Arbeit ebenfalls bestätigen, da in den mit EGF behandelten Proben der Flot2-KO-Mäuse eine signifikant vermehrte Expression von DUSP1 zu finden ist⁴⁹. Die vermehrte Expression des EGR1 führt weiterhin zu einer erhöhten Aktivität des Tumorsuppressorgens p53, bei welchem es sich um ein Zielgen des Egr1 handelt. Daher wird die Funktion von Flotillinen auch im Zusammenhang mit dem Überleben der Zelle und dem Zelltod diskutiert.

Nicht nur beeinflussen Flotilline den EGF-Signaltransduktionsweg, sie selbst scheinen ebenfalls einer Regulation durch verschiedene Stimuli, zu denen EGF, PMA, FCS und FGF zählen, die im Signalweg den ERKs vorgeschaltet sind, zu unterliegen. Die genannten Stimuli führen zu einer erhöhten Promotor-Aktivität der Flotilline, welche besonders bei Flotillin 1 signifikant ist.⁹⁸ Verantwortlich für die resultierende positive Regulation der Flotillin-Expression scheinen die Transkriptionsfaktoren Egr1 und SRF zu sein, da Flotilline in ihrer Promotorregion über Bindungsstellen für Egr1 und das *serum response element* (SRE) verfügen^{98,133}. Da Flotilline außerdem funktionelle Bindungsstellen für den RXR und seine Bindungspartner beherbergen, ist ihre Expression auch bei Behandlung mit Retinsäure oder bei einer Überexpression des RXRs und seiner Bindungspartner RAR α und Ppar γ hochreguliert⁹⁸.

Zwar sind die Effekte von Flotillin 1 und 2 auf den MAP-Kinase-Weg gegenläufig, allerdings ist nicht sicher, ob die hervorgerufenen Effekte lediglich auf das Fehlen des jeweiligen Flotillins beruhen. Es ist auch möglich, dass das in den Knock-Down-Zellen verbliebene Flotillin, welches nicht mehr in der Lage ist, Heterooligomere zu bilden und somit nur noch Homooligomere bilden kann, verantwortlich ist für den hervorgerufenen Effekt. Um dies herauszufinden, sollte eine Untersuchung von Zellen, welchen sowohl Flotillin 1 als auch Flotillin 2 fehlt, erfolgen.¹

Während die Frage nach dem Einfluss von Flotillin 1 und 2 auf den Insulin-Signaltransduktionsweg nicht sicher beantwortet werden kann, wird der Einfluss von Flotillin 2 auf den EGF-Signaltransduktionsweg in der vorliegenden Arbeit bestätigt. Vor allem die Untersuchungen der MAP-Kinase-Weg beeinflussenden Gene zeigen, dass Flotillin 2 einen negativ regulierenden Einfluss auf den MAP-Kinase-Weg hat, da die Expression von DUSP1 und EGR1 bei den mit EGF behandelten Proben der Flot2-KO-Mäuse im Vergleich zu den WT-Mäusen hoch signifikant erhöht ist.

5.3 Flotilline und deren Einfluss auf den Triglyzeridgehalt im

Blutserum

Eine der vielen aus Diabetes Typ 2 resultierenden Folgeerkrankungen ist die Dyslipoproteinämie, bei welcher ein Missverhältnis der Lipoproteinfraktionen im Blutserum besteht. Hierbei lassen sich vor allem erhöhte Konzentrationen von Triglyzeriden und Cholesterinen finden, welche auf die verringerte hepatische Aussortierung von cholesterin- und triglyzeridreichen Lipoproteinen (c-TRLs) zurückzuführen ist. Es ist bekannt, dass Flotillin 1 an der Syndecan-1-vermittelten Endozytose von c-TRLs beteiligt ist und diese positiv beeinflusst.¹³⁴

Die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit zeigen zwar eine Tendenz zu einer durchschnittlich höheren Menge an Triglyzeriden im Blutserum sowohl der Flot1- als auch der Flot2-KO-Mäuse, was zu der Annahme führt, dass Flotilline eine Rolle bei der Regulation des Triglyzeridgehaltes im Organismus zu spielen scheinen. Da es sich allerdings nicht um signifikante Ergebnisse handelt und die Anzahl der eingesetzten Versuchstiere in der vorliegenden Arbeit gering ist, bedarf es weiteren Untersuchungen mit standardisierten Voraussetzungen. Es sollte sich um die gleiche Anzahl von KO- und WT-Mäusen handeln, die beide an einem Standort mit gleichen Lebens- und Futterbedingungen gezüchtet werden. Hierbei könnte man beispielsweise den Triglyzeridgehalt im Blutserum von Mäusen mit normalem Futter mit dem von Mäusen, welche fettreiches Futter erhalten, vergleichen. Außerdem sollte es sich um eine größere Stichprobenmenge handeln, um repräsentative Ergebnisse erhalten zu können.

5.4 Flotilline und Diabetes

Diabetes Typ 2 ist eine der weltweit am meisten verbreiteten chronischen Stoffwechselkrankheiten. Bei dieser Krankheit kommt es aufgrund einer Insulinresistenz zu erhöhten Blutzuckerwerten, welche langfristig multiple Folgekrankheiten wie Nierenschwäche, Mikro- und Makroangiopathien, Retinopathien, Schlaganfälle, Herzinfarkte und Neuropathien mit sich bringen. An der Entstehung einer Insulinresistenz sind viele Faktoren beteiligt, zu welchen u.a. genetische Dispositionen, Adipositas, Bewegungsmangel und erhöhter Blutdruck zählen.

Die Pathophysiologie der Insulinresistenz umfasst ein komplexes Netzwerksystem von Signaltransduktionswegen, welche vom Insulinrezeptor ausgehen. Während bei einer Insulinresistenz eine verminderte Anzahl und Aktivität von Insulinrezeptoren, eine verminderte Konzentration und Phosphorylierungsrate der IRS-1 und -2 sowie eine verringerte Translokation der Glukosetransporter zu finden sind, läuft der durch Insulin aktivierte MAP-Kinase-Weg bei Diabetes Typ 2 regelrecht ab^{126,135}. Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass Skelettmuskelzellen bei Diabetes 2 eine erhöhte Expressionsmenge von Flotillinen aufweisen⁷⁴. Da diese Tatsache ebenfalls eine Beteiligung von Flotillinen am Insulin-Signaltransduktionsweg impliziert, sind weitere Untersuchungen zur Frage, inwieweit Flotilline genau Einfluss auf den Insulin-Signaltransduktionsweg nehmen unabdingbar, um in Zukunft womöglich einen weiteren Therapieangriffspunkt zur Behandlung von Diabetes Typ 2 zu erhalten.

