

Bedeutung von Lysophosphatidsäure (LPA) bei der Insulinresistenz von pankreatischen β -Zellen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Zein Mourad Agha

aus Syrien

April 2016

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Burkhard Kleuser

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Gerhard Wolber

Tag der Disputation: 17.08.2016

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von
Herrn Prof. Dr. Burkhard Kleuser
am Institut für Pharmakologie und Toxikologie
des Instituts für Pharmazie
der Freien Universität Berlin
sowie
in der Abteilung für Ernährungstoxikologie
des Instituts für Ernährungswissenschaft
der Universität Potsdam angefertigt.

Für meine Familie

Danksagung

Herrn Professor Dr. Burkhard Kleuser danke ich herzlich für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu dürfen. Außerdem möchte ich ihm für die Überlassung des Dissertationsthemas dieser Arbeit und für die gute wissenschaftliche Betreuung über die gesamte Zeit danken.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei Herrn Professor Dr. Wolber, Institut für Pharmazie, für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Püschel und seiner Arbeitsgruppe an der Universität Potsdam für die Möglichkeit, meine Arbeiten im Radioaktivlabor der Abteilung Biochemie der Ernährung durchzuführen.

Prof. Dr. Heinz H. Pertz möchte ich dafür danken, dass ich die Organbadversuche im Labor seines Arbeitskreises durchführen durfte.

Ich danke außerdem Frau Dr. Bettina Scholtka für die Hilfe beim Korrekturlesen dieser Arbeit.

Bei allen Mitgliedern des Arbeitskreises von Herrn Prof. Dr. Kleuser und Frau Prof. Dr. Monika Schäfer-Körting bedanke ich mich für die Hilfsbereitschaft und die überaus freundliche Arbeitsatmosphäre.

Von ganzem Herzen möchte ich zum Schluss meinen Eltern und meiner Familie danken, die mich immer während dieser Arbeit in Deutschland und während meines gesamten Studiums unterstützt haben. Sie haben mich zu dem gemacht, was ich heute bin.

1	EINLEITUNG	1
1.1	Diabetes	2
1.1.1	Typ-1-Diabetes	2
1.1.2	Typ-2-Diabetes	2
1.2	Insulin	4
1.2.1	Insulin-Signaltransduktion.....	5
1.2.2	Insulinwirkung in den β -Zellen.....	8
1.3	Die Akt-Kinase	10
1.3.1	Die Aktivierung der Akt-Kinase.....	10
1.3.2	Bedeutung der Akt-Kinase in der Apoptose	11
1.3.3	Bedeutung der Akt-Kinase in der Proliferation	12
1.4	Regulation der β-Zellmasse	12
1.5	Mechanismen des β-Zellverlustes	16
1.6	Proteinkinase C	19
1.6.1	PKC und β -Zellen	20
1.6.2	Die anti- und pro-apoptotische Wirkung von PKC δ	21
1.7	Lysophosphatidsäure (LPA)	22
1.7.1	Struktur und Biosynthese von LPA	22
1.7.2	Physiologische und pathophysiologische Effekte von LPA	24
1.7.3	LPA-Rezeptoren	26
1.7.4	Bedeutung von LPA in T2D	27
1.8	Das Endothel	28
1.9	Stickstoffmonoxid (NO)	29
1.9.1	Endotheliale NO-Synthase (eNOS)	30
1.9.2	Biologische Wirkung von eNOS/NO auf die vaskuläre Homöostase.....	31
1.10	Endotheliale Dysfunktion	32
1.11	Vasoaktive Wirkung von LPA	32
1.12	Ziel der Arbeit	35
2	MATERIAL UND METHODEN	37
2.1	Material	38
2.1.1	Geräte.....	38
2.1.2	Reagenzien und Verbrauchsmaterialien.....	40
2.1.3	Antikörper.....	45
2.1.4	Lösung der Testsubstanzen	46

2.2	Methoden	47
2.2.1	Methoden zur Kultivierung der Zellen.....	47
2.2.1.1	Zellkultur	47
2.2.1.2	Lösungen zur Zellkultivierung	47
2.2.1.3	Passagierung der Zellen.....	49
2.2.1.4	Kryokonservierung und Auftauen der Zelle	50
2.2.1.5	Zellzahlbestimmung und Aussaat der Zellen	50
2.2.2	Bestimmung der LPA-Gehalte mittels HPLC-ESI-MS/MS	50
2.2.3	Methoden zum Nachweis von Proteinen	53
2.2.3.1	Zelllyse	53
2.2.3.2	Proteinbestimmung.....	54
2.2.3.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	54
2.2.3.4	Western-Blot-Analyse	56
2.2.4	Immunpräzipitation mit Dynabeads.....	58
2.2.5	Untersuchung der mRNA-Transkription	59
2.2.5.1	RNA-Isolierung	59
2.2.5.2	cDNA-Synthese mittels reverser Transkription	60
2.2.5.3	Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion (PCR).....	60
2.2.6	Proliferationsnachweis mittels [³ H]-Thymidin-Inkorporation	62
2.2.7	Quantifizierung der Aktivität der Caspase 3/7.....	62
2.2.8	NO-Bestimmung durch DAF-2D.....	63
2.2.9	Organbad-Experimente	64
2.2.10	Statistische Auswertung.....	66
3	ERGEBNISSE.....	67
3.1	Bedeutung von LPA für die Insulinresistenz in β-Zellen	68
3.1.1	Einfluss von Palmitat auf den intrazellulären LPA-Spiegel in MIN-6 Zellen	68
3.1.2	Einfluss von LPA auf die Insulin-vermittelte physiologische Wirkung in MIN-6 Zellen.....	69
3.1.2.1	Insulin-stimulierte β -Zellproliferation.....	69
3.1.2.2	Einfluss von LPA auf die Insulin-induzierte MIN-6 Zellproliferation.....	70
3.1.2.3	Einfluss von LPA auf den Insulin-vermittelten anti-apoptotischen Effekt in den MIN-6 Zellen	71
3.1.3	Einfluss von LPA auf Insulin-vermittelte Signalwege in MIN-6 Zellen	73
3.1.3.1	Bedeutung von Insulin für die Akt-Aktivierung.....	73
3.1.3.2	Einfluss von LPA auf die Insulin-induzierte Akt-Aktivierung.....	74
3.1.3.3	Einfluss von LPA auf die Insulin-induzierte IR β -Aktivierung.....	76
3.1.3.4	Einfluss von LPA auf die Insulin-induzierte IRS-2-Phosphorylierung	76
3.1.3.5	Einfluss von LPA auf die Insulin-induzierte PI3K-Aktivierung	77
3.1.3.6	Einfluss von LPA auf die Insulin-induzierte GSK-3 β -Phosphorylierung	78
3.1.3.7	Einfluss von LPA auf die Insulin-induzierte mTOR/P70S6K-Phosphorylierung	78
3.1.3.8	Einfluss von LPA auf die Insulin-induzierte FOXO-Phosphorylierung.....	80
3.1.3.9	Einfluss von LPA auf Insulin-Aktivierte PDX-1	80
3.1.3.10	Einfluss von 16:0-LPA auf die Insulin-vermittelte Akt-Aktivierung	81
3.1.3.11	Einfluss von LPA auf die Insulin-induzierte ERK-Phosphorylierung	82
3.1.4	Bedeutung von LPA-Rezeptoren bei der Hemmung der Insulin-vermittelten Signalwege	83
3.1.4.1	Expression von LPA-Rezeptoren in MIN-6 Zellen	83

3.1.4.2	Einfluss von LPA-Rezeptoren-Agonisten und -Antagonisten auf die Insulin-vermittelte Akt-Aktivität.....	84
3.1.4.3	Einfluss von LPA-Rezeptor-Agonisten auf die Insulin-induzierte β -Zellproliferation .	85
3.1.4.4	Einfluss von LPA-Rezeptor-Agonisten auf den anti-apoptotischen Effekt des Insulins	86
3.1.4.5	Einfluss von PTX bei der LPA-vermittelten Wirkung	87
3.1.5	Bedeutung von LPA-induzierten Signalwegen für die Hemmung der Insulin-vermittelten Wirkung und Signalwege.....	88
3.1.5.1	PP2A-Aktivierung durch LPA	88
3.1.5.2	Untersuchung zur Beteiligung von JNK an der LPA-Wirkung auf die Akt-Aktivität ..	89
3.1.5.3	Einfluss von LPA auf den Ca^{2+} -Haushalt in MIN-6 Zellen.....	90
3.1.5.4	Untersuchung zur Beteiligung von PKC an der LPA-Wirkung auf die Akt Aktivität ..	91
3.2	Bedeutung von LPA bei der Relaxation der vorkontrahierten Pulmonararterien vom Schwein	98
3.2.1	Konzentrationsabhängigkeit der Vasorelaxation durch LPA.....	98
3.2.2	Die LPA-induzierte Vasorelaxation ist NO-abhängig	99
3.3	Beteiligung von Signalkaskaden am dilatierenden Effekt von LPA auf die humane Pulmonararterien Endothelzellen (HPAECs).....	100
3.3.1	Aktivierung der eNOS durch LPA.....	100
3.3.2	Einfluss von LPA auf die NO-Freisetzung in den HPAECs.....	101
3.3.3	Untersuchung der Signalkaskade der LPA-vermittelten eNOS-Phosphorylierung	102
3.3.3.1	Expression der LPA-Rezeptoren in den HPAECs.....	102
3.3.3.2	Einfluss des LPA-Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten auf die eNOS-Aktivierung	103
3.3.3.3	Einfluss von PTX auf die eNOS-Aktivierung	104
3.3.3.4	Bedeutung der PI3K/Akt für die eNOS-Aktivierung	105
3.3.3.4.1	Einfluss von LPA auf die Akt-Phosphorylierung.....	105
3.3.3.4.2	Einfluss von LPA-Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten auf die Akt-Aktivierung .	106
3.3.3.4.3	Einfluss von PTX auf Akt-Aktivierung.....	107
3.3.3.4.4	Einfluss der Hemmung des PI3K/Akt-Signalweges auf die eNOS-Aktivierung	108
3.3.3.5	Einfluss des PLC-Inhibitors auf die eNOS-Aktivierung	109
3.3.3.6	Einfluss des Ca^{2+} -Inhibitors (BAPTA/AM) auf eNOS-Aktivierung	110
3.3.3.7	Beteiligung von Ca^{2+} /CaMKII an der eNOS-Aktivierung	110
4	DISKUSSION.....	112
4.1	Beteiligung von LPA an der Insulinresistenz in pankreatischen β-Zellen.....	113
4.1.1	Bedeutung von Palmitat auf den intrazellulären LPA-Spiegel in MIN-6 Zellen.....	113
4.1.2	Regulation der Zellproliferation durch LPA	114
4.1.3	Regulation der Zellapoptose durch LPA.....	116
4.1.4	Einfluss von LPA auf Insulin-Signalkaskade	117
4.1.4.1	Die Regulation der Akt-Kinase durch LPA.....	117
4.1.4.2	Bedeutung von LPA bei weiteren Komponenten des Insulin-Signalweges	120
4.1.5	Beteiligung von PKC δ an der hemmenden Wirkung von LPA	123
4.1.6	Weitere mögliche Mechanismen der LPA-vermittelten Hemmung der Insulin-Signalkaskade	127
4.1.7	Beteiligung des LPA3-Rezeptors an der hemmenden Wirkung von LPA.....	129

4.2	Bedeutung von LPA in der vaskulären Homöostase	130
4.3	Einfluss von LPA auf die eNOS-Aktivierung in HPAECs	132
5	ZUSAMMENFASSUNG	138
5.1	Zusammenfassung	139
5.2	Abstract.....	140
6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	142
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	147

1 Einleitung

1.1 Diabetes

Der Diabetes mellitus ist eine Regulationsstörung des Stoffwechsels, der durch den Leitbefund der chronischen Hyperglykämie charakterisiert ist. Das Hauptsymptom des Diabetes ist eine Ausscheidung der Glucose mit dem Urin (Glucosurie). Nach den Leitlinien der Deutschen Diabetesgesellschaft (DDG) erfolgt die Klassifikation des Diabetes mellitus in zwei Hauptformen: Typ-1-Diabetes, Typ-2-Diabetes und weitere spezifische Diabetes-Typen (z. B. genetische Defekte der β -Zellfunktion oder genetische Defekte der Insulinwirkung) und Gestationsdiabetes (sog. Schwangerschaftsdiabetes) (DDG, 2009). Im Jahre 2013 gab es nach Schätzungen der IDF (International Diabetes Federation) bereits ungefähr 382 Millionen Diabetiker weltweit, dies entspricht 8,3 % der Bevölkerung. Für das Jahr 2030 wird eine Zahl von 552 Millionen geschätzt (IDF, Atlas 2013). Die Diagnose des Diabetes mellitus erfolgt über die Bestimmung des Glucosespiegels im Blut entweder im Nüchternzustand von ≥ 126 mg/dl oder zwei Stunden nach der Gabe von 75 g Glucose im oralen Glucosetoleranztest (oGTT) von ≥ 200 mg/dl (= 11 mM) (DDG, 2009). Die normale Glucosetoleranz in gesunden Individuen beträgt < 110 mg/dl (< 6.1 mM/l).

1.1.1 Typ-1-Diabetes

Der Typ-1-Diabetes (T1D) ist eine Autoimmunerkrankung, der zur progredienten Zerstörung der insulinproduzierenden β -Zellen und damit zu einem absoluten Insulinmangel führt. Durch die Zellen des körpereigenen Immunsystems werden die Langerhans-Inseln angegriffen. Dies löst zunächst eine Entzündungsreaktion (Insulitis) aus und führt anschließend zur zunehmenden Zerstörung der β -Zellen, bis mehr als 90 % der β -Zellen zerstört worden sind, so dass eine Störung der Glucosehomöostase und schließlich ein absoluter Insulinmangel auftritt. Der T1D kann in jedem Lebensalter auftreten, häufig bei Jugendlichen im Alter zwischen 10 und 14 Jahren (Marigliano et al., 2015). Etwa 5 % aller Diabetiker sind Typ-1-Diabetiker. Postuliert wird, dass sowohl durch genetische als auch durch Umweltfaktoren eine zytotoxische Autoimmunreaktion ausgelöst wird. Aber auch Virusinfektionen können die Entstehung eines T1D fördern (American Diabetes Association, 2012).

1.1.2 Typ-2-Diabetes

Der Typ-2-Diabetes (T2D) bezeichnet eine chronische Glucosestoffwechselstörung mit einem relativen Insulinmangel. Diese multifaktorielle Erkrankung ist charakterisiert durch die Störung der Insulinwirkung (Insulinresistenz) und der β -Zelldysfunktion (Insulinsekretion und β -Zellapoptose). Etwa 90 % aller Diabetiker sind Typ-2-Diabetiker. In der Regel entwickelt sich der T2D nicht vor dem 40 - 45. Lebensjahr. Die Prävalenz des T2D nimmt mit steigendem Lebensalter zu (Nolan et al.,

2011). Die Ursachen sind zwar noch nicht vollständig geklärt, aber das metabolische Syndrom (Adipositas, arterielle Hypertonie und Dyslipidämie) konnte als Hauptursache für die Entwicklung des T2D identifiziert werden (Weiss et al., 2004; Yadav et al., 2013). Darüber hinaus wird auch eine genetische Disposition postuliert (Leahy, 2005). Insbesondere aber scheint der Lebensstil, geprägt durch einen Mangel an körperlicher Bewegung sowie durch eine falsche Ernährungsweise und daraus resultierender Adipositas, eine wesentliche Rolle zu spielen (Nolan et al., 2011). Insulinresistenz stellt einen wesentlichen Faktor in der Pathogenese des T2D dar, so dass die Insulinwirkung an den Zielgeweben (Skelettmuskel, Leber, Fettgeweben) vermindert wird, die Glucoseaufnahme in den peripheren Zielgeweben gestört und der Glucosemetabolismus der Leber beeinträchtigt ist. Die genauen molekularen Faktoren und Mechanismen, welche zur Entstehung einer Insulinresistenz führen, sind bis heute noch nicht vollständig geklärt. Verschiedene Faktoren sind an der Entwicklung der Insulinresistenz beteiligt, zu denen die genetischen Faktoren, Adipositas, Ernährung und Fettverteilung gehören. Die Adipositas ist mit einer Insulinresistenz assoziiert und durch eine abnorme Vergrößerung des Fettgewebes gekennzeichnet. In den Adipozyten geht eine erhöhte Lipolyseaktivität mit einer vermehrten Freisetzung von freien Fettsäuren (FFA) und Glycerol einher (Cusi, 2010). Neben den FFA wird die Menge der freigesetzten Adipozytokine (Leptin und Resistin) von Adipozyten erhöht, wodurch die Insulinresistenz verstärkt wird (Boden Shulman, 2002; Kasuga, 2006). In verschiedenen Studien wurde festgestellt, dass von Adipozyten und Immunzellen sekretierte proinflammatorische Zytokine, z. B. Tumornekrosefaktor α (TNF α), Interleukin-1 β (IL-1 β), eine wichtige Rolle in diesem Zusammenhang spielen (Schinner et al., 2005). Als molekularer Mechanismus der Insulinresistenz wird eine Störung in der Insulin-Signalkaskade angenommen. Der chronisch erhöhte Plasmaspiegel an FFA gilt als Ursache für die Entstehung einer Insulinresistenz und führt dadurch zu einer erhöhten intrazellulären Lipidakkumulation (Ceramide, Diacylglycerol [DAG], Triglyceride [TG]) in Muskel, Leber und weiteren Geweben und damit zur Störung des Insulin-Signalweges (Langeveld Aerts, 2009). Neben dem Grad der Adipositas scheint auch die Fettverteilung eine wichtige Rolle zu spielen. Die androide oder viszerale Adipositas (Bauchfett) ist ein starker Risikofaktor für Insulinresistenz durch eine erhöhte Catecholaminempfindlichkeit, während Individuen mit einer gynoiden Adipositas (Hüftfett) keine Insulinresistenz aufweisen (Kahn, 2003). Zur Kompensation der Insulinresistenz erfolgt eine dauerhaft erhöhte Insulinausschüttung und Steigerung der β -Zellmasse (Araujo et al., 2013). Durch diesen Prozess kann die Glucosetoleranz aufrechterhalten werden. Die Hyperinsulinämie trägt zur Verschlechterung der Insulinresistenz bei. Neben der verminderten Insulinwirkung wird für die Entwicklung des T2D eine β -Zelldysfunktion beschrieben, die durch eine gestörte Insulinsekretion und eine relative Verminderung der β -Zellmasse gekennzeichnet ist (Prentki Nolan, 2006). Die Reduktion der β -Zellmasse tritt als Spätstadium des T2D auf (Abb. 1.1.2). Eine mögliche Ursache des β -Zellverlusts stellt die erhöhte Apoptoserate dar.

Unterschiedliche Mechanismen, die zum β -Zellverlust führen, werden in der vorliegenden Arbeit diskutiert.

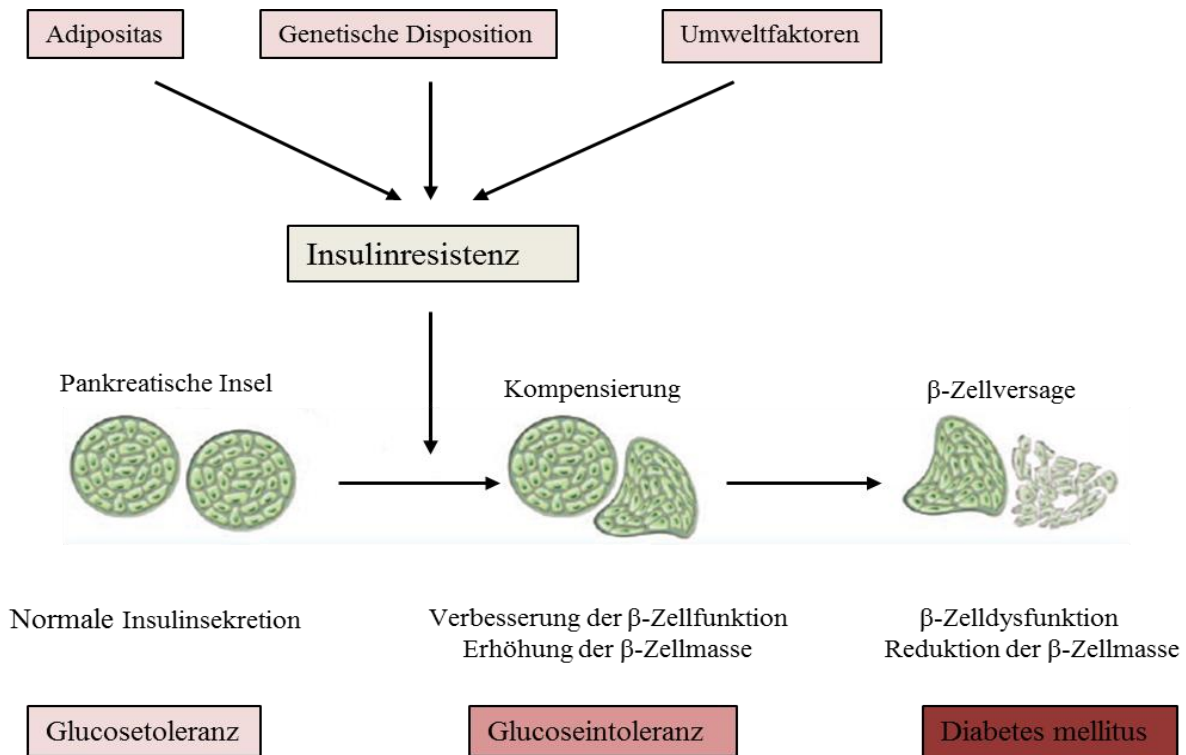


Abbildung 1.1.2: Pathogenese des T2D. Unter Einfluss verschiedener Faktoren entsteht eine Insulinresistenz. Zur Kompensation der Insulinresistenz erfolgt eine Steigerung der pankreatischen β -Zellmasse und eine erhöhte Insulinausschüttung. Als Folge kommt es zu einem β -Zellversagen und damit zur Entwicklung des T2D. Modifiziert nach (Kasuga, 2006)

T2D erhöht zudem die Wahrscheinlichkeit an Folgeerkrankungen. Zu denen gehören sowohl Mikroangiopathien vorwiegend an Augen, Nieren und Nervenzellen als auch Makroangiopathien an Herz, Gehirn und peripheren Arterien. Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die Hauptursachen der erhöhten Morbidität und Mortalität der Diabetiker, wobei koronare Herzkrankheit, Herzinfarkt, Schlaganfall und arterielle Hypertonie am häufigsten auftreten.

1.2 Insulin

Insulin ist ein Peptidhormon, welches eine entscheidende Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Blutglucosekonzentration hat. Es besteht aus zwei Peptidketten: einer A-Kette mit 21 Aminosäuren sowie einer B-Kette mit 30 Aminosäuren. Die beiden Ketten sind durch zwei Disulfidbrücken miteinander verknüpft, eine dritte Disulfidbrücke verbindet die Cysteinreste der Positionen 9 und 11 der A-Kette (Derewenda et al., 1989). Die Insulinsynthese und Sekretion erfolgt in den β -Zellen der

Langerhans'schen Inseln, die im endokrinen Teil des Pankreas liegen. Das Insulingen liegt auf dem kurzen Arm des Chromosoms 11. Das Insulin wird über eine Vorstufe des Insulins synthetisiert: Präproinsulin besteht aus einer Signalsequenz, einer A-Kette, einer B-Kette und einer C-Kette. Durch Abspaltung der Signalsequenz des Präproinsulins im rauen endoplasmatischen Retikulum der pankreatischen β -Zellen entsteht das Proinsulin (inaktive Form). Bei Bedarf wird die C-Kette des Proinsulins durch spezifische Peptidasen abgespalten, damit das Insulin aktiviert wird. Die Insulinmoleküle werden in den Vesikeln des Golgi-Apparates durch Zink-Ionen zu Hexameren gebunden und so stabilisiert gespeichert (Zink-Insulin-Komplex) (Schatz, 1977). Die Steuerung der Insulinsekretion ist von der Glucosekonzentration abhängig; durch Erhöhung der extrazellulären Glucosekonzentration wird die Insulinsekretion stimuliert. Außerdem wird die Insulinsekretion durch die Anwesenheit verschiedener Aminosäuren und FFA sowie einiger gastrointestinaler Hormone wie Gastrin, Sekretin und den Inkretinhormonen GIP (glucose-dependent insulintropic polypeptide) und GLP-1 (glucagon-like peptide 1) gefördert.

Insulin vermittelt seine Wirkung durch die Bindung an den Insulinrezeptor an den Zielgeweben Leber, Muskeln und Fettgewebe und aktiviert damit die intrazelluläre Signalkaskade. In Muskeln und Fettgewebe fördert Insulin die Translokation des Glucosetransportproteins GLUT4 zur Zelloberfläche. Dieses Protein sorgt dafür, dass Glucose durch erleichterte Diffusion in das Cytoplasma der Zellen aufgenommen wird.

Bei Hepatozyten erfolgt die Glucoseaufnahme insulinunabhängig über GLUT2-Transporter. Durch Insulin werden Aminosäuren und Fettsäuren in den Zellen verstärkt aufgenommen. Insulin fördert die Lipogenese, die Glykogen- und Proteinsynthese in der Leber und den Muskeln und hemmt gleichzeitig den Protein- und Glykogenabbau sowie die Glukoneogenese. Des Weiteren wird durch Insulin die Lipolyse im Fettgewebe gehemmt. Somit kommt es zu einer Verminderung der FFA im Blut (Chang et al., 2004; Pilkis Granner, 1992). Die Regulation des Zellwachstums ist eine weitere zentrale Funktion des Insulins. Außerdem beeinflusst Insulin auch die β -Zellen selbst (Leibiger et al., 2008).

1.2.1 Insulin-Signaltransduktion

Die Effekte von Insulin werden über die Bindung an den Insulinrezeptor (IR) auf der Zelloberfläche der Zielgewebe Leber, Muskel und Fett initiiert. Durch die Insulinbindung wird der IR aktiviert und intrazelluläre Kaskaden eingeschaltet. Der IR ist ein Transmembranrezeptor, welcher aus zwei α -Untereinheiten und zwei β -Untereinheiten zusammengesetzt ist und zur Familie der rezeptortyrosinkinasen (RTK) gehört (Keller Lienhard, 1994). Die beiden α - und β -Untereinheiten sind jeweils durch eine Disulfidbrücke kovalent miteinander verbunden. Insulin kann an seine extrazelluläre Bindungsstelle der α -Untereinheiten binden, wodurch eine Konformationsänderung des

Rezeptors ausgelöst und die Tyrosinkinaseaktivität der β -Untereinheiten aktiviert wird. Die Aktivierung der Rezeptorkinase führt zur Autophosphorylierung der Tyrosinreste und zur Initiierung der intrazellulären Signalkaskade. Die Weiterleitung der Signaltransduktion in die Zelle erfolgt über die Phosphorylierung intrazellulärer Proteinsubstrate, wie z. B. Insulinrezeptorsubstrate (IRS) und SHC-Protein (SH2-containing protein). IRS-Proteine bestehen aus mehreren Tyrosinphosphorylierungsmotiven, an die SH2-Domänen verschiedener Signaltransduktionsproteine binden können und dadurch aktiviert werden (Keller Lienhard, 1994). Die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) stellt eine der wichtigsten nachgeschalteten Kinasen der IRS-Proteine dar. PI3K besteht aus einer regulatorischen (P85) und einer katalytischen Untereinheit (P110) und phosphoryliert verschiedene Signalmoleküle wie die Phosphatidylinositol-abhängige Kinase (PDK) (Kido et al., 2001). Dadurch kann die Proteinkinase B (PKB), die auch als Akt bezeichnet wird, phosphoryliert und aktiviert werden und damit die vielfältige Insulinwirkung vermitteln. Die Glycogensynthese-Kinase3 (GSK3) wird durch die phosphorylierte Akt je nach α - oder β -Isoform an Serin21 oder 9 phosphoryliert, wodurch die Glykogensynthese (GS) inaktiviert und die Inhibierung der Glykogensynthese aufgehoben wird. Außerdem kann GSK3 den eukaryotischen Initiationsfaktor 2B (eIF-2B) inhibieren, was die Proteinsynthese aktiviert. Die Aktivierung von Akt durch Insulin führt außerdem zu einer Anschaltung von mTOR (mammalian target of rapamycin) (Schinner et al., 2005; Whiteman et al., 2002), die eine Serin/Threonin-Kinase ist und von TSC1 und TSC2 (tuberous sclerosis complex) negativ reguliert wird. TSC2 wird über Akt phosphoryliert und inaktiviert und anschließend wird mTOR aktiviert.

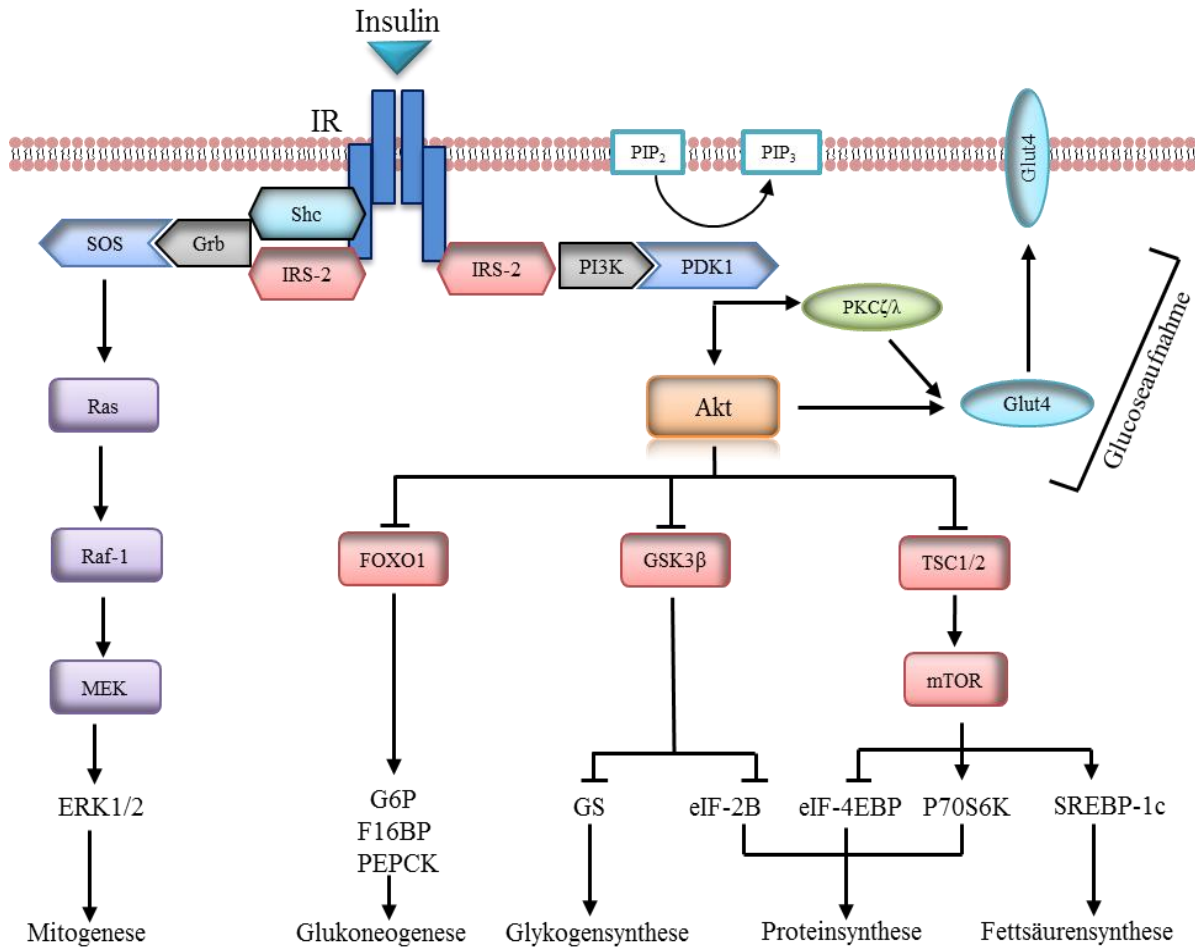


Abbildung 1.2.1: Schematische Darstellung der Insulin-Transduktion.

Die beiden wichtigsten mTOR-Effektoren sind die P70 ribosomale S6-Kinase (P70S6K) und das an den eukaryotischen Initiationsfaktor 4E bindende Protein (eIF-4EBP) (Xie Herbert, 2012). Diese Faktoren sind in der Lage, die Proteolyse, Translation und die Proteinsynthese zu regulieren. Außerdem kann mTOR den Transkriptionsfaktor SREBP1c (“Sterol regulatory element-binding protein 1c“) aktivieren. SREBP1c reguliert die Fettsynthese durch die Induktion der Genexpression und hemmt die Glukoneogenese (Hagiwara et al., 2012). Der Transkriptionsfaktor forkhead box 1 (FOXO1) befindet sich unter basalen Bedingungen im Zellkern. FOXO1 wird durch die phosphorylierte Akt an Serin/Threonin-Resten (Serin319, Serin256 und Threonin24) phosphoryliert, wodurch diese Kinase inaktiviert wird und vom Zellkern ins Cytosol transloziert. FOXO-Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Induktion von Proteinen, die den Glucosemetabolismus und die Apoptose beeinflussen (Lam et al., 2006). Durch FOXO wird die Expression der an der Glukoneogenese beteiligten Enzyme Glucose-6-Phosphatase (G6Pase) und Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK) induziert (Langeveld Aerts, 2009). Über den Signalweg IRS/PI3K wird die GLUT4-Translokation induziert, was zu einer Steigerung der insulinabhängigen Glucoseaufnahme in

das Muskelgewebe und in die Adipozyten führt (Chang et al., 2004). Darüber hinaus kommt es durch die Aktivierung der atypischen Proteinkinase C (aPKC λ/ζ) zu einer Erhöhung der GLUT4-Translokation (Chang et al., 2004; Whiteman et al., 2002).