5.5 Ausblick

Da das Insulin nicht nur den alternativen Signaltransduktionsweg in Gang setzt, an welchem Flotillin 1 beteiligt ist, sondern auch den klassischen Signaltransduktionsweg, an dem eine Beteiligung von Flotillinen bisher nicht bekannt ist, ist es schwierig den allgemeinen Einfluss von Flotillinen auf den Insulin-Signaltransduktionsweg zu beschreiben, da parallel immer auch der Flotillin-unabhängige klassische Signaltransduktionsweg abläuft. Um den genauen Einfluss von Flotillinen auf den Insulin-Signaltransduktionsweg untersuchen zu können, müsste der klassische Weg gehemmt werden. Eine Möglichkeit dazu wäre die Hemmung der PI3-Kinase. Dies ist bisher allerdings nur in Zellkulturen möglich und könnte nicht in einem physiologischen Modell durchgeführt werden.

Weiterhin könnte die Untersuchung von Doppel-KO-Mäusen bzw. -Zellen, bei welchen beide Flotilline inaktiviert wurden, zu neuen Ergebnissen führen, da in einem Flotillin-freien Modell das eine fehlende Flotillin die Funktion des anderen nicht kompensieren könnte. Somit wäre es möglich, weiterführende Informationen zum Einfluss von Flotillinen auf den Insulin-Signaltransduktionsweg zu erhalten.

Hinsichtlich der Methodik könnten ebenfalls Variationen vorgenommen werden, um aussagekräftigere Ergebnisse erzielen zu können. Beispielsweise könnte die Insulinbehandlungsdauer der Zellen variiert werden, da der Insulineffekt bei den meisten Zielgenen nicht bzw. kaum zu sehen war, obwohl er eindeutig bekannt ist.

Bei der Auswahl der Proben könnte man bei zukünftigen Untersuchungen auf die mit EGF stimulierten Proben verzichten, da der Einfluss von Flotillinen auf den EGF-Signaltransduktionsweg ausreichend beschrieben ist und auch in der vorliegenden Arbeit teilweise bestätigt wurde. Stattdessen könnte man neben den unstimulierten Proben verschiedene mit Insulin stimulierte Proben untersuchen, welche sich in der Konzentration und Dauer der Insulinstimulation unterscheiden.

Zudem könnte man andere Referenzgene heranziehen, um den Normalisierungsfaktor zu berechnen. Hierbei ist vor allem ein Austausch des YWAHZ anzustreben, da ein Zusammenhang dessen Genprodukts mit der Insulinempfindlichkeit bekannt ist. Falls es sogar direkt mit Insulin-Signalproteinen interagieren sollte, was bisher noch nicht bekannt ist, würde der Einsatz von YWAHZ als Referenzgen zur Verfälschung der Ergebnisse führen, da es sich bei Referenzgenen um Haushaltsgene handeln sollte, welche möglichst keinen Einfluss auf die zu untersuchenden Signaltransduktionswege nehmen.

Um repräsentativere Ergebnisse zu erhalten, könnte man weiterhin die Zahl der untersuchten Mäuse erhöhen und standardisieren, indem man nur Mäuse eines Geschlechtes, in etwa des gleichen Alters und mit den gleichen Zuchtbedingungen verwendet.

Der Untersuchung des Einflusses von Flotillinen auf den Insulin-Signaltransduktionsweg und auf den Triglyzeridgehalt im Blutserum sollte auch in Zukunft Aufmerksamkeit gewidmet werden, um so womöglich weitere Therapieansätze zur Behandlung von Diabetes zu entdecken.

I Zusammenfassung

Flotillin 1 und 2 sind hoch-konservierte Proteine, welche ubiquitär exprimiert werden. Sie sind unter physiologischen Bedingungen innerhalb von *membrane rafts* an der zytosolischen Seite der Plasmamembran fest verbunden und somit an vielen Prozessen wie Signaltransduktionswegen, Membrantransporten und dem Aufbau des Zytoskeletts und von Zell-Zell- bzw. -Matrix-Kontakten beteiligt.

Neben dem klassischen Insulin-Signaltransduktionsweg haben Baumann et al. im Jahr 2000 einen alternativen Insulin-Signaltransduktionsweg beschrieben, dessen Ablauf das Vorhandensein von Flotillin 1 voraussetzt, was auf eine Beteiligung von Flotillinen am Insulin-Signaltransduktionsweg hindeutet. Dass Skelettmuskelzellen bei Diabetes Typ 2 eine erhöhte Expression von Flotillinen aufweisen, impliziert ebenfalls eine Teilnahme dieser am Insulin-Signaltransduktionsweg.

Um zu untersuchen, inwieweit Flotilline Einfluss auf die Expression insulinabhängiger Gene nehmen, wurden in der vorliegenden Arbeit die Genprodukte von Flotillin 1- und Flotillin 2-Knockout (KO)-Mäusen mit denen von Wildtyp (WT)-Mäusen verglichen. Hierzu wurde RNA aus Skelettmuskelzellen von Mäusen isoliert, diese in cDNA umgeschrieben und dann qRT-PCR durchgeführt, um die Expressionsmenge der einzelnen insulinabhängigen Gene zu bestimmen. Weiterhin wurde der Einfluss von Flotillinen auf den EGF-Signaltransduktionsweg und auf die Triglyzeridsynthese untersucht.

Die Untersuchungen ergaben, dass sowohl Flotillin 1 als auch Flotillin 2 in Skelettmuskelzellen gesunder adulter Versuchstiere allgemein betrachtet nur wenig bis keinen Einfluss auf die Expression insulinabhängiger Gene nehmen. Der Einfluss von Flotillinen auf den EGF-Signaltransduktionsweg wurde hingegen eindeutig bestätigt, da vor allem die Untersuchung der MAP-Kinase-abhängigen Gene zeigte, dass Flotillin 2 einen negativ regulierenden Einfluss auf den EGF-Signaltransduktionsweg hat. Weiterhin scheinen Flotilline auch einen negativ regulierenden Einfluss auf die Triglyzeridsynthese im Organismus zu haben, dessen Bestätigung jedoch weiterer Untersuchungen unter standardisierten Voraussetzungen bedarf.

II Abstract

Flotillin 1 and 2 are highly conserved proteins that are ubiquitously expressed. Under physiological conditions they are tightly bound to the cytosolic side of the plasma membrane within membrane rafts and are involved in many processes such as signaling pathways, membrane transport and the assembly of the cytoskeleton and cell-cell- and cell-matrix-contacts.

In addition to the classic insulin signaling pathway, Baumann et al. (2000) described an alternative insulin signaling pathway for which the presence of flotillin 1 is required, indicating the involvement of flotillins in the insulin signaling pathway. The fact that skeletal muscle cells in type 2 diabetes exhibit an increased expression of flotillins also implies their participation in the insulin signaling pathway.

To investigate to what extent flotillins influence the expression of insulin-dependent genes, the gene products of flotillin 1- and flotillin 2-knockout (KO) mice were compared with those of wildtype (WT) mice in this work. For this, RNA was isolated from skeletal muscle cells of these mice, transcribed into cDNA and qRT-PCRs were performed to determine the expression level of selected insulin-dependent genes. Furthermore, the influence of flotillins on the EGF signaling pathway and on plasma triglyceride levels was investigated.

The investigations showed that both flotillin 1 and flotillin 2 generally have little to no influence on the expression of insulin-dependent genes in skeletal muscle cells of healthy adult mice. However, the influence of flotillins on the EGF signaling pathway was clearly confirmed, since in particular the investigation of genes influencing the MAP kinase pathway show that flotillin 2 has a negatively regulating influence on the EGF signaling pathway. Moreover, flotillins also may negatively regulate the triglyceride levels of the organism, but the confirmation of this requires further investigations under standardized conditions.

III Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ACCA	Acetyl-CoA Carboxylase
ADP	Adenosindiphosphat
Akt/PKB	Proteinkinase B
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	SH2B-Adapter-Protein 2
ATP	Adenosintriphosphat
B2M	Beta-Sekretase
BACE 1	Beta-2 Mikroglobulin
BBC3	<i>BCL2-binding component 3</i>
Bcl2	<i>B-cell lymphoma</i>
C3G	GDP-GTP-Austauschfaktor C3G
CAP	<i>C-Cbl associated protein</i>
c-Cbl	E3 Ubiquitin-Protein Ligase Cbl
cDNA	<i>copy-Desoxyribonukleinsäure</i>
CHO	<i>chinese hamster ovary</i>
CRAC	<i>cholesterol recognition interaction amino acid consensus</i>
CrkII	Adapter-Protein CRK
DEPC-H ₂ O	Diethyldicarbonat Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
c-TRL	Cholesterin- und triglyzeridreiche Lipoproteine
DUSP	<i>dual specificity phosphatase</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGR1	<i>early growth response 1</i>
ERK	Extrazelluläre Signale regulierende Kinase
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
Flot1	Flotillin 1
Flot2	Flotillin 2
GAIT	<i>IFN-gamma-activated inhibitor of translation</i>
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GEF	Guaninnukleotidaustauschfaktor

GLP-1	<i>glucagon-like peptide-1</i>
GLUT4	Glukose Transporter Typ 4
GDP	Guanosindiphosphat
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
Grb-2	<i>growth factor receptor-bound protein 2</i>
GTP	Guanosintriphosphat
HeLa	<i>Henrietta Lacks</i>
HepG2	<i>human hepatocellular carcinoma</i>
HK2	Hexokinase 2
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
IR	Insulinrezeptor
IRS	Insulinrezeptor-Substrat
JNK	C-Jun-N-terminale Kinase
KO	Knock-out
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MDCK	<i>Madin-Darby canine kidney</i>
MEK	MAP-Kinase-Kinase/ MAP-ERK-Kinase
MHCI	<i>major histocompatibility complex class I</i>
mRNA	<i>messenger-Ribonukleinsäure</i>
qRT-PCR	Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion
PBS	<i>phosphat buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDK 1	<i>3-phosphoinositide-dependent protein kinase</i>
PFKL	Phosphofruktokinase Leber
PFKM	Phosphofruktokinase Muskel
PHB	Prohibitin Homologie Domäne
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol(4,5)-triphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol(3,4,5)-triphosphat
PKC ζ	Proteinkinase C zeta
PMA	Para-Methoxyamphetamin
PPARG	<i>peroxisome proliferator activator receptor gamma</i>
PTOV-1 Phosphatase	<i>prostate tumor overexpressed 1 phosphatase</i>
PUMA	<i>p53-upregulated modulator of apoptosis</i>
Raf	<i>rapidly accelerating fibrosarcoma protein</i>

RAR	<i>retinoic acid receptor alpha</i>
Ras	<i>rat sarcoma protein</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RPL13a	<i>ribosomal protein L13A</i>
RXR	Retinoid X Rezeptor
SD	Standardabweichung
SH2-Domäne	<i>Src-homology 2-Domäne</i>
SH3-Domäne	<i>Src-homology 3-Domäne</i>
SiRNA	<i>small interfering RNA</i>
Sos	<i>son of sevenless protein</i>
SPFH-Domäne	Stomatin-Prohibitin-Flotillin-Hflk/C-Domäne
SRE	<i>serum response element</i>
SREBF1	<i>sterol regulatory element binding transcription factor 1</i>
SREBP	<i>sterol regulatory element binding protein</i>
SRF	<i>serum response factor</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TC10	<i>Rho-related GTP-binding protein RhoQ</i>
TGFβ1	<i>transforming growth factor beta 1</i>
TNFα	Tumornekrosefaktor alpha
WT	Wildtyp
YWAHZ	<i>tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5- monooxygenase activation protein zeta</i>