Die MAP-Kinasekaskade (mitogen-activated protein kinase) ist neben der PI3K der zweite wichtige Signalweg des Insulins. Sowohl IRS als auch Shc binden am IR, und die MAPK wird durch die Bindung des Adapterproteins Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2) über die SH2-Domäne an die autophosphorylierte IRS und Shc aktiviert. Grb2 bindet mSOS (mammalian son of sevenless), welches anschließend das Ras, ein GTP-Bindungsprotein mit GTPase-Aktivität, aktiviert. Die GTP-bindende Form von Ras aktiviert die Raf-1-Kinase, was wiederum zu einer Aktivierung der MEK-Kinase (MAPK-Effektor-Kinase) führt. MEK kann dann die extrazellulär regulierte Kinase 1/2 (ERK1/2) an Serin/Threonin-Resten phosphorylieren (Langeveld Aerts, 2009). ERK 1/2 kann die p60 R6-Kinase aktivieren und in den Zellkern translozieren, wo sie verschiedene Transkriptionsfaktoren regulieren kann, die an Zellwachstum, Zellproliferation und Zelldifferenzierung beteiligt sind (McCubrey et al., 2007).

1.2.2 Insulinwirkung in den β -Zellen

Aktuelle Forschungsergebnisse der letzten Jahre haben gezeigt, dass Insulin unterschiedliche zelluläre Prozesse in den β -Zellen wie die Regulation der Insulingentranskription, Translokation, Ca²⁺-Einstrom, β -Zellproliferation und -überleben positiv beeinflusst.

Die β -Zellmasse resultiert vor allem aus balancierter Regulation zwischen Proliferation und Überleben der β -Zellen, was durch die Insulin-Signalkaskade reguliert wird (Paris et al., 2003). Insulin vermittelt den mitogenen Effekt durch die Bindung an IR. Insulin vermittelt seine Wirkung hauptsächlich über zwei Isoformen des Insulinrezeptors, IR-A und IR-B. Darüber hinaus kann Insulin auch an den Insulin-like growth factor receptor 1 (IGF-1R) binden. IR-Knockout-Mäuse (β IRKO) zeigten eine Reduktion der β -Zellmasse und eine erhöhte Auffälligkeit für die Entwicklung des Diabetes (Ohsugi et al., 2005; Okada et al., 2007). Außerdem sind vier Isoformen des IRS (1-4) in den β -Zellen identifiziert. Die mitogene Wirkung des Insulins in β -Zellen wird über IRS-2 vermittelt, wohingegen IRS-1 die Insulinsekretion reguliert. Die erhöhte Expression von IRS-2 in den β -Zellen trägt zum Überleben und zur Proliferation der β -Zellen bei (Dickson Rhodes, 2004). Die PI3K/Akt-Signalkaskade nimmt eine zentrale Position in der Regulation der zellulären Proliferation und Apoptose durch Insulin ein (Lawlor Alessi, 2001). Die phosphorylierte Akt in den β -Zellen besitzt eine proliferative, anti-apoptotische Wirkung. Die Überexpression der aktivierten Form von PKB α in den β -Zellen von transgenen Mäusen führt zur Zunahme der β -Zellmasse durch die Erhöhung der Proliferationsrate und Zellgröße (Tuttle et al., 2001). Außerdem führt die Ablation von PDK1, durch

Akt aktiviert, zu einer Abnahme der β -Zellmasse (Leibiger et al., 2008). Die Deaktivierung der FOXO durch Akt bewirkt die Proliferation der β -Zellen durch die Regulation des Zellzyklus. Darüber hinaus trägt diese Überexpression von dauerhaft aktiven Formen von FOXO zum programmierten Zelltod (Apoptose) durch die Aktivierung von verschiedenen pro-apoptischen Genen bei (Lam et al., 2006).

Pancreatic duodenal homeobox 1 (PDX-1) ist ein Transkriptionsfaktor, der eine entscheidende Rolle für die Entwicklung und Funktion des Pankreas hat. PDX-1 reguliert die Transkription der Insulingene und der β -Zelldifferenzierung (Dickson Rhodes, 2004). Durch phosphoryliertes FOXO wird PDX-1 vom Cytoplasma in den Zellkern transloziert und aktiviert, was zur Proliferation der β -Zellen führt (Johnson et al., 2006). Außerdem ist PDX-1 in die Regulation der Insulingene sowie Glut2 und Glucokinase involviert, die am Glucosetransport und -metabolismus beteiligt sind (Blyth, 2012). GSK3 β wird durch die aktivierte Akt phosphoryliert und damit deaktiviert, wodurch die Glykogensynthese und Proliferation der β -Zellen reguliert wird (Rayasam et al., 2009). Die inaktivierte GSK3 führt zu einer Steigerung der Cyclin-D1-Ebene in Inselzellen, wodurch sie den Übergang von Zellen aus der G1-Phase des Zellzyklus in die S-Phase fördert; dies hat eine β -Zellproliferation zur Folge (Z. Liu et al., 2008). Die durch Insulin/IGF-1 stimulierte Akt kann den Signalweg mTOR/S6K aktivieren und dadurch eine Steigerung der Proteinsynthese und des Zellwachstums der β -Zellen hervorrufen. Die Inhibierung von mTOR durch Rapamcyin führt zu einer Hemmung der Akt-induzierten β -Zellexpansion und -größe sowie zu einer gesteigerten Proliferation (Balcazar et al., 2009). Die MAPK ist an den mitogenen Insulin-Effekten beteiligt. MAPK-Signalkaskaden (Ras/Raf, MEK, ERK1/2) werden durch Insulin aktiviert, wodurch es zur Steigerung der β -Zellproliferation und zur Hemmung der Apoptose der β -Zellen führt (Alejandro Johnson, 2008; Beith et al., 2008). Die insulin-aktivierte PI3K kann PKCs aktivieren und somit die β -Zellmasse regulieren (Vasavada et al., 2007). Das freigesetzte Insulin beeinflusst nicht nur die β -Zellmasse, sondern auch die Insulinbiosynthese in den β -Zellen. Insulin führt zur Induktion des Insulingens in HIT-Zellen und MIN-6 Zellen sowie in Ratten-Inseln durch die Aktivierung der IRS-2/PI3K/P70S6K und CaMKII-Signalwege (Leibiger et al., 1998; Ohsugi et al., 2005; Persaud et al., 2008). Im Gegensatz dazu wurde in einer Vielzahl von Studien gezeigt, dass Insulin einen negativen oder keinen Effekt auf die Insulinbiosynthese hat (Leibiger et al., 2008). Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass die Insulinexozytose durch das freigesetzte Insulin gehemmt wird, wohingegen in anderen Studien gezeigt wurde, dass Insulin selbst die Insulinsekretion aus β -Zellen stimuliert, so dass Insulin an IR bindet und den IRS-1/PI3K-Signalweg aktiviert, welcher zur Freisetzung von Calcium-Ionen aus dem ER ins Cytosol und dadurch zur Exozytose der Insulingranula führt (Aspinwall et al., 2000; Persaud et al., 2002; Roper et al., 2002). Ein anderer Signalweg der Insulinsekretion führt über die Induktion des IRS2 durch IGF-1 oder Insulin zur Aktivierung von PI3K und dadurch zur Bildung von

Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP3) mit nachfolgender Öffnung von Kaliumkanälen (Leibiger et al., 2008).

1.3 Die Akt-Kinase

1.3.1 Die Aktivierung der Akt-Kinase

Die Akt ist eine Serin-Threonin-Kinase, die vielfältige Prozesse wie Zellproliferation, Zellapoptose, Zellwachstum und Zellmetabolismus reguliert. Drei Isoformen des Proteins Akt sind bekannt: Akt1, Akt2, Akt3 (PKB α , PKB β , PKB γ), welche zu 80 % identische Aminosäuren aufweisen. Jede der Isoformen beinhaltet eine Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH-Domäne) am N-Terminus, eine katalytische Domäne und eine regulatorische Domäne am C-Terminus (Abb. 1.3.1) (Elghazi et al., 2006). Die Akt-Kinase wird durch RTK wie Insulin und IGF-1 oder G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktiviert. Die aktivierte PI3K phosphoryliert andere membranständige Phosphoinositide, insbesondere Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2), an der dritten Position des Inositolringes, wobei PIP3 entsteht. PIP3 als second messenger bindet an die PH-Domäne der Zielproteine Akt-Kinase und PDK1 und führt dadurch zur Translokation von Akt vom Cytosol zur Plasmamembran (Dickson Rhodes, 2004; Elghazi et al., 2006). Für die volle Aktivierung der PKB ist eine Phosphorylierung an Ser473 und Thr308 erforderlich (Dickson et al., 2001). PDK1 vermittelt die Phosphorylierung von Akt an Thr308. Ebenso erfolgt eine Phosphorylierung an Ser473 durch die mTORC2, die auch als PDK2 bezeichnet wird. Die phosphorylierte Akt-Kinase kann durch die Kinase-Domäne der Substrate mit der Konsensussequenz R-X-R-X-X-S/T-B phosphoryliert werden (Brazil et al., 2004; Dickson Rhodes, 2004). Das Tumorsuppressor-Protein PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10) ist eine Lipidphosphatase und führt durch Hydrolyse von PIP3 zu PIP2. Dadurch wird die Fähigkeit des PI3K-vermittelten Signals unterbrochen und die Aktivität der Akt-Kinase verhindert. SH2-domain containing inositol-5'-phosphatase (SHIP) kann auch PIP3 in PIP2 umwandeln und anschließend die PI3K-Aktivität reduzieren. Die Akt-Kinase kann noch über die Aktivierung der Protein-Phosphatase 2A (PP2A) dephosphoryliert und deaktiviert werden. Des Weiteren kann PHLPP (PH domain leucine-rich repeat phosphatase) die Dephosphorylierung der Akt an Ser473 vermitteln (Elghazi et al., 2006; Liao Hung, 2010). Ferner kann die Aktivierung von Akt auch durch die Bindung von TRB3 (Tribbles homolog 3) verhindert werden (B. Qian et al., 2008).

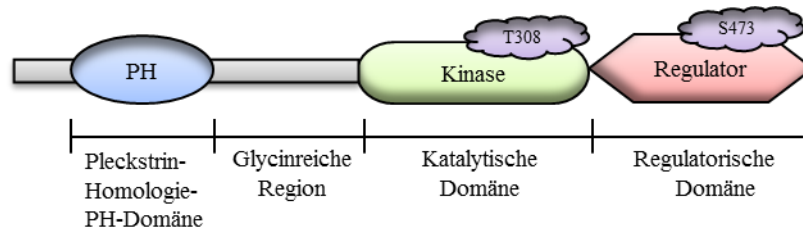


Abbildung 1.3.1: Schematische Darstellung der humanen PKB- Domänen. Modifiziert nach (Elghazi et al., 2006)

1.3.2 Bedeutung der Akt-Kinase in der Apoptose

Durch die Substrate von Akt werden hauptsächlich der Zellzyklus und der kontrollierte Zelltod beeinflusst. Akt kann durch die Aktivierung von anti-apoptischen Proteinen beziehungsweise durch die Inhibierung pro-apoptischer Proteine die Apoptose hemmen. Eine besondere Bedeutung bei der Inhibierung der Apoptose spielt die Bcl-2-Familie. Bcl-2 und Bcl-XL-Proteine schützen die Zellen, während Bax und Bad den Zelltod fördern. So bindet Bad an Bcl-XL an der Mitochondrienmembran, wodurch der anti-apoptische Effekt von Bcl-XL blockiert wird, was dann zum Zelltod führt. Die aktivierte Akt kann direkt Bad an Ser112 und Ser136 phosphorylieren, was zu einer Dissoziation von Bcl-XL und einer anschließenden Bindung an cytoplasmatische 14-3-3-Proteine führt, wodurch der Zelltod gehemmt wird (Dickson Rhodes, 2004). Weiterhin kann Akt die Caspase 9 durch Phosphorylierung inaktivieren und dadurch die pro-apoptische Wirkung von Caspase 9 hemmen (Elghazi et al., 2006). Des Weiteren kann Akt die erhöhte Expression des Caspase 8-Inhibitors (FLICE-Inhibitory Protein) sowie die Caspase-Inhibitoren IAPc-Familie (inhibitor of apoptosis protein) und (IAPs)-Familie durch direkte Bindung hemmen und dadurch die Apoptose verhindern (Dickson Rhodes, 2004). So inhibiert Akt die Apoptose nicht nur direkt, sondern auch indirekt über eine Modifikation von Transkriptionsfaktoren, die an der Apoptose beteiligte Gene regulieren. Die Überexpression von FOXO führt zum programmierten Zelltod durch die Aktivierung von verschiedenen an der Apoptose beteiligten Proteinen. Dazu gehören die pro-apoptischen Mitglieder der Bcl-2-Familie Bim und Bcl-6. Außerdem induziert FOXO verschiedene Zytokine, welche an der Apoptose beteiligt sind, wie Fas-Ligand, TRAIL (TNF-related apoptosis-including ligand) und TRADD (TNF receptor type 1-associated death domain) (Glauser Schlegel, 2007; Lam et al., 2006). Der Transkriptionsfaktor NF- κ B wird durch die Akt-Kinase indirekt über die Phosphorylierung von I κ B-Kinase (IKK) an Thr23 reguliert. NF- κ B induziert wiederum die Transkription von anti-apoptischen Proteinen. Darüber hinaus führt die Inaktivierung von Ask-1 (apoptosis-signal regulating kinase 1) durch Akt zu einer Reduktion der JNK-Aktivität (C-Jun N-terminale Kinasen) und somit zur Hemmung der Apoptose (Brazil et al., 2004; Lawlor Alessi, 2001).

1.3.3 Bedeutung der Akt-Kinase in der Proliferation

Insulin und Wachstumsfaktoren führen zur Zellproliferation durch eine Aktivierung der Akt-Kinase. Akt agiert als ein zentraler Regulator von Zellwachstum und Proliferation durch ihre Substrate, welche die Progression des Zellzyklus beeinflussen. GSK β reguliert Proteine (Cyclin D1, c-Myc und β -catenin), welche am Zellzyklus und somit an der Proliferation beteiligt sind (Diehl et al., 1998; Tarabra et al., 2012). Durch GSK3 β wird Cyclin D1 an Thr286 phosphoryliert, was zu einer Translokation von Cyclin D1 vom Zellkern ins Cytoplasma führt, wo es abgebaut wird. So führt die Inaktivierung der GSK β durch Akt zur Hemmung des Abbaus von Cyclin D1, wodurch die Ebene der Transkription, Translation und Proteinstabilität kontrolliert wird. Des Weiteren führt GSK β zur Hemmung des Zellzyklusinhibitors P21^{Cip1}. Der Transkriptionsfaktor c-Myc ist ein wichtiges Target von GSK β und führt durch den Übergang von Zellen aus der G1-Phase des Zellzyklus in die S-Phase zur Progression des Zellzyklus. Ein weiteres Substrat von GSK β ist eIF-2B, das durch GSK β gehemmt wird und die Proteinsynthese aktiviert (Rayasam et al., 2009). Durch Akt aktiviertes mTOR stimuliert das Zellwachstum und die Proliferation durch P70S6K und 4E-BP1 (Xie Herbert, 2012). Akt reguliert auch die Progression des Zellzyklus durch die Phosphorylierung der Zellzyklus-Inhibitoren P21^{Cip1} an Thr145 und P27^{kip1} an Thr187, was auch zu einer verstärkten Lokalisation im Cytoplasma und einer Aufhebung der Inhibition des Zellzyklus über die Hemmung von Cyclin E und der cyclinabhängigen Kinase 2 (CDK2) führt (Zhou et al., 2001). CREB (cAMP response element binding protein) wird durch Akt phosphoryliert, wodurch Mitogenese und Proliferation der β -Zellen gesteigert werden (Jhala et al., 2003). Darüber hinaus wird der Zellzyklus durch FOXO-Transkriptionsfaktoren reguliert. So konnte bei einer Überexpression von aktiven Formen von FOXO die Expression des CDK-Inhibitors P27^{kip1} induziert und damit der G1/S-Übergang des Zellzyklus gehemmt werden (Glauser Schlegel, 2007). Akt induziert die Phosphorylierung von Ubiquitin-ligase Mdm2 (murine double minute 2), was zu einer Translokation der Mdm2 vom Cytoplasma in den Zellkern führt. Hier wird das P53-Tumorsuppressor-Protein (vermittelt Transkription pro-apoptotischer Gene) proteosomal abgebaut, was zur Zellproliferation und zum Wachstum führt (Liao Hung, 2010).