IV Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Der klassische Insulin-Signaltransduktionsweg.....	3
Abbildung 2: Der alternative Insulin-Signaltransduktionsweg.....	4
Abbildung 3: Der EGF-Signaltransduktionsweg.....	6
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Flotillinen.....	10
Abbildung 5: Ablaufschema der qRT-PCR im Biorad CFX Connect™ Real-Time System.....	25
Abbildung 6: Ergebnis der qRT-PCR von aus Leberzellen isolierter RNA am Beispiel eines Referenzgenes.....	29
Abbildung 7: Ergebnis der qRT-PCR von aus Skelettmuskelzellen isolierter RNA am Beispiel eines Zielgenes.....	30
Abbildung 8: Einfluss von Flotillin 1 auf die mRNA-Expression von insulin-abhängigen Genen des Lipidstoffwechsels.....	32
Abbildung 9: Einfluss von Flotillin 2 auf die mRNA-Expression von insulin-abhängigen Genen des Lipidstoffwechsels.....	33
Abbildung 10: Einfluss von Flotillin 1 auf die mRNA-Expression von insulin-abhängigen Genen des Glukosestoffwechsels.....	36
Abbildung 11: Einfluss von Flotillin 2 auf die mRNA-Expression von insulin-abhängigen Genen des Glukosestoffwechsels.....	37
Abbildung 12: Einfluss von Flotillin 1 auf die mRNA-Expression von MAP-Kinase-Weg beeinflussenden Genen.....	41
Abbildung 13: Einfluss von Flotillin 2 auf die mRNA-Expression von MAP-Kinase-Weg beeinflussenden Genen.....	42
Abbildung 14: Einfluss von Flotillin 1 auf die mRNA-Expression von apoptotischen Signalwegen beeinflussenden Genen.....	44
Abbildung 15: Einfluss von Flotillin 2 auf die mRNA-Expression von apoptotischen Signalwegen beeinflussenden Genen.....	45
Abbildung 16: Gelelektrophorese.....	46
Abbildung 17: Einfluss von Flotillin 1 auf den Triglyzeridgehalt im Blutserum der Versuchstiere.....	47
Abbildung 18: Einfluss von Flotillin 2 auf den Triglyzeridgehalt im Blutserum der Versuchstiere.....	48

V Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte und Materialien.....	15
Tabelle 2: Chemikalien und Reagenzien	16
Tabelle 3: Puffer und Lösungen	16
Tabelle 4: DNA-Primer.....	17
Tabelle 5: Flotillin 1 Versuchstiere	18
Tabelle 6: Flotillin 2 Versuchstiere.....	19
Tabelle 7: Flotillin 1 und Flotillin 2 Versuchstiere	20

VI Literaturverzeichnis

1. Banning, A., Kurrle, N., Meister, M. & Tikkanen, R. Flotillins in receptor tyrosine kinase signaling and cancer. *Cells* **3**, 129–149 (2014).
2. Berg, J. M., Stryer, L. & Tymoczko, J. L. *Biochemie*. 7th ed. (Springer Spektrum, Berlin [u.a.], 2013).
3. Siddle, K. Signalling by insulin and IGF receptors. Supporting acts and new players. *Journal of molecular endocrinology* **47**, R1-10 (2011).
4. Björnholm, M. *et al.* Absence of functional insulin receptor substrate-3 (IRS-3) gene in humans. *Diabetologia* **45**, 1697–1702 (2002).
5. Baumann, C. A. *et al.* CAP defines a second signalling pathway required for insulin-stimulated glucose transport. *Nature* **407**, 202–207 (2000).
6. RIBON, V. & SALTIEL, A. R. Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the proto-oncogene product of c-Cbl in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. J.* **324**, 839–846 (1997).
7. Chiang, S. H. *et al.* Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10. *Nature* **410**, 944–948 (2001).
8. Fecchi, K., Volonte, D., Hezel, M. P., Schmeck, K. & Galbiati, F. Spatial and temporal regulation of GLUT4 translocation by flotillin-1 and caveolin-3 in skeletal muscle cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **20**, 705–707 (2006).
9. Bell, G. I. *et al.* Human epidermal growth factor precursor. CDNA sequence, expression in vitro and gene organization. *Nucl Acids Res* **14**, 8427–8446 (1986).
10. Lu, C. *et al.* Structural evidence for loose linkage between ligand binding and kinase activation in the epidermal growth factor receptor. *Molecular and cellular biology* **30**, 5432–5443 (2010).
11. Kavarthapu, R. & Dufau, M. L. Role of EGF/ERBB1 in the transcriptional regulation of the prolactin receptor independent of estrogen and prolactin in breast cancer cells. *Oncotarget* (2016).
12. Clark, G. J. *et al.* 14-3-3 zeta negatively regulates raf-1 activity by interactions with the Raf-1 cysteine-rich domain. *The Journal of biological chemistry* **272**, 20990–20993 (1997).

13. Roy, S. *et al.* 14-3-3 facilitates Ras-dependent Raf-1 activation in vitro and in vivo. *Molecular and cellular biology* **18**, 3947–3955 (1998).
14. Leever, S. J., Paterson, H. F. & Marshall, C. J. Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane. *Nature* **369**, 411–414 (1994).
15. Ramos, J. W. The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. *The international journal of biochemistry & cell biology* **40**, 2707–2719 (2008).
16. Schulte, T., Paschke, K. A., Laessing, U., Lottspeich, F. & Stuermer, C. A. Reggie-1 and reggie-2, two cell surface proteins expressed by retinal ganglion cells during axon regeneration. *Development (Cambridge, England)* **124**, 577–587 (1997).
17. Bickel, P. E. *et al.* Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins. *The Journal of biological chemistry* **272**, 13793–13802 (1997).
18. Volonte, D. *et al.* Flotillins/cavatellins are differentially expressed in cells and tissues and form a hetero-oligomeric complex with caveolins in vivo. Characterization and epitope-mapping of a novel flotillin-1 monoclonal antibody probe. *The Journal of biological chemistry* **274**, 12702–12709 (1999).
19. Fernow, I., Icking, A. & Tikkanen, R. Reggie-1 and reggie-2 localize in non-caveolar rafts in epithelial cells: cellular localization is not dependent on the expression of caveolin proteins. *European journal of cell biology* **86**, 345–352 (2007).
20. Glebov, O. O., Bright, N. A. & Nichols, B. J. Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. *Nature cell biology* **8**, 46–54 (2006).
21. Simons, K. & Ikonen, E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569–572 (1997).
22. Simons, K. & Gerl, M. J. Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. *Nature reviews. Molecular cell biology* **11**, 688–699 (2010).
23. Edgar, A. J. & Polak, J. M. Flotillin-1: gene structure: cDNA cloning from human lung and the identification of alternative polyadenylation signals. *The international journal of biochemistry & cell biology* **33**, 53–64 (2001).
24. Rivera-Milla, E., Stuermer, C. A. O. & Malaga-Trillo, E. Ancient origin of reggie (flotillin), reggie-like, and other lipid-raft proteins: convergent evolution of the SPFH domain. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **63**, 343–357 (2006).