1.4 Regulation der β -Zellmasse

Die pankreatische β -Zellmasse wird im physiologischen Zustand durch vier Mechanismen im Gleichgewicht gehalten:

- β -Zellreplikation
- β -Zellneogenese
- β -Zellgröße

- β -Zellapoptose

Die pankreatische β -Zellproliferation wird durch ein komplexes Zusammenspiel zwischen Cyclinen, CDK und CDK-Inhibitoren (CDKI) reguliert. Die Cycline D1 und D2 werden in β -Zellen exprimiert und spielen eine bedeutende Rolle in der Regulation der β -Zellproliferation. Während CDK2 und CDK6 durch Cyclin D1, D2 aktiviert werden, wird CDK4 durch Cyclin E aktiviert. Auch in β -Zellen stellt die CDK4 einen wesentlichen Regulator des β -Zellzyklus dar (Tarabra et al., 2012). Die Überexpression von CDK4 führt zu einer Steigerung der β -Zellproliferation. Zwei Gruppen von CDK-Inhibitoren werden in Inseln exprimiert: INK4-Proteine (P16, P15, P18 und P19, CDK 4 und 6 Inhibitoren) und CIP/KIP-Proteine (P21, P27 und P57). P27 ist der wichtigste Zellzyklus-Inhibitor, der eine entscheidende Rolle in der Regulation der β -Zellmasse spielt. P27-defiziente Mäuse zeigen eine Verbesserung der Glucosetoleranz sowie eine erhöhte β -Zellmasse und Proliferation (Rachdi et al., 2006). Außerdem wurde nachgewiesen, dass eine Akkumulation des P27 im β -Zellkern bei diabetischen Mäusen *db/db* und defizienten Mäusen von IRS-2 (*Irs^{-/-}*) stattfindet und somit zu einer Reduktion der β -Zellmasse führt (Uchida et al., 2005).

Die Steigerung der β -Zellmasse geschieht sowohl unter physiologischen Bedingungen (Schwangerschaft) als auch unter pathologischen Bedingungen (Adipositas). Die Adipositas scheint einen Risikofaktor für eine Insulinresistenz darzustellen, welche zur Zunahme der β -Zellmasse durch die Steigerung der β -Zellproliferation und Hypertrophie führt und kompensiert somit den erhöhten Insulinbedarf. Bei nichtdiabetischen, adipösen Nagetieren konnte im Vergleich mit schlanken Tieren eine Steigerung der β -Zellmasse durch eine erhöhte Proliferation beobachtet werden (Karasawa et al., 2009). Autopsiestudien an humanem Pankreas konnten auch zeigen, dass bei adipösen Nichtdiabetikern gegenüber schlanken Personen eine Expansion der β -Zellmasse auftritt (Saisho et al., 2013).

Verschiedene Faktoren sind in die Regulation der β -Zellmasse involviert. Insulin reguliert die β -Zellmasse durch verschiedene Signalwege. Dabei spielt der IRS-2/PI3K eine bedeutende Rolle in der Vermittlung der mitogenen und anti-apoptotischen Wirkung des Insulins. Glucose ist der wichtigste physiologische Regulator der β -Zellfunktion und β -Zellmasse. So induziert die Glucose in Konzentrationen zwischen 5,5 - 11 mM eine Steigerung der β -Zellproliferation mit gleichzeitiger Hemmung der Apoptose (Paris et al., 2003). Dies geschieht über die erhöhten intrazellulären cAMP- und Ca^{2+} -Spiegel mit nachfolgender Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) sowie der Ras/Raf/MEK-Signalkaskade, wodurch ERK1/2 und andere MAPK-Wege aktiviert werden (Lingohr, Buettner, et al., 2002). Die proliferativen und anti-apoptotischen Effekte der Glucose werden auch über den Transkriptionsfaktor CREB vermittelt, der von PKA phosphoryliert wird. Durch CREB wird der IRS-2/Akt-Signalweg aktiviert (Jhala et al., 2003). Der mTOR-Signalweg kann durch einen erhöhten Glucosespiegel sowohl direkt als auch indirekt aktiviert werden. Die indirekte Aktivierung erfolgt

über die ansteigende Konzentration intrazellulärer ATPs, das nachfolgend zur Inaktivierung der AMPK (AMP-activated protein kinase) führt und so inhibitorisch auf den mTOR-Signalweg wirkt (Chang-Chen et al., 2008). Ebenfalls beschrieben ist, dass in die Regulation der β -Zellmasse die PKCs involviert sind. PKC ζ , ein Isoenzym der PKC-Familie, fördert die β -Zellreplikation, wohingegen PKC δ , ein weiteres Isoenzym der PKC-Familie, pro-apoptotisch wirkt (Schmitz-Peiffer Biden, 2008). Glucose löst eine Erhöhung intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentrationen aus. Ca^{2+} bindet an Calcineurin-phosphatase (Cn) und aktiviert diese dadurch, was zu einer Dephosphorylierung des Transkriptionsfaktors NFAT (nuclear factor of activated T-cell) führt, der in den Zellkern transloziert. So kann Glucose eine Erhöhung der β -Zellmasse herbeiführen (Heit et al., 2006; Tarabra et al., 2012). Des Weiteren vermittelt Glucose das Wachstum und Überleben der β -Zellen vermutlich auch durch die Stimulation der Insulinsekretion und anschließender Aktivierung des Insulin-Signalweges (Assmann et al., 2009). IGF-1 bindet an seinem Rezeptor IGF-1R und löst eine Autophosphorylierung des Rezeptors durch intrinsische Tyrosinkinase-Aktivität der IGF-1R- β -Untereinheit aus, an die phosphorylierten Tyrosinreste des Rezeptors lagern sich IRS an, die dann selber durch die Tyrosinkinaseaktivität der β -Untereinheit des Rezeptors an Tyrosin-Resten phosphoryliert werden. Der mitogene Effekt von IGF-1 wird über die PI3K und den PKB/Akt-Weg sowie den ERK1/2-Signalweg vermittelt (Chang-Chen et al., 2008; F. Ma et al., 2011). Darüber hinaus werden durch PKB/Akt anti-apoptotisch wirkende Effekte vermittelt, so z. B. die Phosphorylierung und Inaktivierung der Caspase 9, eine Hemmung der GSK3 und die Hemmung von FOXO-Transkriptionsfaktoren (Chang-Chen et al., 2008). Die Inkretinhormone GIP und GLP-1 sind auch an der Regulierung der Proliferation und Apoptose der β -Zellen beteiligt. GLP-1 und GIP fungieren synergistisch mit Glucose als Wachstums- und Anti-Apoptose-Faktor für die β -Zellen. Die Bindung von GLP-1 an den GLP-1R führt zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration; dadurch wird die PKA aktiviert, welche das CREB phosphoryliert. CREB kann die Expression von Cyclin D1 steigern und den Zellzyklus fördern (Friedrichsen et al., 2006; Jhala et al., 2003). GLP-1 stimuliert die Expression des IRS-2 und steigert somit die Insulinsensitivität, was zu einer erleichterten Aktivierung der PI3K und seiner Downstream-Signalwege führt, z. B. Akt und PKC ζ , was zur β -Zellproliferation und β -Zellneogenese führt (X. Ma et al., 2014). Die aktivierte Akt ihrerseits stimuliert andere Signalmoleküle, infolgedessen wird die β -Zellproliferation gefördert (z. B. FOXO, PDX-1) und die β -Zellapoptose gehemmt (Bcl-2-Aktivierung, Caspase 3-Inhibierung). Die Aktivierung des GLP-1R führt auch zur Akt-Aktivierung durch die Transaktivierung des Epidermal-Growth-Factor-Rezeptors (EGFR) (Buteau et al., 2003). Außerdem ist die MAPK (P42 und P44) bei der durch GLP-1-induzierten β -Zellproliferation involviert (Friedrichsen et al., 2006). Die Erhöhung der Konzentration von Ca^{2+} durch GLP-1 führt zur Aktivierung des Calcineurin/NFAT-Signalweges und somit zur Mitogenese (Heit et al., 2006). GIP reguliert auch die β -Zellmasse durch cAMP- und PI3K/Akt-Signalwege (Friedrichsen et al., 2006).

Es wurde nachgewiesen, dass Wachstumshormon (GH) ebenfalls die β -Zellmasse reguliert (Lingohr, Buettner, et al., 2002). GH führt zu einer Aktivierung der Janus-Kinase-2-(JAK-2)/Signaltransduktor und Aktivator des Transkription-5-Signalweges (STAT5) zur Steigerung der mitogenen Prozesse (Brelje et al., 2004; F. Ma et al., 2011). STAT5 transloziert in den Zellkern, wo er die Gentranskription (Cyclin D1, D2) verstärkt und zur β -Zellmitogenese beiträgt (Chang-Chen et al., 2008; Lingohr, Buettner, et al., 2002). Außerdem induziert STAT5 die Expression des anti-apoptotischen Proteins (Bcl-x_L) und der Proteine der suppressor of cytokine signaling (SOCS)-Familie und ist somit an der Anti-Apoptose der β -Zellen beteiligt.

Bei schwangeren Nagern wird durch eine signifikante Steigerung der β -Zellproliferation und β -Zellgröße (Hypertrophie) eine Erhöhung der β -Zellmasse um das 2- bis 4-Fache beobachtet (Rieck Kaestner, 2010). Auch beim Menschen wird die β -Zellmasse während der Schwangerschaft durch die erhöhte Neogenese gesteigert (Butler et al., 2010). Innerhalb der ersten 10 Tage nach der Geburt vermindert sich die β -Zellmasse und sinkt infolge einer erhöhten β -Zellapoptose und gleichzeitiger Reduktion der β -Zellproliferation und -größe wieder auf das normale Niveau (Rieck Kaestner, 2010). Verschiedene Stimuli bedingen ursächlich die Expansion der β -Zellmasse in der Schwangerschaft vorwiegend durch die Hormone Plazentalaktogen (PL), Prolaktin (PRL) und GH (Vasavada et al., 2000). PL vermittelt die β -Zellproliferation über den intrazellulären JAK-2/STAT-5-Signalweg (Vasavada et al., 2000). Durch die Bindung von PRL an den PRL-Rezeptor werden mehrere intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert wie JAK-2/STAT-5, IRS/PI3K und MAPK; dies hat eine Zunahme der β -Zellmasse zur Folge (Amaral et al., 2004; Brelje et al., 2004).

Die microRNAs (miRNAs) sind kleine, kodierende RNA-Nukleotide, die als posttranskriptionelle Regulatoren der Genexpression in unterschiedlichste zelluläre Prozesse wie Proliferation, Apoptose und Differenzierung eingreifen. Die miRNAs sind in der Lage, an komplementäre m-RNA zu binden und so deren Translation oder Degradation zu regulieren oder zumindest zu beeinflussen (Bartel, 2004). Die Rolle von miRNAs bei der Regulation der β -Zellmasse ist noch nicht hinreichend aufgeklärt. Eine bestimmte miRNA-Sequenz (miR375) wurde in Langerhans-Inseln charakterisiert und ist maßgeblich an der Regulation der Insulinsekretion und β -Zellmasse beteiligt. Die miR375 spielt eine wichtige Rolle bei der Pankreasentwicklung und die Ablation der Expression von miR375 führt bei adipösen Mäusen (*ob/ob*) zum Verlust der β -Zellen (Poy et al., 2009). Zusätzlich scheint miR7a ein negativer Regulator der adulten β -Zellproliferation zu sein. Durch die Hemmung der miR7a wird die mTOR-Signalkaskade aktiviert und somit die β -Zellreplikation in adulten Inseln bei Mäusen gefördert (Y. Wang et al., 2013). Weiterhin wurde gezeigt, dass miR34a und miR146a an der Apoptose der β -Zellen beteiligt sind. Eine erhöhte Expression von miR34a und miR146a wird in den Inseln von diabetischen Mäusen (*db/db*) und nach der Stimulation der β -Zellen mit Palmitat

beobachtet. Daher vermindert die Behandlung mit anti-miR34a und anti-miR146a die Anzahl der apoptotischen Zellen, die durch Palmitat induziert werden (Lovis et al., 2008).

1.5 Mechanismen des β -Zellverlustes

Nach derzeitigem Kenntnisstand wird der β -Zellverlust durch verschiedene molekulare Mechanismen vermittelt.

Glucosetoxizität: Während physiologische Glucosekonzentrationen essentiell für die β -Zellfunktion und -differenzierung sind, besitzen chronische erhöhte Konzentrationen eine zusätzliche toxische Wirkung. Die chronische Hyperglykämie trägt zu einem Verlust der Sekretionskapazität der β -Zellen sowie zum Verlust der β -Zellmasse bei (Poitout Robertson, 2008). Der erhöhte Glucosespiegel ist mit einer verminderten Expression von Insulingenen und Transkriptionsfaktoren (PDX-1, BETA2/NeuroD und MafA) assoziiert, die an der Regulation der β -Zellreplikation beteiligt sind (Andrali et al., 2008). Der Mechanismus dieser Glucosetoxizität ist noch nicht vollständig geklärt. Der aufgrund einer chronischen Hyperglykämie ständig erhöhte Glucosemetabolismus in den β -Zellen verursacht eine mitochondriale Dysfunktion, die zu einer erhöhten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und Superoxiden sowie Stickstoffmonoxid (NO) führt (Bensellam et al., 2012). Durch oxidativen Stress können verschiedene Stresssignalwege aktiviert werden, darunter JNK, NF- κ B und die P38 (mitogen-aktivierte Proteinkinase) (Hou et al., 2008; Novotny et al., 2012). Diskutiert wird, dass β -Zellen eine starke Anfälligkeit gegenüber oxidativem Stress haben, da β -Zellen geringe Mengen von Antioxidantien wie Superoxiddismutase 1 und 2 (SOD1-2), Glutathionperoxidase (GPX1) und Katalase (CAT) exprimieren. Der oxidative Stress führt zur zellulären Schädigung, die eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung der Insulinresistenz und β -Zelldysfunktion sowie der Apoptose der β -Zellen spielt (Bensellam et al., 2012; Chang-Chen et al., 2008). JNK und P38 gehören zu der MAPK-Familie und werden vor allem als Antwort auf zelluläre Stressfaktoren, Zytokine und FFA aktiviert. JNK spielt eine zentrale Rolle bei der Insulinresistenz, β -Zelldysfunktion und Apoptose. Die Aktivierung von JNK durch verschiedene Stimuli kann die Transkription der Insulingene hemmen. Dies geschieht durch die Verminderung der Bindungsaktivität an dem Transkriptionsfaktor PDX-1 oder durch die Phosphorylierung der Ser/Thr-Reste in den IRS1/2, wodurch der Insulin-Signalweg gehemmt wird (Kaneto et al., 2005).

Ein weiterer Mechanismus, der über die Glucosetoxizität an pankreatischen β -Zellen ausgelöst wird, sind die ER-Stresssignalwege. Viele Studien weisen darauf hin, dass der ER-Stress eine Rolle bei der Pathogenese des T2D spielt, der aus β -Zellverlust und Insulinresistenz besteht (Eizirik et al., 2008). Die erhöhten ER-Stresssignalwege können sowohl in den Inseln von *db/db*-Mäusen als auch in humanen Inseln nachgewiesen werden (Laybutt et al., 2007). In den Membranen des ER sind drei

transmembrane Signalproteine lokalisiert, die mit dem ER-Chaperon GRP78 (glucose-regulated-protein 78; BiP) assoziiert sind. Diese Bindung wird durch Stressfaktoren aufgehoben und anschließend werden drei Signalwege aktiviert, die zur Akkumulation von ungefalteten Proteinen in dem ER-Lumen führen, die als „unfolded protein response“ (UPR) bezeichnet werden. Zu denen zählen die PERK (pancreatic ER-kinase), ATF6 (activating transcription factor 6) und IRE1 (inositol requiring enzyme 1). PERK phosphoryliert eIF-2 α (eukaryotic translation initiation factor-2 α) und hemmt somit die Proteintranslation und -akkumulation. Außerdem induziert der aktivierte eIF2 α die Translation bestimmter Transkriptionsfaktoren wie ATF4 (activating transcription factor 4), welcher wiederum zur Induktion von CHOP (C/EBP homologous protein) und ATF3 (activating transcription factor 3) führt. CHOP ist ein Transkriptionsfaktor und induziert die Apoptose sowohl durch die Reduktion der Expression von Bcl-2 und Bcl-X_L als auch durch die Induktion der Expression zahlreicher pro-apoptotischer Proteine wie Bax, Bak, Bim, Bik, PUMA und NOXA (J. Li et al., 2006; McCullough et al., 2001). ATF3 kann auch eine β -Zellapoptose durch die Inhibition der IRS-2-Aktivität induzieren (Chang-Chen et al., 2008). IRE1 hat eine Endoribonukleasefunktion und aktiviert XBP-1 (X-box binding protein) Die Überexpression von XBP-1 in Ratten-Inselzellen löst eine Reduktion der β -Zelldifferenzierung, Hemmung der GSIS und Erhöhung der β -Zellapoptoserate aus (Allagnat et al., 2010). IRE1 vermittelt den Zelltod durch die Bindung an TRAF2 (TNF-receptor associated factor 2) und aktiviert somit Ask-1, welche wiederum von JNK aktiviert wird, was zur Phosphorylierung und Aktivierung von c-Jun führt (Urano et al., 2000). Außerdem induziert IRE1 den Zelltod auch unabhängig von Mitochondrien oder Todesrezeptoren und läuft über die Aktivierung der Caspase-Kaskade und führt somit zur Apoptose (Yoneda et al., 2001). ATF6 ist ein Transkriptionsfaktor, der auch durch GRP78 reguliert wird. Nach Dissoziation von Chaperons transloziert ATF6 zum Golgi-Apparat, wo er durch Spaltung aktiviert wird. ATF6 lokalisiert in den Nukleus und initiiert dort die Transkription verschiedener Gene wie XBP-1 und GRP78. Der ATF6-vermittelte Signalweg ist noch nicht eindeutig als pro- oder anti-apoptotisch klassifiziert.

Das Polypeptid hIAPP (human islet amyloid polypeptide), auch Amylin genannt, ist ein Hormon des Pankreas und wird von den β -Zellen zusammen mit Insulin synthetisiert. Physiologische Funktionen sind die Regulation der Glucosehomöostase sowie die hemmende Wirkung auf die Magenentleerung. Bei T2D kommt es zu einer Akkumulation des hIAPP im extrazellulären Bereich des Pankreas, was eine entscheidende Rolle für die Zelltoxizität und den damit einen Verlust der β -Zellmasse spielt (Bensellam et al., 2012; C. J. Huang et al., 2007).

Eine dauerhafte Steigerung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration gilt zusätzlich als Mechanismus der Glucosetoxizität über die Aktivierung von ER-Stress-induzierten Signalwegen und der Bildung von ROS (S. E. Choi et al., 2007; Y. Wang et al., 2011) .

Durch hohe Glucosekonzentrationen wird der mTOR/S6K-Signalweg aktiviert und IRS-2 an Ser-Resten über einen negativen Rückkopplungsmechanismus phosphoryliert, wodurch der Insulin-Signalweg gehemmt wird (Elghazi et al., 2010).

Des Weiteren wird durch die Hyperglykämie eine Induktion von IL-1 β ausgelöst, was schließlich zu einem β -Zelltod über die NF- κ B-Aktivierung führt (Maedler et al., 2002).

Glucolipotoxizität: Sowohl die erhöhte Konzentration von Glucose als auch die erhöhte Konzentration von FFA werden in T2D festgestellt. Ein chronischer erhöhter FFA-Spiegel trägt zu einer Senkung der GSIS und der β -Zellapoptose bei. Dies wird als Lipotoxizität bezeichnet. Die derzeitigen Erkenntnisse zeigen, dass die FFA alleine keine toxische Wirkung auf die β -Zellen haben. Nur in Anwesenheit von Hyperglykämie verursachen FFA Schäden an den β -Zellen (Glucolipotoxizität). Die toxische Wirkung von FFA liegt an dem Einfluss von Glucose auf den intrazellulären Stoffwechsel von Fettsäuren. Die erhöhte Konzentration von Glucose inhibiert die β -Oxidation der FFA, was zur Akkumulation von Lipiden in β -Zellen führt. Dies geschieht durch die vermehrte Bildung von Malonyl-CoA im Cytosol, welches durch das Enzym Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC) von Acetyl-CoA im Rahmen der Fettsäuresynthese synthetisiert wird. Malonyl-CoA hemmt die Carnitin-Palmitoyltransferase-1 (CPT-1), transportiert Acyl-CoA vom Cytosol in die Mitochondrien, wodurch die β -Oxidation der FFA geblockt wird und zu einer Akkumulation von langkettiger Acyl-CoA (LC-CoA) im Cytoplasma führt. Die Akkumulation von LC-CoA bewirkt entweder direkt oder durch die Bildung von Lipid-Derivaten wie Ceramiden und TG die Beeinträchtigung der Insulinsekretion sowie die β -Zellapoptose (L. O. Li et al., 2010; Newsholme et al., 2007). Zusätzlich zur Wirkung auf den Fettsäuremetabolismus aktiviert Glucose die Expression von beteiligten Genen in der Lipogenese. Glucose erhöht die Expression des X-Rezeptors (LXR) in der Leber, welcher zur Steigerung der Expression von SREBP-1c führt und mit einer Lipidakkumulation, β -Zelldysfunktion und dem β -Zelltod verknüpft ist (Choe et al., 2007). Die AMPK inaktiviert ACC durch eine Phosphorylierung. Dies führt zur Steigerung der Oxidation der FFA und zur Reduktion der Insulinsekretion. Sowohl ACC als auch SREBP-1c werden durch AMPK reguliert (Foufelle Ferre, 2002). Die hohe Glucosekonzentration führt zur Reduktion der AMPK-Aktivität und erhöht somit den Malonyl-CoA-Spiegel oder steigert die Expression von SREBP-1c und erhöht dadurch die Lipogenese. Weiterhin wurde gezeigt, dass ein erhöhter FFA-Spiegel im Plasma zu einer Zunahme des Entkopplungsproteins UCP-2-Spiegel führt, wodurch die ATP-Produktion und damit auch die Insulinsekretion reduziert wird (Chang-Chen et al., 2008). Die Induktion der ER-Stress-Proteine sowie des oxidativen Stresses gelten ebenfalls als Mechanismen der Glucolipotoxizität (Cunha et al., 2008; Eizirik et al., 2008).

Proinflammatorische Zytokine: Die vermehrt freigesetzten proinflammatorischen Zytokine von Adipozyten unter Adipositas sind an der Entstehung der Insulinresistenz und β -Zelldysfunktion sowie der β -Zellapoptose beteiligt, die mit der Entwicklung des T2D assoziiert sind. IL-1 β , Interferon- γ (IFN- γ) und TNF α sind die wichtigsten Zytokine, über die toxische Effekte an β -Zellen erzielt werden. IL-1 β bindet an seinem Rezeptor IL-1 β -Rezeptor und aktiviert dadurch verschiedene Signalwege wie NF- κ B und MAPK (JNK/P38/ERK), was zu einer β -Zellapoptose führt (Quan et al., 2013). NF- κ B wird in den Zellkern transloziert, wo verschiedene Zielgene induziert werden, darunter die iNOS (induzierbare NO-Synthase), welche die Freisetzung von NO in den β -Zellen verursacht (Quintana-Lopez et al., 2013). Mehrere Mechanismen werden für die NO-vermittelte β -Zellapoptose dargestellt, darunter die Induktion der DNA-Schädigung, die P53 aktiviert und dadurch die pro-apoptische Genexpression (Bax, Fas und Noxa) induziert (Eizirik et al., 2008). NO führt auch zur Inhibierung der Expression des Ca²⁺-Transporters SERCA2b und zum Verlust an ER-Ca²⁺ und induziert somit ER-Stress-Signalwege (Cardozo et al., 2005). Außerdem vermittelt NO die Reduktion der Expression von IRS-2 und führt zur Hemmung des IRS-2-Weges und zum β -Zellversagen (Tanioka et al., 2011). Der Signalweg des durch INF- γ -induzierten β -Zelltodes läuft über die Aktivierung des JAK/STAT1-Signalweges (Novotny et al., 2012). IFN- γ und TNF α können ebenfalls zum β -Zelltod beitragen, und zwar durch Steigerung der ROS-Produktion und Cytochrom c-Freisetzung, die einen wichtigen Schritt zur Induktion der Caspase-Kaskade darstellt. Weiterhin wird durch TNF α und INF- γ der NF- κ B aktiviert, was zu einer Suppression des Bcl-2 führt und somit die Caspase 3 aktiviert, die eine entscheidende Rolle für die Apoptose der β -Zellen spielt (Cao et al., 2013).

1.6 Proteinkinase C

Die PKC-Familie ist an der Regulierung zahlreicher zellulärer Prozesse wie Proliferation, Apoptose und Differenzierung beteiligt. Die PKC-Familie wird aufgrund der Struktur und Aktivierungsfaktoren in drei Klassen unterteilt. Konventionelle PKC-Isoformen (cPKC: α , β 1, β 2, γ) sind Ca²⁺-abhängig und werden durch DAG und Phorbolster (PMA) aktiviert. Die neue PKC-Isoformen (nPKC: δ , θ , μ , ϵ , η) sind Ca²⁺-unabhängig und werden durch DAG und PMA ebenfalls aktiviert. Atypische PKC-Isoformen (aPKC: λ /1, ζ) sind Ca²⁺-unabhängig und benötigen Phosphatidylserin (PS) sowie PDK1 zur Aktivierung. PKCs sind aus zwei Domänenstrukturen aufgebaut: einer N-terminalen regulatorischen und einer C-terminalen katalytischen Domäne, wobei vier konservierte Abschnitte (C1 bis C4) vorliegen. Die C-terminale Kinase-Domäne besteht aus der Region-C3 (ATP-Bindungsbereich) und aus der Region-C4 (Substratbindungsstelle). Die regulatorische Domäne wird aus den Abschnitten C1 und C2 sowie einer Pseudosubstratsequenz aufgebaut, die zu einer Autoinhibition der Kinase führt, indem sie mit der katalytischen Domäne in Wechselwirkung tritt (C4). In der C1-Region wird DAG

oder PMA gebunden, wohingegen die C2-Region für die Bindung von Ca^{2+} verantwortlich ist (Abb. 1.6) (Turban Hajduch, 2011; Yoshida, 2007).

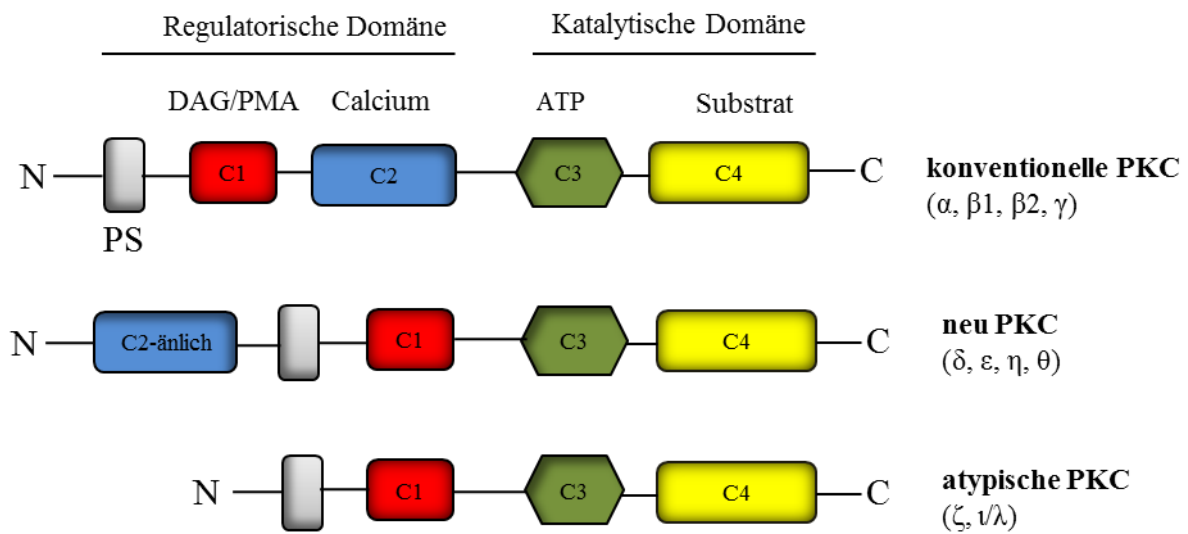


Abbildung 1.6: Domänenstruktur der PKC-Isoformen. Modifiziert nach (Turban Hajduch, 2011).

1.6.1 PKC und β -Zellen

Sowohl in den nativen β -Zellen als auch in den β -Zelllinien werden mindestens sechs Isoformen der PKC exprimiert, wobei vor allem PKC α und PKC δ zu finden sind (Hennige et al., 2002; M. J. Kim et al., 2001). Trotzdem bleibt die genaue Expression der PKC-Isoformen in den Inseln und in den β -Zelllinien weiterhin kontrovers.

Seit langer Zeit ist bekannt, dass die Behandlung der β -Zellen mit PMA die Insulinsekretion von β -Zellen stimuliert (Jones et al., 1991). Daher scheint PKC an der GSIS von β -Zellen involviert zu sein. Es konnte gezeigt werden, dass PKC α und PKC β die durch Glucose und PMA stimulierte Insulinsekretion vermitteln können (Miura et al., 1998). Untersuchungen mit verschiedenen PKC-Inhibitoren an Ratteninseln und HIT-T15 Zellen aus Hamstern konnten zeigen, dass GSIS zum Teil über aPKCs vermittelt wird (Harris et al., 1996). Konstitutive aktive PKC ζ (CA-PKC- ζ) Mäuse, bei denen die Expression von PKC ζ spezifisch in pankreatischen β -Zellen überexprimiert ist, zeigten eine Erhöhung der Expression von Insulingenen, was schließlich die Insulinsekretion fördert (Velazquez-Garcia et al., 2011).

Auch an der durch FFA-induzierten GSIS ist PKC involviert. FFA steigern die GSIS entweder direkt durch Bindung an den GPR40/FFAR1-Rezeptor, was zu einer Aktivierung der PLC (Phospholipase C) führt, welche die DAG bildet und damit PKC aktiviert, was wiederum die Insulinsekretion beeinflusst,

oder indirekt durch akkumuliertes LC-CoA im Cytosol, was die GSIS entweder direkt oder über Aktivierung von PKC steigert (Schmitz-Peiffer Biden, 2008).

PKC beeinflusst als bedeutsamer Regulator die β -Zellproliferation. PKC ζ wird sowohl durch Insulin als auch durch verschiedene Wachstumsfaktoren (EGE, IGF-1, GLP-1) aktiviert und bewirkt eine positive Wirkung auf die β -Zellproliferation (Vasavada et al., 2007). CA-PKC- ζ Mäuse zeigen eine erhöhte β -Zellproliferation, -größe und -masse sowie eine Verbesserung der Glucosetoleranz (Velazquez-Garcia et al., 2011). PKC ζ kann einerseits durch mTOR und seine Effektoren aktiviert werden. Zusätzlich führt mTOR zur Hochregulation von Cyclin A und D sowie auch zur Herunterregulation von P21. Andererseits trägt PKC ζ zu einer Phosphorylierung und Inaktivierung von GSK-3 β und dadurch zu einer erhöhten Expression von Cyclin D bei. PKC δ kann ebenfalls die Proliferation der β -Zellen durch die Phosphorylierung und Inaktivierung der Zellzyklus-Inhibitoren P21 fördern (Ranta et al., 2011). Außerdem spielt PKC δ eine entscheidende Rolle bei der Induktion der Apoptose in den β -Zellen (unter Abschnitt 1.6.2).

1.6.2 Die anti- und pro-apoptotische Wirkung von PKC δ

PKC δ gehört zu den nPKC-Isoformen und wurde ursprünglich in der Mausepidermis entdeckt. Später wurde PKC δ auch in Ratten und Menschen nachgewiesen (Yoshida, 2007). PKC δ benötigt zur Aktivierung DAG, das an der C1-Domäne mit hoher Affinität bindet, braucht aber keine Ca²⁺-Ionen zur Aktivierung, da der C2-Domäne das zur Ca²⁺-Bindung nötige Aspartat fehlt. Während DAG direkt als Kofaktor PKC δ aktiviert, wird PKC δ auch durch Phosphorylierung aktiviert. Eine der Phosphorylierungsstellen von PKC δ stellt Ser643 dar, das die Enzymaktivität beeinflusst. Es konnten ebenfalls mehrere Tyrosin-Reste (52, 187, 512, 523) nachgewiesen werden. Die Tyrosinphosphorylierung der PKC δ verändert die Aktivität der PKC δ in Abhängigkeit von der Phosphorylierungsstelle und Stimuli, so dass eine Hemmung oder eine Aktivierung der PKC δ verursacht wird. PKC δ wird auch an Thr505 in der Aktivierungsschleife der enzymatischen Aktivität phosphoryliert (Basu Pal, 2010).

Die PKC δ reguliert die Apoptose und das Überleben der Zellen in Abhängigkeit von Zelltyp, Stimuli und Translokalisierung (Yoshida, 2007). Nach einem apoptotischen Signal wandert PKC δ in den Zellkern, wo die PKC δ durch Caspase 3 gespalten wird. Durch die Spaltung entsteht ein katalytisch aktives Fragment (konstitutiv aktiv), das für die Induktion der Apoptose in verschiedenen Zelltypen wichtig zu sein scheint (Reyland, 2007). Verschiedene pro-apoptotische Signalwege werden durch PKC δ unter mehreren Stimuli (H₂O₂, Ceramide, oxidativer Stress, TNF α und UV-Strahlung) eingeschaltet. Durch PKC δ werden die intrinsischen Apoptosewege über das Mitochondrium aktiviert. Die konstitutiv aktive PKC δ , die die Apoptose induziert, liegt im Cytosol, in den Mitochondrien oder

im Zellkern vor, wohingegen PKC δ im ER anti-apoptotische Eigenschaften zeigt (Gomel et al., 2007). Unter oxidativem Stress führt die PKC δ im Zellkern zu einer IKK α -Aktivierung, was wiederum P53 aktiviert, das schließlich eine Apoptose induziert. Außerdem kann die PKC δ die Apoptose über die MAPK vermitteln. Die cytosolische PKC δ löst die Apoptose durch Aktivierung von P38, Hemmung der Akt und Verringerung der Expression von XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) aus, während die nukleare PKC δ die Apoptose durch Aktivierung von JNK vermittelt (Gomel et al., 2007). Für PKC δ sind mehrere nukleare Proteine als Substrate identifiziert worden, welche für die Induktion der Apoptose verantwortlich sind. Zu diesen gehören Lamin B, DNA-PK (DNA-dependent Proteinkinase-PK), c-Abl, P53, P73 und Rad9. FFA lösen die β -Zellapoptose über eine Translokation von PKC δ in den Zellkern aus, wo Lamin B durch PKC δ abgebaut wird (Eitel et al., 2003).