25. Malaga-Trillo, E., Laessing, U., Lang, D. M., Meyer, A. & Stuermer, C. A. O. Evolution of duplicated reggie genes in zebrafish and goldfish. *Journal of molecular evolution* **54**, 235–245 (2002).
26. Banning, A., Tomasovic, A. & Tikkanen, R. Functional aspects of membrane association of reggie/flotillin proteins. *Current protein & peptide science* **12**, 725–735 (2011).
27. Stuermer, C. A. *et al.* Glycosylphosphatidyl inositol-anchored proteins and fyn kinase assemble in noncaveolar plasma membrane microdomains defined by reggie-1 and -2. *Molecular biology of the cell* **12**, 3031–3045 (2001).
28. Liu, J., Deyoung, S. M., Zhang, M., Dold, L. H. & SALTIEL, A. R. The stomatin/prohibitin/flotillin/HflK/C domain of flotillin-1 contains distinct sequences that direct plasma membrane localization and protein interactions in 3T3-L1 adipocytes. *The Journal of biological chemistry* **280**, 16125–16134 (2005).
29. Neumann-Giesen, C. *et al.* Membrane and raft association of reggie-1/flotillin-2: role of myristoylation, palmitoylation and oligomerization and induction of filopodia by overexpression. *The Biochemical journal* **378**, 509–518 (2004).
30. Kurrle, N. *et al.* Flotillins directly interact with gamma-catenin and regulate epithelial cell-cell adhesion. *PloS one* **8**, e84393 (2013).
31. Gassart, A. de, Geminard, C., Fevrier, B., Raposo, G. & Vidal, M. Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. *Blood* **102**, 4336–4344 (2003).
32. Gkantiragas, I. *et al.* Sphingomyelin-enriched microdomains at the Golgi complex. *Molecular biology of the cell* **12**, 1819–1833 (2001).
33. Santamaria, A. *et al.* PTOV1 enables the nuclear translocation and mitogenic activity of flotillin-1, a major protein of lipid rafts. *Molecular and cellular biology* **25**, 1900–1911 (2005).
34. Ha, H. *et al.* Membrane rafts play a crucial role in receptor activator of nuclear factor kappaB signaling and osteoclast function. *The Journal of biological chemistry* **278**, 18573–18580 (2003).
35. Neumann-Giesen, C., Fernow, I., Amaddii, M. & Tikkanen, R. Role of EGF-induced tyrosine phosphorylation of reggie-1/flotillin-2 in cell spreading and signaling to the actin cytoskeleton. *Journal of cell science* **120**, 395–406 (2007).
36. Lang, D. M. *et al.* Identification of reggie-1 and reggie-2 as plasmamembrane-associated proteins which cocluster with activated GPI-anchored cell adhesion

- molecules in non-caveolar micropatches in neurons. *Journal of neurobiology* **37**, 502–523 (1998).
37. Browman, D. T., Hoegg, M. B. & Robbins, S. M. The SPFH domain-containing proteins: more than lipid raft markers. *Trends in cell biology* **17**, 394–402 (2007).
 38. Tavernarakis, N., Driscoll, M. & Kyrpides, N. C. The SPFH domain. Implicated in regulating targeted protein turnover in stomatins and other membrane-associated proteins. *Trends in Biochemical Sciences* **24**, 425–427 (1999).
 39. Merkwirth, C. & Langer, T. Prohibitin function within mitochondria: essential roles for cell proliferation and cristae morphogenesis. *Biochimica et biophysica acta* **1793**, 27–32 (2009).
 40. Salzer, U. & Prohaska, R. Stomatin, flotillin-1, and flotillin-2 are major integral proteins of erythrocyte lipid rafts. *Blood* **97**, 1141–1143 (2001).
 41. Snyers, L., Umlauf, E. & Prohaska, R. Oligomeric nature of the integral membrane protein stomatin. *The Journal of biological chemistry* **273**, 17221–17226 (1998).
 42. Tatsuta, T., Model, K. & Langer, T. Formation of membrane-bound ring complexes by prohibitins in mitochondria. *Molecular biology of the cell* **16**, 248–259 (2005).
 43. Babuke, T. *et al.* Hetero-oligomerization of reggie-1/flotillin-2 and reggie-2/flotillin-1 is required for their endocytosis. *Cellular signalling* **21**, 1287–1297 (2009).
 44. Solis, G. P. *et al.* Reggie/flotillin proteins are organized into stable tetramers in membrane microdomains. *The Biochemical journal* **403**, 313–322 (2007).
 45. Riento, K., Frick, M., Schafer, I. & Nichols, B. J. Endocytosis of flotillin-1 and flotillin-2 is regulated by Fyn kinase. *Journal of cell science* **122**, 912–918 (2009).
 46. Morrow, I. C. *et al.* Flotillin-1/reggie-2 traffics to surface raft domains via a novel golgi-independent pathway. Identification of a novel membrane targeting domain and a role for palmitoylation. *The Journal of biological chemistry* **277**, 48834–48841 (2002).
 47. Kurrle, N., John, B., Meister, M. & Tikkane, R. in *Role of Tyrosine Kinase A Receptor (TrkA) on Pathogenicity of Clostridium perfringens Alpha-Toxin*, edited by Masataka Oda, Jun Sakurai, Keiko Kobayashi & Masahiro Nagahama (INTECH Open Access Publisher 2012).
 48. Amaddii, M. *et al.* Flotillin-1/reggie-2 protein plays dual role in activation of receptor-tyrosine kinase/mitogen-activated protein kinase signaling. *The Journal of biological chemistry* **287**, 7265–7278 (2012).