Neben der Induktion der Apoptose kann PKC δ aber auch die Apoptose verhindern. So konnte in Gliomzellen festgestellt werden, dass die PKC δ eine protektive Wirkung gegen eine von TRAIL ausgelöste Apoptose durch Phosphorylierung der PKC δ am Tyr155 besitzt und somit zu ihrer Translokation in ER führt (Okhrimenko et al., 2005). Außerdem kann PKC δ das Zellüberleben über mehrere anti-apoptotische Wege fördern, einschließlich der Akt, ERK und der NF- κ B-Wege. PKC δ hemmt die Apoptose in den Darmkrebszelllinien über die NF- κ B-vermittelte Induktion des cIAP2 (Basu Pal, 2010).

1.7 Lysophosphatidsäure (LPA)

1.7.1 Struktur und Biosynthese von LPA

LPA ist ein bioaktives Glycerophospholipid, welches als extra- und intrazelluläres Signalmolekül agiert. LPA ist ein wichtiges Zwischenprodukt bei der Synthese von Glycerophospholipiden, die einen wesentlichen Bestandteil zellulärer Membranen darstellen. Es besteht aus einer Fettsäure, die mit einer freien Phosphatgruppe an Glycerol gekoppelt ist. Verschiedene LPA-Spezies unterscheiden sich durch Kettenlänge und Sättigungsgrad der veresterten Fettsäure. Dazu zählen die gesättigten LPA-Spezies (C16:0, C18:0) und die ungesättigten LPA-Spezies (C20:4, C18:1, 22:6). Die meisten biologischen Effekte wurden mit 1-Oleoyl-LPA untersucht. LPA ist im Gegensatz zu den meisten anderen Phospholipiden wasserlöslich. LPA liegt in den unterschiedlichen biologischen Flüssigkeiten, wie z. B. Serum, Plasma, Follikularflüssigkeit, Speichel und Hühnerei-Eiweiß sowie Gewebe und Gehirn vor (Aoki, 2004; van Meeteren Moolenaar, 2007). Zwei mögliche Synthesewege des LPA wurden in den letzten Jahren postuliert.

Die erste Möglichkeit ist die intrazelluläre Synthese von LPA. Hierbei wird Phosphatidsäure (PA) aus Phospholipiden (PL) durch Phospholipase D (PLD) sowie aus DAG durch Diacylglycerol-Kinase

(DGK) generiert. Aus PA entsteht dann LPA durch Deacylierung über Phospholipase A1 oder A2 (Aoki, 2004). Darüber hinaus entsteht LPA aus Glycerol-3-Phosphat (G3P) und Acyl-CoA über die im ER oder in den Mitochondrien lokalisierte Glycerophosphat-Acetyltransferase (GPAT) sowie aus Monoacylglycerol (MAG) durch die Monoacylglycerolkinase (MGK) (Okudaira et al., 2010; Pebay et al., 2007).

Neben dem intrazellulären LPA-Syntheseweg existiert auch die Möglichkeit der extrazellulären LPA-Produktion. LPA kann aus Lysophospholipiden (LPL) über die Lysophospholipase-D-Aktivität (LysoPLD) des Autotaxins (ATX) entstehen. Die physiologische Konzentration von LPA beträgt im Plasma (100 nM - 1 μ M), während im Serum über 10 μ M LPA vorliegen, die über die Abspaltung des Cholinrestes der PL von der Zellmembran aktivierten Blutplättchen mittels ATX im Rahmen der Thrombozytenaggregation freigesetzt wird. Dort wird LPA an Trägermoleküle gebunden, hauptsächlich an Albumin und LDL (low density lipoprotein) (Aoki, 2004; M. E. Lin et al., 2010).

Außer von Thrombozyten wird LPA von zahlreichen Zellen, wie z. B. Adipozyten, Fibroblasten und Krebszellen freigesetzt. ATX ist auch als Ectonukleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 2 (ENPP2) bekannt und gehört zu der Familie der ENPP (Nakanaga et al., 2010). ATX konnte wie LPA in den meisten biologischen Flüssigkeiten nachgewiesen werden und zeigt eine wesentliche Bedeutung in physiologischen, aber auch pathologischen Prozessen wie Adipogenese, Neurogenese, Angiogenese sowie auch Tumorgenese, Metastasierung und Fibrose. ATX-defiziente Mäuse (ATX^(-/-)) sterben am embryonalen Tag 10 (E10) aufgrund einer gestörten Angio- und Neurogenese, wohingegen die ATX^(+/-) heterozygoten Mäuse lebensfähig sind, aber im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen nur die Hälfte des LPA-Spiegels im Plasma besitzen, was darauf hindeutet, dass ATX wahrscheinlich der primäre Produzent von extrazellulärem LPA ist (van Meeteren et al., 2006).

Unter physiologischen Bedingungen wird intrazelluläres LPA über die LPA-Acyltransferase (LPA-AT) in PA umgewandelt und extrazellulär über die Lipid-Phosphat-Phosphatasen (LPP) zu MAG dephosphoryliert (Abb. 1.7.1) (van Meeteren Moolenaar, 2007).

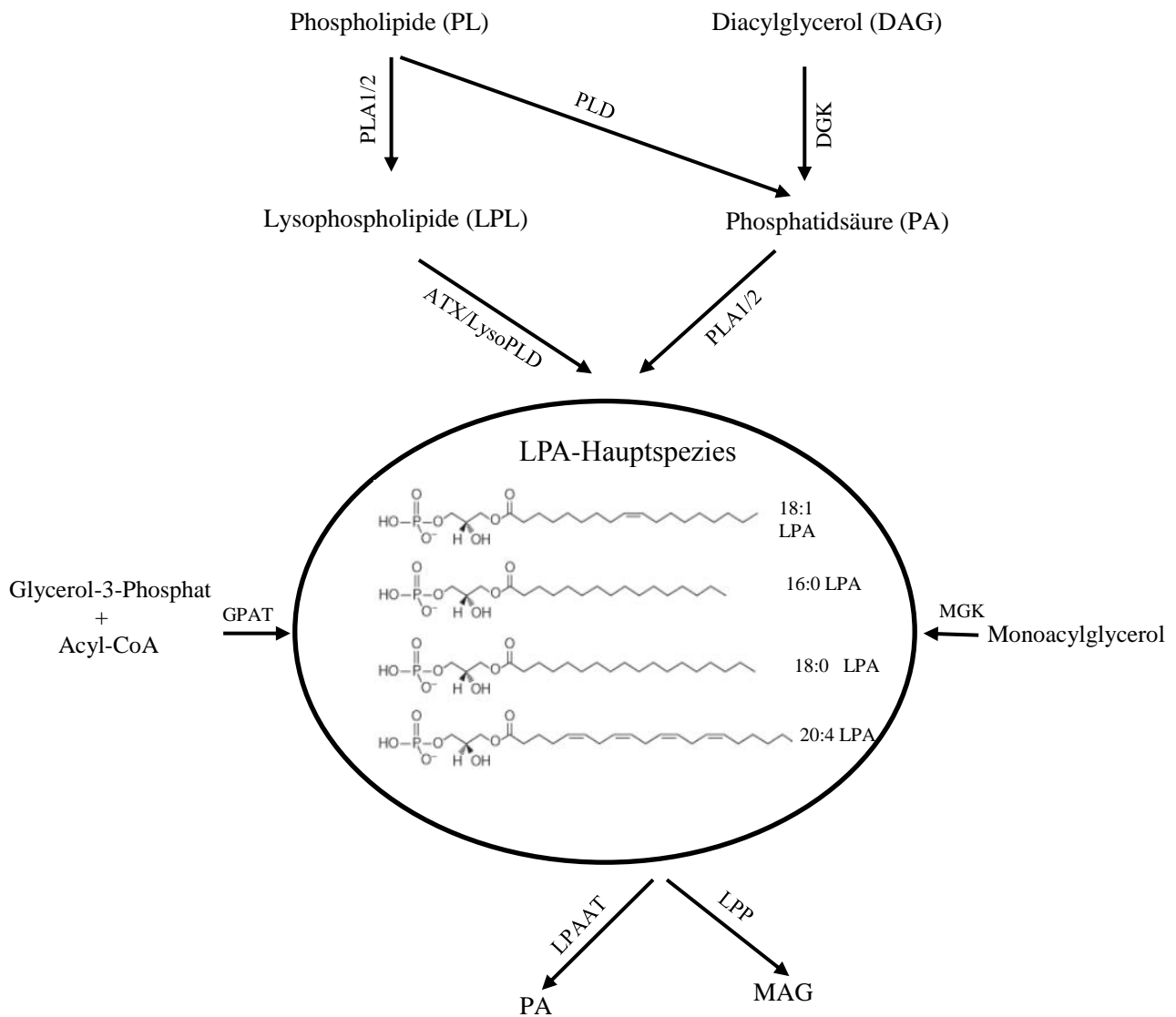


Abbildung 1.7.1: Biosynthese und Metabolismus des LPA.

1.7.2 Physiologische und pathophysiologische Effekte von LPA

LPA reguliert verschiedene biologische Prozesse, wie z. B. die Differenzierung von Keratinozyten, eine Reorganisation des Cytoskeletts, aber auch Migration, Neurogenese, Angiogenese und Neuritenretraktion. LPA hat die Fähigkeit die Thrombozytenaggregation zu stimulieren. Durch LPA kann die Zellproliferation stimuliert sowie die Apoptose gehemmt werden. Weiterhin stimuliert LPA die Kontraktion glatter Muskelzellen und reguliert den vaskulären Tonus. Außerdem fördert LPA die Wundheilung und Zellrundung. LPA bewirkt weiterhin in einer Vielzahl von Zellen eine Ca^{2+} -Mobilisierung (J. W. Choi et al., 2010).

LPA ist an der Entwicklung des zentralen Nervensystem (ZNS) beteiligt. So induziert LPA die Neurogenese durch die Regulation der Proliferation, Apoptose, Differenzierung und Migration der neuronalen Progenitorzellen (NPCs). Außerdem ist LPA in die Astrozytenproliferation und Neuritenretraktion involviert. Darüber hinaus spielt LPA eine wichtige Rolle beim Wachstum und der Faltung des cerebralen Cortex, Proliferation und Antiapoptose der Schwannzellen, Differenzierung der Oligodendrozyten und dem Neuronenüberleben (J. W. Choi Chun, 2013). Zusätzlich zu physiologischen Prozessen zeigt LPA einen pathologischen Einfluss auf das ZNS wie Schizophrenie und neuropathischen Schmerz (Ueda, 2011).

In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass LPA in verschiedene Reproduktionsprozesse wie Spermatogenese, männliche Sexualfunktion, Eierstockfunktion, Befruchtung, embryonale Implantation und Geburt involviert ist (Ye Chun, 2010). Neben den biologischen Funktionen ist LPA an der Pathophysiologie verschiedener Krankheiten beteiligt.

In anderen Untersuchungen wurden erhöhte Konzentrationen von ATX-Serum und LPA-Plasma in Nagetiermodellen sowie bei humanen Patienten mit Hepatitis-C-induzierter Leberfibrose nachgewiesen (Watanabe et al., 2007). LPA wirkt proliferationsfördernd auf die hepatischen Sternzellen, die eine exzessive Menge von extrazellulären Matrixproteinen in der Leber bilden können. Darüber hinaus beeinflusst LPA die Anti-Apoptose sowie auch die Kontraktion von Sternzellen und hat eine proliferationshemmende Wirkung auf die Hepatozyten, was darauf hindeutet, dass LPA einen bedeutenden Einfluss auf die Entstehung der Fibrose besitzt (Ikeda et al., 1998). Außerdem ist LPA an der Pathogenese der Lungen- und Nierenfibrose beteiligt (Oikonomou et al., 2012; Pradere et al., 2008).

In-vivo- und *in-vitro*-Studien zeigen, dass LPA mit einer größeren Tumoraggressivität verbunden ist. So konnte eine erhöhte Konzentration von LPA in Plasma und in Aszites der Eierstöcke bei Ovarialkarzinompatientinnen nachgewiesen werden (Sedlakova et al., 2011). LPA aktiviert die Proliferation und Anti-Apoptose der Ovarialkrebszellen (OCC) sowie die Migration (H. Li et al., 2009). Außerdem erhöht LPA die Expression von Urokinase Plasminogen Activator (uPA) und Matrix-Metalloproteasen (MMP-2), die wichtige Mediatoren für Metastasen und deren Invasion sind (Jeong et al., 2012). Ferner stimuliert LPA eine Sekretion von VEGF (vascular endothelial growth factor), der die Neubildung von Blutgefäßen im Tumorgewebe bewirkt (Y. L. Hu et al., 2001). LPA spielt ebenfalls eine wesentliche Rolle in der Pathophysiologie anderer maligner Tumoren, wie z. B. Mammakarzinom, Prostatakarzinom, Gliom und Bronchialkarzinom (Arriazu et al., 2013; J. W. Choi et al., 2010).

1.7.3 LPA-Rezeptoren

Die durch LPA hervorgerufenen Effekte werden über die Bindung an spezifische G-Proteingekoppelte Rezeptoren vermittelt. Die ersten drei entdeckten Rezeptoren ($LPA_1/LPA_2/LPA_3$) zählen zu den Edg-Rezeptoren, die ursprünglich den Namen Endothelial Differentiation Gene (EDG) getragen haben. Der Name leitet sich vom ersten Mitglied der Familie ab, das aus Endothelzellen isoliert wurde. LPA bindet dabei mit hoher Affinität an die Rezeptoren LPA_1 (= edg-2), LPA_2 (= edg-4), LPA_3 (= edg-7), deren humane Aminosäuren-Sequenz zu 50 - 57 % identisch sind. Die drei später entdeckten LPA-Rezeptoren gehören nicht zur Edg-Familie, sondern sind mit purinergen Rezeptoren (P2Y) verwandt. Die Aminosäuren-Sequenz der Rezeptoren LPA_4 (= P2Y9), LPA_5 (= GPR92), LPA_6 (= P2Y5) sind zu 35 - 55 % identisch (Yanagida Ishii, 2011).

Verschiedene LPA-Rezeptor-knockout (KO)-Mäuse wurden für die Aufklärung der physiologischen und pathologischen Funktionen der Rezeptoren generiert. 50 % der LPA_1 -KO-Mäuse sterben perinatal und die Überlebenden zeigen phänotypische Abnormalitäten wie Reduktion des Körpergewichtes und der Gehirnmasse, verkürzte Schnauze und kraniofaziale Dismorphismen (J. W. Choi et al., 2008). Die LPA_2 -KO-Mäuse zeigen keine Abnormalitäten, während LPA_1/LPA_2 -KO-Mäuse die gleichen phänotypischen Abnormalitäten wie LPA_1 -KO-Mäuse aufweisen (Okudaira et al., 2010). In den LPA_3 -KO-Mäusen wurde eine verspätete embryonale Einnistung und Reduktion der Würfe nachgewiesen (Hama Aoki, 2010). Keine Abnormalitäten wurde in den LPA_4 -KO-Mäusen identifiziert (Yanagida Ishii, 2011). Mäuse, bei denen die Expression der LPA_5 und LPA_6 unterdrückt ist, sind bisher nicht vorhanden.

Die LPA-Rezeptoren sind an die G-Proteine $G_{i/o}$, G_q , $G_{12/13}$ und G_s gekoppelt, welche verschiedene intrazelluläre Signalwege aktivieren. Über die Aktivierung der $G_{i/o}$ -Proteine wird die Adenylatcyclase (AC) gehemmt, was zu einer Abnahme der intrazellulären cAMP-Konzentration führt. Außerdem induziert $G_{i/o}$ die Steigerungsaktivität der Tyrosinkinase Ras und schließlich eine Aktivierung der MAPK-Kaskade, die die Zellproliferation und das Wachstum fördert. Darüber hinaus wird die PI3K über $G_{i/o}$ aktiviert, was sowohl zur Aktivierung eines Akt-vermittelten Zellüberlebens als auch zur Aktivierung des kleinen GTPase-Proteins Rac und damit zur Zellmigration führt. Über $G_{i/o}$ und G_q kann LPA weitere Signalwege aktivieren. In diesem Signalweg vermittelt PLC die Aktivierung von IP3 und DAG. Dabei vermittelt die Erhöhung des intrazellulären Calciums und DAG die Aktivierung der PKC. Die Aktivierung des $G_{12/13}$ -Proteins löst die Aktivierung des kleinen GTP-bindenden Proteins Rho aus, was zur Stimulation der Rho-Kinase und SRF (serum response element) führt und dadurch eine vermittelte-Bildung von Aktin-Stress-Filamenten sowie eine Zellkontraktion und -rundung bewirkt. Über G_s -Proteine kann im Gegensatz zu G_i die AC stimuliert werden, woraus ein

Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentrationen erfolgt (J. W. Choi Chun, 2013; Moolenaar et al., 2004; Okudaira et al., 2010; Pebay et al., 2007). Es konnte auch gezeigt werden, dass LPA außer an membranständige LPA-Rezeptoren auch an den intrazellulären Rezeptor PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ) binden kann (McIntyre et al., 2003). PPAR γ steuert die Transkription bestimmter Gene, die am Glucose- und Lipidmetabolismus beteiligt sind. Außerdem beeinflusst PPAR γ auch inflammatorische Prozesse, Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose.

1.7.4 Bedeutung von LPA in T2D

Die exzessive Akkumulation von Fettgewebe bei Adipositas ist ein Risikofaktor für die Entwicklung der Insulinresistenz und Insulinsekretionsstörung sowie T2D. Neben seiner Funktion als Fettspeicher sezerniert das Fettgewebe verschiedene bioaktive Mediatoren, die an der Entstehung einer Insulinresistenz beteiligt sein können, darunter TNF α , Leptin, Resistin und Phospholipide.

In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass ATX und LPA aus Adipozyten freigesetzt werden. Da ATX aus Adipozyten sezerniert wird, lassen die *In-vitro*-Untersuchungen auf eine mögliche Beteiligung von ATX an der Entwicklung der Adipositas in Bezug auf T2D schließen. In der Präadipozyten-Linie 3T3F442A und in primären Präadipozyten wurde nachgewiesen, dass eine erhöhte Expression und Sekretion von ATX bei der Differenzierung der Präadipozyten zu Adipozyten (Adipogenese) mit einer exzessiven Akkumulation von LPA im extrazellulären Medium verbunden ist (Boucher et al., 2005; Ferry et al., 2003). LPA scheint mit seiner Bindung an den LPA₃-Rezeptor die Inhibierung des Transkriptionsfaktors PPAR γ über die Aktivierung der Rho-Kinase zu bewirken, was zu einer Hemmung der Differenzierung von Präadipozyten führt (anti-Adipogenese) (L. Li et al., 2011; Simon et al., 2005). Außerdem induziert LPA die Proliferation der Präadipozyten über den LPA₁-Rezeptor und die Aktivierung des Ras/MAPK-Signalweges (Ferry et al., 2003; Holmstrom et al., 2010). Weiterhin wurde eine erhöhte Expression von ATX in Fettgewebe bei adipösen Hochfett-diät-(HFD)-Mäusen und bei adipösen Menschen nachgewiesen, was zu einer Steigerung der LPA-Konzentration im Plasma führt (Dusaulcy et al., 2011; Rancoule et al., 2012). Genetisch veränderte Mäuse (FATX-KO), bei denen die Expression des ATX spezifisch in Fettgewebe unterdrückt wird, zeigten einen reduzierten LPA-Spiegel im Plasma von 40 % (Dusaulcy et al., 2011). Eine andere Studie erbrachte den Hinweis, dass eine erhöhte Expression von ATX bei adipösen diabetischen Mäusen (*db/db*) sowie in Fettgewebe von insulinresistenten Patienten nachgewiesen wurde, was mit einer Reduktion der Insulinsensitivität und der Glucoseintoleranz verbunden ist (Boucher et al., 2005; Ferry et al., 2003).

Interessanterweise zeigte eine Studie, dass eine Verbesserung der Glucosetoleranz bei FATX-KO-Mäusen mit HFD gegenüber Wildtyp-Mäusen nachgewiesen wurde, was darauf hindeutet, dass LPA

einen negativen Effekt auf die Glucosehomöostase hat (Dusaulcy et al., 2011). In einer aktuellen Studie wurde untersucht, ob LPA tatsächlich die Glucosehomöostase beeinflussen kann. In ihr wurde herausgefunden, dass die Injektion von LPA bei Mäusen zur akuten und starken Beeinträchtigung der Glucosetoleranz führt (Rancoule et al., 2013). Dies ist auf eine Hemmung der durch GSIS zurückzuführen. Diese Wirkung von LPA kann durch eine Injektion der LPA_{1/3}-Antagonisten Ki16425 aufgehoben werden. Parallel dazu wurde der LPA-Spiegel in adipösen HFD-Mäusen gemessen. Bei diesen Mäusen waren höhere LPA-Spiegel im Plasma messbar als bei nicht adipösen Mäusen (Rancoule et al., 2013). Auch konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass durch die Behandlung der HFD-Mäuse mit Ki16425 für 3 Wochen die Insulin- und Glucosetoleranz verbessert und die Glucoseoxidation im Muskel erhöht wird. Außerdem wurde bei diesen mit Ki16425 behandelten Mäusen eine Steigerung der β -Zellmasse beobachtet.

Des Weiteren konnte ebenfalls nach der Inkubation von primären isolierten Langerhans-Inseln der Maus mit LPA die dosisabhängige Hemmung der GSIS gezeigt werden (Rancoule et al., 2013). Nach der kompensatorischen Phase wird die pankreatische β -Zelle bei adipösen HFD-Mäusen degeneriert. Somit führte die Behandlung der adipösen HFD-Mäuse mit Ki16425 zur erhöhten Anzahl der Inselzellen, was darauf hinweist, dass LPA auch das Wachstum der β -Zellen beeinflusst (Rancoule et al., 2013).

In einer weiteren Untersuchung konnte gezeigt werden, dass Lysophosphatidylcholin (LPC) an der durch Palmitat-induzierten Insulinresistenz beteiligt ist. Eine Steigerung von LPC wurde nach Inkubation mit Palmitat identifiziert, was zur Hemmung des Insulin-Signalweges und damit zur Insulinresistenz führt. Es ist noch nicht bekannt, welcher Lipidmetabolit direkt für die FFA-induzierte Insulinresistenz, β -Zelldysfunktion und Apoptose verantwortlich ist. Da LPA aus LPC generiert werden kann, besteht allerdings die Möglichkeit einer Beteiligung von LPA an der Insulinresistenz und der Entwicklung des T2D.

1.8 Das Endothel

Das Endothel stellt eine physikalische Barriere dar, die aus einer einlagigen Schicht von Zellen besteht. Es trennt den Blutstrom von der Gefäßwand und ist in viele physiologische und pathologische Prozesse involviert. Durch die chemische und physikalische Signale sowie auch auf zirkulierende Hormone und Zytokine produziert die Endothelzellen verschiedener Mediatoren, die die Angiogenese, Zelladhäsion, Gefäßpermeabilität, den Gefäßtonus, die Antithrombose, sowie die Inflammation regulieren. Das Endothel ist ein zentraler Regulator der vaskulären Homöostase durch Produktion sowohl vasorelaxierender Substanzen (z. B. NO, Prostazyklin, endothelium-derived hyperpolarizing factor [EDHF]) als auch vasokonstringierender Molekülen (z. B. Endothelin-1 [ET-1], Thromboxan

A2). Der Gefäßtonus ist abhängig von dem Gleichgewicht dieser Faktoren sowie von der Fähigkeit der glatten Muskelzellen, auf diese zu reagieren (Deanfield et al., 2007; Poredos Jezovnik, 2013).

1.9 Stickstoffmonoxid (NO)

NO ist ein freies, hochreaktives Radikalgas mit einer kurzen biologischen Halbwertszeit von 2 - 5 sec und wird von verschiedenen Zellen und Geweben des Körpers freigesetzt (Thomas et al., 2001). Es reguliert den Gefäßtonus durch seine Bildung in den Endothelzellen der Blutgefäße und hat eine relaxierende Wirkung auf glatte Muskelzellen. 1980 wurde es zum ersten Mal von Furchgott und Zawadzki als endothelium derived relaxing factor (EDRF) beschrieben (Furchgott Zawadzki, 1980).

Die Biosynthese von NO wird in Zellen durch das Enzym NO-Synthase katalysiert. NO-Synthasen sind in der Lage das Radikal NO zu synthetisieren, indem die Aminosäure L-Arginin mit molekularem Sauerstoff (O_2) und NADPH reagiert, wobei N-Hydroxy-L-Arginin entsteht. Unter weiterem Verbrauch von O_2 und NADPH wird das gebildete Intermediat N-Hydroxy-L-Arginin zu Citrullin und NO umgesetzt. Diese Reaktion erfordert neben O_2 und NADPH die Anwesenheit mehrerer Kofaktoren wie FAD (Flavinadenindinukleotid), FMN (Flavinadeninmononukleotid) sowie BH4 (Tetrahydrobiopterin), eine Häm-Gruppe und Ca^{2+} /Calmodulin (Förstermann Sessa, 2012).

Bei der NO-Bildung sind drei Isoformen beteiligt, die sich in ihrer Lokalisation, Regulation sowie den katalytischen Eigenschaften unterscheiden: die neuronale NO-Synthase (nNOS, NOSI), die induzierbare NO-Synthase (iNOS, NOSII) und die endotheliale NO-Synthase (eNOS, NOSIII).

Die nNOS liegt konstitutiv in hohen Konzentrationen in neuronalem Gewebe und im Skelettmuskelgewebe vor. Sie ist im Cytosol lokalisiert und ihre Aktivität ist abhängig von der Anwesenheit von Ca^{2+} /Calmodulin. Die NO-Synthese durch die nNOS erfolgt nach Stimulation durch L-Glutamat und Lithium (Förstermann Sessa, 2012).

Die iNOS ist durch verschiedene Zytokine in Makrophagen, Hepatozyten, Granulozyten und glatten Muskelzellen induzierbar. Sie liegt im Cytosol vor und ihre Aktivität ist von Ca^{2+} /Calmodulin unabhängig (Förstermann et al., 1994).

Die eNOS liegt ebenfalls konstitutiv in den Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Thrombozyten und Kardiomyozyten vor. Sie ist jedoch sowohl im Cytosol als auch membrangebunden in der Zelle lokalisiert und ihre Aktivität ist von Ca^{2+} /Calmodulin abhängig. Die Aktivierung der NO-Synthese durch die eNOS erfolgt durch viele verschiedene Stimuli (Dudzinski Michel, 2007).

1.9.1 Endotheliale NO-Synthase (eNOS)

Die eNOS ist ein Dimer, bestehend aus zwei identischen Monomeren von 134 kD. Jedes Monomer besteht aus einer C-terminalen Reduktasedomäne und einer N-terminalen Oxigenasedomäne. An der Oxigenasedomäne befinden sich Bindungsstellen für die Kofaktoren Häm, BH₄ und L-Arginin. An der Reduktasedomäne existieren Bindungsstellen für die Kofaktoren FAD, FMN und NADPH. Die beiden Domänen sind über eine Calmodulin-Bindungsstelle verbunden (Abb. 1.9.1) (Fleming Busse, 2003; J. Qian Fulton, 2013).

Die Aktivität der eNOS wird durch posttranslationale Modifikationen der eNOS reguliert, wobei die Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration den wichtigsten aktivierenden Mechanismus darstellt. Innerhalb der Zelle ist die eNOS über N-Myristoylierung und Palmitoylierung in der Plasmamembran verankert, wo sie in Caveolae von Mikrodomänen lokalisiert ist. Die ebenfalls dort lokalisierten Proteine der Caveolin-Familie inhibieren direkt die Aktivität der eNOS. Nach einer Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration erfolgt die Bildung des Ca²⁺/Calmodulin-Komplexes und dadurch kann die Bindung der eNOS an Caveolin gelöst und die eNOS aktiviert werden (Feron et al., 1998). Neben Caveolin wird die Aktivität der eNOS durch Protein-Protein-Interaktionen wie Hsp90, NOSIP (NOS-interacting protein) und NOSTRIN (NOS traffic inducer) reguliert (Dudzinski Michel, 2007; Musicki et al., 2009).

Die eNOS kann jedoch auch Ca²⁺-unabhängig aktiviert werden. Diese Aktivierung wird durch mehrere Proteinkinasen und Phosphatasen vermittelt, die infolge ihrer Stimulation die eNOS phosphorylieren und diese dadurch in ihrem Aktivitätszustand ändern können (Fleming Busse, 2003).

Bislang sind die Phosphorylierungsstellen Ser116, Ser617, Ser635, Ser1179 und Thr497, Tyr83, Tyr659 bekannt (bovine eNOS).

Die Phosphorylierungsstelle Ser1179 ist die bekannteste und am häufigsten untersuchte Phosphorylierungsstelle der eNOS. Stimuli wie VEGF, Estrogen, Bradykinin, Insulin und Acetylcholin sowie auf das Endothel einwirkende Scherkräfte führen zu einer Phosphorylierung von Ser1177 und damit zu einer eNOS-Aktivierung. eNOS kann durch Akt, cAMP-abhängige PKA, AMPK, Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) und Proteinkinase G an Ser1177 phosphoryliert werden (Fleming Busse, 2003; Musicki et al., 2009; J. Qian Fulton, 2013).

Die Phosphorylierungsstelle Thr497 hemmt die Aktivität des Enzyms, was hauptsächlich über die PKC und AMPK geschieht. Stimuli wie Bradykinin und Histamin, die hingegen zu einer Dephosphorylierung der Thr497-Phosphorylierungsstelle führen und damit zu einer eNOS-Aktivierung, werden über PP1, PP2A und Calcineurin (PP2B) vermittelt (Musicki et al., 2009).

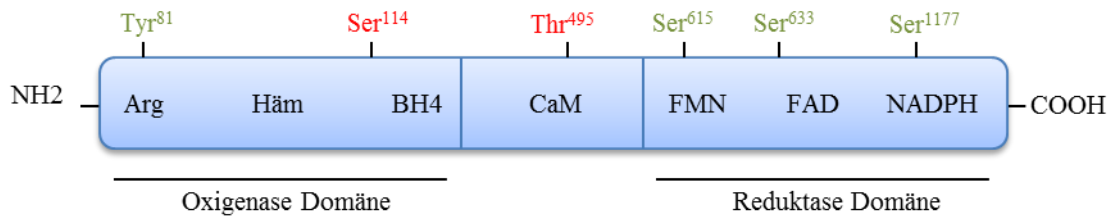


Abbildung 1.9.1: Domänenstruktur der humanen eNOS. eNOS-Monomer bestehend aus einer Oxigenase- und einer Reduktase-domäne mit den Bindungsstellen für die Kofaktoren der eNOS (Häm, L-Arginin, FAD, FMN, NADPH und Calmodulin) und den Phosphorylierungsstellen der eNOS (Ser1177, Ser114, Ser615, Ser633, Thr495, Tyr81)(rot Inaktivierung, grün Aktivierung).

1.9.2 Biologische Wirkung von eNOS/NO auf die vaskuläre Homöostase

NO ist bei Säugetieren an verschiedenen physiologischen Regulationsprozessen beteiligt. Hormone und Substanzen wie Acetylcholin und Bradykinin wirken hierbei über spezifische Rezeptoren auf die Endothelzellen. Physikalische Reize, wie auf das Endothel einwirkende Scherkräfte und erhöhter Blutfluss in den Gefäßen, führen über die direkte Stimulation der Endothelzellen zur NO-Freisetzung (Balligand et al., 2009). Neben seiner Wirkung als potenter Vasodilatator besitzt NO auch antiatherogene Eigenschaften. Durch Unterdrückung der Expression des Adhäsionsmoleküls CD11/CD18 führt NO auch zu einer verminderten Adhäsion von Leukozyten an das Gefäßendothel. Durch die verhinderte Ausschüttung von PDGF (Platelet-derived growth factor) hemmt NO die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen und Produktion von Matrixmolekülen, wie Kollagen und Elastin, und verhindert somit die Ausbildung fibroser Plaques an den Gefäßwänden. Außerdem vermittelt NO eine Hemmung der Blutplättchenaggregation und -adhäsion an der Gefäßwand (Förstermann Sessa, 2012).

Eine besonders wichtige Rolle spielt es im kardiovaskulären System als ein potenter Vasodilatator. Das gebildete NO diffundiert aus dem Endothel in die glatte Muskelzelle der Gefäßwand, wo es die lösliche Guanylyl-Cyclase aktiviert, die wiederum zur Entstehung von zyklischem cGMP aus GTP führt (Förstermann Sessa, 2012; J. Qian Fulton, 2013). Ein Anstieg der cGMP-Konzentration in den Zellen führt zur Senkung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration in den glatten Gefäßmuskelzellen und zur Dephosphorylierung der leichten Myosinketten. Hieraus resultiert eine Relaxation der glatten Gefäßmuskelzelle mit nachfolgender Vasodilatation.