49. Banning, A., Regenbrecht, C. R. A. & Tikkanen, R. Increased activity of mitogen activated protein kinase pathway in flotillin-2 knockout mouse model. *Cellular signalling* **26**, 198–207 (2014).
50. Bodin, S., Planchon, D., Rios Morris, E., Comunale, F. & Gauthier-Rouvière, C. Flotillins in intercellular adhesion - from cellular physiology to human diseases. *Journal of cell science* **127**, 5139–5147 (2014).
51. Guillaume, E. *et al.* Flotillin microdomains stabilize cadherins at cell-cell junctions. *Journal of cell science* **126**, 5293–5304 (2013).
52. Völlner, F. *et al.* Loss of flotillin expression results in weakened desmosomal adhesion and Pemphigus vulgaris-like localisation of desmoglein-3 in human keratinocytes. *Scientific reports* **6**, 28820 (2016).
53. Dermine, J. F. *et al.* Flotillin-1-enriched lipid raft domains accumulate on maturing phagosomes. *The Journal of biological chemistry* **276**, 18507–18512 (2001).
54. Babuke, T. & Tikkanen, R. Dissecting the molecular function of reggie/flotillin proteins. *European journal of cell biology* **86**, 525–532 (2007).
55. Koch, J. C. *et al.* Upregulation of reggie-1/flotillin-2 promotes axon regeneration in the rat optic nerve in vivo and neurite growth in vitro. *Neurobiology of disease* **51**, 168–176 (2013).
56. Meister, M. & Tikkanen, R. Endocytic trafficking of membrane-bound cargo. A flotillin point of view. *Membranes* **4**, 356–371 (2014).
57. Ludwig, A. *et al.* Flotillin microdomains interact with the cortical cytoskeleton to control uropod formation and neutrophil recruitment. *The Journal of cell biology* **191**, 771–781 (2010).
58. Bach, J. N. & Bramkamp, M. Flotillins functionally organize the bacterial membrane. *Molecular microbiology* **88**, 1205–1217 (2013).
59. Roitbak, T., Surviladze, Z., Tikkanen, R. & Wandinger-Ness, A. A polycystin multiprotein complex constitutes a cholesterol-containing signalling microdomain in human kidney epithelia. *The Biochemical journal* **392**, 29–38 (2005).
60. Hazarika, P. *et al.* Up-regulation of Flotillin-2 is associated with melanoma progression and modulates expression of the thrombin receptor protease activated receptor 1. *Cancer research* **64**, 7361–7369 (2004).
61. Lin, C. *et al.* Knockdown of FLOT1 impairs cell proliferation and tumorigenicity in breast cancer through upregulation of FOXO3a. *Clinical cancer research : an*

official journal of the American Association for Cancer Research **17**, 3089–3099 (2011).

62. Hazarika, P. *et al.* Flotillin 2 is distinct from epidermal surface antigen (ESA) and is associated with filopodia formation. *Journal of cellular biochemistry* **75**, 147–159 (1999).
63. Song, L. *et al.* Flotillin-1 promotes tumor necrosis factor-alpha receptor signaling and activation of NF-kappaB in esophageal squamous cell carcinoma cells. *Gastroenterology* **143**, 995-1005.e12 (2012).
64. Zhang, S.-H. *et al.* High Expression of FLOT1 Is Associated with Progression and Poor Prognosis in Hepatocellular Carcinoma. *PloS one* **8**, e64709 (2013).
65. Berger, T. *et al.* Flotillin-2 deficiency leads to reduced lung metastases in a mouse breast cancer model. *Oncogene* **32**, 4989–4994 (2013).
66. Pust, S. *et al.* Flotillins as regulators of ErbB2 levels in breast cancer. *Oncogene* **32**, 3443–3451 (2013).
67. Wang, X. *et al.* Flotillin-2 is associated with breast cancer progression and poor survival outcomes. *Journal of translational medicine* **11**, 190 (2013).
68. Zhu, Z. *et al.* Flotillin2 expression correlates with HER2 levels and poor prognosis in gastric cancer. *PloS one* **8**, e62365 (2013).
69. Doherty, S. D., Prieto, V. G., George, S., Hazarika, P. & Duvic, M. High flotillin-2 expression is associated with lymph node metastasis and Breslow depth in melanoma. *Melanoma research* **16**, 461–463 (2006).
70. Kokubo, H., Lemere, C. A. & Yamaguchi, H. Localization of flotillins in human brain and their accumulation with the progression of Alzheimer's disease pathology. *Neuroscience letters* **290**, 93–96 (2000).
71. John, B. A., Meister, M., Banning, A. & Tikkanen, R. Flotillins bind to the dileucine sorting motif of β -site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 and influence its endosomal sorting. *The FEBS journal* **281**, 2074–2087 (2014).
72. Jacobowitz, D. M. & Kallarakal, A. T. Flotillin-1 in the substantia nigra of the Parkinson brain and a predominant localization in catecholaminergic nerves in the rat brain. *Neurotoxicity research* **6**, 245–257 (2004).
73. Reghunathan, R. *et al.* Expression profile of immune response genes in patients with Severe Acute Respiratory Syndrome. *BMC immunology* **6**, 2 (2005).

74. James, D. J. *et al.* Skeletal Muscle of Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats Exhibits Reduced Insulin-Stimulated Glucose Transport and Elevated Levels of Caveolin and Flotillin. *Diabetes* **50**, 2148–2156 (2001).
75. Meister, M., Tomasovic, A., Banning, A. & Tikkanen, R. Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Scaffolding Proteins: A Recount. *International journal of molecular sciences* **14**, 4854–4884 (2013).
76. R. I. Freshney & M. G. Freshney (eds.). *Culture of Epithelial Cells* (John Wiley & Sons, Inc, New York, USA, 2002).
77. Danoviz, M. E. & Yablonka-Reuveni, Z. Skeletal muscle satellite cells. Background and methods for isolation and analysis in a primary culture system. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **798**, 21–52 (2012).
78. Innis, M. A. *PCR protocols. A guide to methods and applications* (Academic Press, San Diego, 1990).
79. Vandesompele, J. *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology* **3**, RESEARCH0034 (2002).
80. Martina Arnold. *Standardarbeitsanweisung Triglyceride (TRIG) am ADVIA 1650* (2007).
81. Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J. & Williams, P. M. Real time quantitative PCR. *Genome research* **6**, 986–994 (1996).
82. Sun, W.-J. *et al.* Cloning of Human beta2-microglobulin gene and efficient expression in Escherichia coli. *Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi / Zhongguo bing li sheng li xue hui = Journal of experimental hematology / Chinese Association of Pathophysiology* **14**, 521–524 (2006).
83. Odintsova, T. I. *et al.* Characterization and analysis of posttranslational modifications of the human large cytoplasmic ribosomal subunit proteins by mass spectrometry and Edman sequencing. *Journal of protein chemistry* **22**, 249–258 (2003).
84. Mazumder, B. *et al.* Regulated release of L13a from the 60S ribosomal subunit as a mechanism of transcript-specific translational control. *Cell* **115**, 187–198 (2003).
85. Powell, D. W., Rane, M. J., Chen, Q., Singh, S. & McLeish, K. R. Identification of 14-3-3zeta as a protein kinase B/Akt substrate. *The Journal of biological chemistry* **277**, 21639–21642 (2002).

86. Ogiwara, T. *et al.* 14-3-3 protein binds to insulin receptor substrate-1, one of the binding sites of which is in the phosphotyrosine binding domain. *The Journal of biological chemistry* **272**, 25267–25274 (1997).
87. Lim, G. E. *et al.* Ywhaz/14-3-3ζ Deletion Improves Glucose Tolerance Through a GLP-1-Dependent Mechanism. *Endocrinology* **157**, 2649–2659 (2016).
88. Issemann, I. & Green, S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* **347**, 645–650 (1990).
89. Kliewer, S. A. *et al.* Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**, 7355–7359 (1994).
90. Mukherjee, R., Jow, L., Croston, G. E. & Paterniti, J. R. Identification, Characterization, and Tissue Distribution of Human Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR) Isoforms PPAR 2 versus PPAR 1 and Activation with Retinoid X Receptor Agonists and Antagonists. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 8071–8076 (1997).
91. Ahmadian, M. *et al.* PPARγ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nature medicine* **19**, 557–566 (2013).
92. Tontonoz, P., Hu, E. & Spiegelman, B. M. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPARγ2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* **79**, 1147–1156 (1994).
93. Tomaru, T., Steger, D. J., Lefterova, M. I., Schupp, M. & Lazar, M. A. Adipocyte-specific expression of murine resistin is mediated by synergism between peroxisome proliferator-activated receptor gamma and CCAAT/enhancer-binding proteins. *The Journal of biological chemistry* **284**, 6116–6125 (2009).
94. Hollenberg, A. N. *et al.* Functional Antagonism between CCAAT/Enhancer Binding Protein- and Peroxisome Proliferator-activated Receptor- on the Leptin Promoter. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 5283–5290 (1997).
95. Iwaki, M. *et al.* Induction of Adiponectin, a Fat-Derived Antidiabetic and Antiatherogenic Factor, by Nuclear Receptors. *Diabetes* **52**, 1655–1663 (2003).
96. Hofmann, C. *et al.* Altered gene expression for tumor necrosis factor-alpha and its receptors during drug and dietary modulation of insulin resistance. *Endocrinology* **134**, 264–270 (1994).

97. Lehmann, J. M. *et al.* An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *The Journal of biological chemistry* **270**, 12953–12956 (1995).
98. Banning, A., Ockenga, W., Finger, F., Siebrasse, P. & Tikkanen, R. Transcriptional regulation of flotillins by the extracellularly regulated kinases and retinoid X receptor complexes. *PloS one* **7**, e45514 (2012).
99. DeBose-Boyd, R. A., Ou, J., Goldstein, J. L. & Brown, M. S. Expression of sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP-1c) mRNA in rat hepatoma cells requires endogenous LXR ligands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 1477–1482 (2001).
100. Yokoyama, C. *et al.* SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell* **75**, 187–197 (1993).
101. Kohjima, M. *et al.* SREBP-1c, regulated by the insulin and AMPK signaling pathways, plays a role in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Med* (2008).
102. Huang, S. & Czech, M. P. The GLUT4 glucose transporter. *Cell metabolism* **5**, 237–252 (2007).
103. Heikkinen, S. *et al.* Mouse hexokinase II gene: structure, cDNA, promoter analysis, and expression pattern. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* **11**, 91–96 (2000).
104. Ebina, Y. *et al.* The human insulin receptor cDNA: the structural basis for hormone-activated transmembrane signalling. *Cell* **40**, 747–758 (1985).
105. McKeon, C. *et al.* Structural and functional analysis of the insulin receptor promoter. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* **4**, 647–656 (1990).
106. Elson, A. *et al.* The structure of the human liver-type phosphofructokinase gene. *Genomics* **7**, 47–56 (1990).
107. Ueda, K., Arakawa, H. & Nakamura, Y. Dual-specificity phosphatase 5 (DUSP5) as a direct transcriptional target of tumor suppressor p53. *Oncogene* **22**, 5586–5591 (2003).
108. Shen, W. H., Wang, J., Wu, J., Zhurkin, V. B. & Yin, Y. Mitogen-activated protein kinase phosphatase 2: a novel transcription target of p53 in apoptosis. *Cancer research* **66**, 6033–6039 (2006).

109. Yang, H. & Wu, G. S. P53 transactivates the phosphatase MKP1 through both intronic and exonic p53 responsive elements. *Cancer Biology & Therapy* **3**, 1277–1282 (2014).
110. Yin, Y., Liu, Y.-X., Jin, Y. J., Hall, E. J. & Barrett, J. C. PAC1 phosphatase is a transcription target of p53 in signalling apoptosis and growth suppression. *Nature* **422**, 527–531 (2003).
111. Keyse, S. M. & Emslie, E. A. Oxidative stress and heat shock induce a human gene encoding a protein-tyrosine phosphatase. *Nature* **359**, 644–647 (1992).
112. Boutros, T., Chevet, E. & Metrakos, P. Mitogen-activated protein (MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer. *Pharmacological reviews* **60**, 261–310 (2008).
113. Zhao, Q. *et al.* MAP kinase phosphatase 1 controls innate immune responses and suppresses endotoxic shock. *The Journal of experimental medicine* **203**, 131–140 (2006).
114. Zhao, Q. *et al.* The role of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in the response of alveolar macrophages to lipopolysaccharide: attenuation of proinflammatory cytokine biosynthesis via feedback control of p38. *The Journal of biological chemistry* **280**, 8101–8108 (2005).
115. Liu, Y., Shepherd, E. G. & Nelin, L. D. MAPK phosphatases--regulating the immune response. *Nature reviews. Immunology* **7**, 202–212 (2007).
116. Sun, H., Charles, C. H., Lau, L. F. & Tonks, N. K. MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase in vivo. *Cell* **75**, 487–493 (1993).
117. Keyse, S. M. Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. *Current Opinion in Cell Biology* **12**, 186–192 (2000).
118. Bluthgen, N. *et al.* A systems biological approach suggests that transcriptional feedback regulation by dual-specificity phosphatase 6 shapes extracellular signal-related kinase activity in RAS-transformed fibroblasts. *The FEBS journal* **276**, 1024–1035 (2009).
119. Brondello, J. M., Pouyssegur, J. & McKenzie, F. R. Reduced MAP kinase phosphatase-1 degradation after p42/p44MAPK-dependent phosphorylation. *Science (New York, N.Y.)* **286**, 2514–2517 (1999).

120. Sohaskey, M. L. & Ferrell, J. E., JR. Activation of p42 mitogen-activated protein kinase (MAPK), but not c-Jun NH(2)-terminal kinase, induces phosphorylation and stabilization of MAPK phosphatase XCL100 in *Xenopus* oocytes. *Molecular biology of the cell* **13**, 454–468 (2002).
121. Sukhatme, V. P. *et al.* A zinc finger-encoding gene coregulated with c-fos during growth and differentiation, and after cellular depolarization. *Cell* **53**, 37–43 (1988).
122. Baron, V., Adamson, E. D., Calogero, A., Ragona, G. & Mercola, D. The transcription factor Egr1 is a direct regulator of multiple tumor suppressors including TGFbeta1, PTEN, p53, and fibronectin. *Cancer gene therapy* **13**, 115–124 (2006).
123. Hasan, R. N., Phukan, S. & Harada, S. Differential regulation of early growth response gene-1 expression by insulin and glucose in vascular endothelial cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **23**, 988–993 (2003).
124. Yu, J. & Zhang, L. PUMA, a potent killer with or without p53. *Oncogene* **27 Suppl 1**, S71-83 (2008).
125. Pape, H.-C., Klinke, R. & Brenner, B. *Physiologie*. 7th ed. (Georg Thieme, Stuttgart, 2014).
126. Pessin, J. E. & Saltiel, A. R. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *The Journal of clinical investigation* **106**, 165–169 (2000).
127. Mastick, C. C., Brady, M. J., Printen, J. A., Ribon, V. & Saltiel, A. R. Spatial determinants of specificity in insulin action. *Molecular and cellular biochemistry* **182**, 65–71 (1998).
128. Pawson, T. & Scott, J. D. Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science (New York, N.Y.)* **278**, 2075–2080 (1997).
129. Brown, D. A. & London, E. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annual review of cell and developmental biology* **14**, 111–136 (1998).
130. Solis, G. P. *et al.* Reggies/flotillins regulate E-cadherin-mediated cell contact formation by affecting EGFR trafficking. *Molecular biology of the cell* **23**, 1812–1825 (2012).
131. Shaw, P. E., Schroter, H. & Nordheim, A. The ability of a ternary complex to form over the serum response element correlates with serum inducibility of the human c-fos promoter. *Cell* **56**, 563–572 (1989).

132. Sakamoto, K. M. *et al.* 5' upstream sequence and genomic structure of the human primary response gene, EGR-1/TIS8. *Oncogene* **6**, 867–871 (1991).
133. Kriegsheim, A. von, Preisinger, C. & Kolch, W. Mapping of signaling pathways by functional interaction proteomics. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **484**, 177–192 (2008).
134. Chen, K. *et al.* Suppression of Hepatic FLOT1 (Flotillin-1) by Type 2 Diabetes Mellitus Impairs the Disposal of Remnant Lipoproteins via Syndecan-1. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **38**, 102–113 (2018).
135. Cusi, K. *et al.* Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *The Journal of clinical investigation* **105**, 311–320 (2000).

VII Eidesstaatliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

Ort, Datum

Unterschrift

VIII Danksagung

Abschließend möchte ich mich von Herzen bei allen bedanken, die mich während meiner Dissertation unterstützt haben und mir stets beiseite gestanden haben.

Ich danke Allah, dem Allmächtigen, dass Er mir die Geduld und Kraft gegeben hat, die Dissertation fertigzustellen.

Ein besonderer Dank gilt der Arbeitsgruppe Tikkanen, allen voran Prof. Dr. Ritva Tikkanen für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit sowie der Bereitstellung aller für die Arbeit benötigten Materialien und Informationen und eine unvergleichbare Betreuung.

Ein ganz herzlicher Dank geht an Dr. Antje Banning und Petra Janson. Ihr habt mich bei der Durchführung meiner Versuche stets motiviert und unterstützt, keine meiner Fragen blieben durch Euch unbeantwortet. Eine bessere Betreuung kann man sich nicht wünschen. Ich danke Euch für Eure Geduld, Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit zu jeder Zeit.

Weiterhin danke ich Ralf Füllkrug für die Hilfe und die angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor, zu welcher auch meine lieben Doktorandenkollegen Negin, Natalie, Sina und Marcel beigetragen haben, welche mich auf meinem Weg begleitet haben. Dank Euch hatte ich immer Spaß bei der Arbeit.

Ich danke meinen Eltern, Schwiegereltern und Geschwistern, die mir sowohl während meines Studiums als auch während der Dissertation unterstützend und motivierend zur Seite standen und mir geholfen haben, wo sie nur konnten.

Ein besonderer Dank gilt natürlich auch meinem Ehemann, Jonas. Danke, dass Du an meiner Seite und immer für mich da bist.