1.10 Endotheliale Dysfunktion

Wenn das Endothel nicht mehr in der Lage ist, die physiologischen Mechanismen zur Regulation des Gefäßtonus zu leisten, wird von endothelialer Dysfunktion gesprochen. Eine Störung des Gleichgewichts von auf das Endothel vasodilatatorisch und vasokonstriktorisch wirkenden Faktoren führt zu einer endothelialen Dysfunktion (Feletou Vanhoutte, 2006; Herrera et al., 2010). Charakteristisch für eine endotheliale Dysfunktion sind folglich eine Beeinträchtigung der endothelabhängigen Vasorelaxation und eine erhöhte Permeabilität der Gefäßwand. Durch eine verminderte Bioverfügbarkeit von NO überwiegen die vom Endothel gebildeten kontrahierend wirkenden Faktoren, was zur endothelialen Dysfunktion führt (Herrera et al., 2010). Die Reduktion der Verfügbarkeit von NO wird durch eingeschränkte Produktion und/oder durch verstärkte Degradation verursacht. Durch zahlreiche Studien wurde belegt, dass oxidativem Stress eine wichtige Rolle in der Entstehung der endothelialen Dysfunktion zugeschrieben werden kann (Muller Morawietz, 2009). Oxidativer Stress führt zu einer erhöhten Konzentration von ROS und dadurch zur schnellen NO-Degradation. Die verminderte Produktion von NO kann sowohl durch eine reduzierte eNOS-Expression als auch durch eine reduzierte eNOS-Aktivität bedingt sein (Förstermann, 2010). Jedoch wird die endotheliale Dysfunktion mit verschiedenen Risikofaktoren wie Hypercholesterinämie, Hypertension, Diabetes mellitus, Rauchen und möglicherweise sogar mit infektiösen Agenzien wie Chlamydia pneumoniae assoziiert (Grover-Paez Zavalza-Gomez, 2009). Die durch verringerte NO-Bioverfügbarkeit bedingte endotheliale Dysfunktion ist dabei ein wesentlicher Grundmechanismus in der Entstehung der Atherosklerose.

1.11 Vasoaktive Wirkung von LPA

Eine mögliche Beteiligung von LPA an der Regulation des Gefäßtonus ist schon seit den 70er-Jahren bekannt. Für das LPA konnten hinsichtlich seiner vasoaktiven Funktion signifikante Unterschiede festgestellt werden. Eine intravenöse Injektion von LPA verursacht einen Anstieg des arteriellen Blutdrucks bei Ratten und Schweinen, dahingegen Hypotonie bei Katzen und Kaninchen (Tokumura et al., 1978). Auch in einer tierexperimentellen Studie mit hypertensiven Ratten und Wistar-Kyoto-Ratten konnte der vasopressive Effekt von LPA gezeigt werden (Tokumura et al., 1995). Es gibt auch Hinweise dafür, dass LPA einen vasoaktiven Effekt auf zerebrale Arterien bei neugeborenen Schweinen besitzt. So führt die lokale Applikation von LPA zu einer Vasokonstriktion und Hemmung der Vasodilatation der zerebralen Arterien (Tigyi et al., 1995). Dieser Effekt von LPA wurde auf eine G_i-vermittelte Hemmung der Adenylatcyklase zurückgeführt. Endothelin-1 ist ein potenter Vasokonstriktor und wird von Endothelzellen, Fibroblasten und Muskelzellen synthetisiert. LPA kann in Aorten-Endothelzellen aus Ratten (RAEC) die mRNA-Expression von präproET-1 sowie auch die

ET-1-Freisetzung stimulieren (Chua et al., 1998) und bewirkt somit eine Verlängerung als auch Verstärkung der durch LPA-ausgelösten Vasokonstriktion in Tiermodellen (Yakubu et al., 1997). Vaskuläre Endothelzellen produzieren normalerweise ATX, bei der Schädigung des Gefäßes wird der ATX-Spiegel in der Gefäßwand erhöht, was zu einer vermehrten lokalisierten Produktion von extrazellulärem LPA entlang des geschädigten Gefäßes führt. Eine lokale Erhöhung der LPA-Konzentration im Gefäß kann folglich das vaskuläre Remodeling durch die Stimulation der Neointima-Bildung verursachen. Zusätzlich löst die intravenöse Injektion von LPA einen akuten und systemischen Blutdruck bei Mäusen aus (Panchatcharam et al., 2008). Es ist bekannt, dass chronische Hypoxie zu Vasokonstriktion und pulmonaler Hypertonie führt. Untersuchungen an einem Rattenmodell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie zeigen, dass höhere LPA-Spiegel in Serum und Lungengewebe vorhanden sind und in die Pathogenese der chronischen Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie involviert zu sein scheinen (Shlyonsky et al., 2014). LPA ist in der Lage, die myogene Vasokonstriktion in Widerstandsgefäßen durch eine von der ROS-Produktion vermittelte Integrin-Aktivität in glatten Muskelzellen zu beeinflussen (Staiculescu et al., 2014). Unter pathologischen Bedingungen induziert LPA eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in VSMC über die Aktivierung der PLC und PKC, was eine Kontraktion der VSMC und dadurch eine Hypertension zur Folge hat (Xu et al., 2005).

Die Endothelzellen sind kritisch für die Regulation des Gefäßtonus. Mehrere epidemiologische Studien haben gezeigt, dass LPA verschiedene Wirkungen auf das Endothel besitzt, die alle für die Pathogenese der Atherosklerose und Hypertension relevant sein könnten. In isolierten Aorten der Maus wirkt LPA als endothelabhängiger Vasokonstriktor unter erhöhtem Shear-Stress, indem LPA den Ca^{2+} -Einstrom in Endothelzellen fördert, was zu einer Produktion und Freisetzung des Thromboxan A2 (vasokonstringierender Faktor) in Endothelzellen beiträgt. Nachfolgend ist dies mit einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in den glatten Muskelzellen verbunden, was eine Kontraktion nach sich zieht (Niioka et al., 2013). In verschiedenen Studien wurden gezeigt, dass LPA zu einer endothelialen Dysfunktion führt, was eine Störung der Regulation des Gefäßtonus und Atherosklerose zur Folge hat. LPA erhöht die endotheliale Permeabilität im Sinne einer endothelialen Dysfunktion durch eine Veränderung des Aktin-Zytoskeletts und der extrazellulären Matrix (van Nieuw Amerongen et al., 2000). Bei Entzündungsreaktionen konnte der Anstieg der LPA-Konzentration im Plasma durch erhöhte PA-Produktion mittels sekretorischer sPLA2-IIA und ein negativer Einfluss auf das Endothelium beobachtet werden. Dabei trägt LPA sowie *in vitro* als auch *in vivo* zu einer dosisabhängigen Erhöhung der endothelialen Permeabilität bei. In HUVECs führt LPA zu einem Verlust der endothelialen Integrität durch eine Induktion der Zellretraktion und somit Reduktion der Konfluenz der Endothelzellen und folglich zur erhöhten Permeabilität des Endothels. Darüber hinaus übt LPA eine erhebliche Erhöhung der hydraulischen Permeabilität der mesenterialen

Venen der Ratten aus (Neidlinger et al., 2006). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass LPA in die Pathologie der hypoxisch-ischämischen Schädigung involviert ist. Dabei konnte LPA sowohl in HUVECs als auch in isolierten zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen der Schweine einen Zelltod auslösen (Brault et al., 2007).

Im Rahmen der Angiogenese induziert LPA die Proliferation und Migration der Endothelzellen sowie auch die Stimulation der MMP-2-Expression in Endothelzellen (Y. Chen et al., 2013; Wu et al., 2005). LPA ist an der Initiation der atherosklerotischen Läsion durch die Aktivierung der Endothelzellen beteiligt. So induziert LPA die Expression von Adhäsionsmolekülen in Endothelzellen, wie VCAM-1 und ICAM-1, die für die Adhäsion der Monozyten und Leukozyten am Endothelium der Gefäßwand verantwortlich sind (Shimada Rajagopalan, 2010). Auch bewirkt LPA die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine und Chemokinasen, wie IL-1 β , IL-8 und MCP-1, aus den Endothelzellen (C. I. Lin et al., 2007).

1.12 Ziel der Arbeit

Insulinresistenz, β -Zelldysfunktion und Reduktion der β -Zellmasse sind Faktoren, die der Ätiologie des T2D zugrunde liegen. Insulin ist über den IRS-2/PI3K-Signalweg für den Stoffwechsel, das Überleben, die Proliferation sowie die Differenzierung von β -Zellen des Pankreas von großer Bedeutung. Eine Hemmung dieses Weges führt zur Abnahme der β -Zellmasse und folglich zur Entwicklung eines T2D. In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass Adipositas maßgeblich mit dem Auftreten von T2DM einhergeht. Das vermehrte Fettgewebe bei der Adipositas reagiert mit erhöhter Lipolyse und Freisetzung von FFA, Zytokinen und Adipozytokinen. Erhöhte Konzentrationen von FFAs oder deren Metaboliten in den β -Zellen vermindern die biologische Wirksamkeit des Insulins durch die Störung des Insulin-Signalweges. LPA kann intrazellulär aus FFA in der *de-novo*-Synthese von TG entstehen. Außerdem geht ein erhöhter Plasmaspiegel von LPA mit einer adipositasassoziierten Insulinresistenz einher. LPA stellt einen neuen pathologischen Mediator für eine Entwicklung eines T2D dar. Bisher waren nur wenige Daten über die pathophysiologische Bedeutung von LPA bekannt. Ziel der Arbeit war es deshalb, eine mögliche Beteiligung von LPA bei der Insulinresistenz in pankreatischen β -Zellen nachzuweisen.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden folgende Ziele erarbeitet:

- Analyse des intrazellulären LPA-Gehalts von MIN-6 Zellen nach der Gabe von Palmitat
- Untersuchung der Interaktion von LPA mit der Insulin-Signalkaskade
- Untersuchung des Einflusses von LPA auf die Proliferation der β -Zellen
- Untersuchung des Einflusses von LPA auf die Apoptose der β -Zellen
- Charakterisierung der beteiligten LPA-Rezeptoren
- Charakterisierung der verantwortlichen Mechanismen der LPA-Wirkung

LPA besitzt eine bedeutsame Rolle bei der Regulation der Gefäßhämostase. LPA reguliert den Blutdruck bei verschiedenen Spezies. Es wurde beschrieben, dass Endothelin-1 und LPA einen synergistischen Effekt auf die Vasokonstriktion haben. Verschiedene Studien ergaben, dass LPA einen erheblichen Einfluss auf das Endothel besitzt, welches der kritische Regulator der Gefäßhämostase ist. In einer Untersuchung an isolierten Aorten trug die Applikation von LPA zu einer endothelabhängigen Konstriktion durch die Stimulation des Thromboxan A₂ bei. In Endothelzellen aktiviert LPA die eNOS, das ein Schlüsselenzym der vaskulären Homöostase ist.

Ziel der Arbeit war daher die Untersuchung eines möglichen Einflusses von LPA auf den Gefäßtonus und die Charakterisierung der dafür verantwortlichen Mechanismen.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

- Untersuchung der endothelabhängigen Gefäßrelaxation an den Pulmonalarterien des Schweins

- Charakterisierung der an der Vasorelaxation beteiligten LPA-Rezeptoren
- Untersuchung der Möglichkeit einer eNOS-Aktivierung durch LPA
- Identifizierungen der molekularen Mechanismen des Signalweges der LPA-vermittelten eNOS-Aktivierung

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Autoklav	VarioklavH+P Medizintechnik, Oberschleißheim
Brutschrank	Thermo scientific, Rockford, USA
Casy-1 TTC Modell	Schärfesystem GmbH, Reutlingen
ChemiDoc XRS+ System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Elektrophoresesystem	Mini-PROTEAN 3 Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Einkammer-Organbäder, 20 ml, temprierbar	TSE, Bad Hamburg
Fluoreszenzmikroskop	BZ9000 Keyence, Neu-Isenburg Leica TCS SP5, Wetzler
Mikroplatte-Reader FLUOstar-Optima,	BMG, Offenburg
Sterilarbeitsbank	Hera-Safe Heraeus, Hanau
Magnetrührer	MR3001 Heidolph Instruments GmbH, Schwabach
PCR-Maschine	LightCycler 480II Roche Applied Sciences, Mannheim
Mikroskop	EclipseTS100 Nikon, Düsseldorf
pH-Meter	ProfiLab pH 597 WTW, Weilheim
Pipetten	Eppendorf Research, Hamburg
Pipettierhilfe	Pipetboy Integra Biosciences GmbH, Fernwald
Vortexer	Vortex Genie 2 Scientific Industries, New York, USA

Material und Methoden

Photometer	Ultrospec 2010 Amersham Biosciences, Freiburg
Reinstwasseranlage	Elix 10 Millipore, Schwalbach
Stromversorgung	Power Pac 1000 Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Thermomixer	Thermomixercomfort Eppendorf, Hamburg
Trockenschrank	WTB Binder, Tuttlingen
Ultraschallbad	Sonorex RK100H Bandelin, Berlin
Vakuumpumpe	Laboport KNF Neuberger AG, Balzerswil Schweiz
Vakuumzentrifugen	Centrivac II Heraeus, Hanau Speed Vac SC 210 ARC Thermo Fisher, Dreieich
Vortexmixer	Vortex-Genie 2 Scientific Industries, New York, USA
Waagen	BP211D Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad	SUB Universal Water Bath Grant, Cambridge UK
Wippschüttler	RT 45° Fröbel Labortechnik, Schachen PMR-30 Grant, Cambridge UK
Zentrifugen	Biofugefresco 7500 3325 Heraeus, Hanau Centrifuge 5810R Eppendorf AG, Hamburg
Transducer TF6V5	FMI, Seeheim-Jugenheim
Verstärker, Transducer Coupler 4711	TSE, Bad Homburg
Organhäkchen, Edelstahl, d=0.3 mm	Eigenanfertigung

2.1.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Acetonitril	VWR, Darmstadt
AcrylamidRotiphorese® Gel 30	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Agarose (Elektrophorese-Grad)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Agarosegelmarker	New England Biolabs, Frankfurt
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ammoniumhydroxid	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
BD Falcon Zellsiebe 40 µm	VWR, Darmstadt
BAPTA/AM	Millipore, Eschborn
Bisindolylmaleimide I	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Blotfilterpapier	Bio-Rad
Borsäure	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Bradford-ReagenzRotiQuant	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
1-Butanol	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Coomassieblau	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Diacylglycerolpyrophosphate (DGPP)	AvantiPolarLipid, USA
Diaminofluorescein-2 diacetate (DAF2-DA)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf

Material und Methoden

Dikaliummonohydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	VWR, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	VWR, Darmstadt
DNA Größenmarker	Fermentas, St. Leon-Rot
DNA Ladepuffer (Orange loading dye)	Fermentas, St. Leon-Rot
Dithiothreitol (DTT)	New England Biolabs, Frankfurt
Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) lowglucose 1g/l	Biochrom, Berlin
Dynabeads [®] Protein A	Life Technologies, Darmstadt
Endothelial Cell Growth Medium (EGM-2 Bulletkit)	Lonza, Ambiose, Frankreich
Einmalkanülen (Sterican Braun Gr.18)	VWR, Darmstadt
Einmalküvetten, reduziert	VWR, Darmstadt
Einmalspritzen (Braun Injekt 20 ml)	VWR, Darmstadt
Eppendorfgefäße Safe-Lock (0,5, 1,5, 2 ml)	VWR, Darmstadt
Ethanol	VWR, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Fetales Kälberserum Superior (FKS)	Biochrom, Berlin
Filterpapier, 10 cm	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Fluoromount	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Glycerol	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Glycin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
β-Glycerophosphat	Sigma-Aldrich, Schnelldorf

Material und Methoden

GÖ6976	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
High-Pure-RNA-Isolation-Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
Hydroxyethylpiperazin-N-ethansulfonsäure (HEPES)	Gibco BRL, Karlsruhe
Insulin, Human, recombinant, from yeast	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Interferon-gamma (IFN γ), Maus	MiltenyiBiotec, Teterow
Interleukin-1 β (IL-1 β), Maus	MiltenyiBiotec, Teterow
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
4-Kammerobjektträger	VWR, Darmstadt
KN-93	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Leupeptin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
L-Glutamin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
LightCycler 480 [®] Multiwell Platte 96	Roche Diagnostics, Mannheim
LightCycler 480 [®] Sealing Foil	Roche Diagnostics, Mannheim
LumiGlo [®] Chemilumineszenz Reagenz	New England Biolabs, Frankfurt
LY294002	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Lysophosphatidsäure 16:0 (LPA)	Avanti Polar Lipid, USA
Lysophosphatidsäure 18:1 (LPA)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Magermilchpulver Sucofin	TSI, Zeven
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Methanol	VWR, Darmstadt
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf

Material und Methoden

Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Natriumpyrophosphat (Na ₄ O ₇ P ₂)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
N ω -Nitro- <i>L</i> -argininmethylesterhydrochlorid (L-NAME)	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Nonidet P-40	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
N,N,N',N'-Tetramethylenethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
1-Oleoyl-2-mythel-sn-glycerol-3-Phosphothionate (2S)(OMPT)	Avanti Polar Lipid, USA
Parafilm M	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Penicillin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Pepstatin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Pertussis toxin (PTX)	Merck Biosciences, Darmstadt
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Phosphatgepufferte Salzlösung, Ca ²⁺ - und Mg ²⁺ frei	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Phorpol 12 myristate 13-acetate (PMA)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Polyvinyliden-difluorid (PVDF)-Transfermembran	Millipore, Eschborn
Ponceau S	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Primer	Eurofins, Ebersberg

Material und Methoden

Proteingrößenmarker	New England Biolabs, Frankfurt
Revert-Aid -First-Strand-cDNA-Synthesis-Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
Rottlerin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Rundboden-Röhrchen, Falcon	VWR, Darmstadt
Serumalbumin vom Rind, Fettsäure-frei (BSA)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Silikonlösung in Isopropanol	Serva, Heidelberg
SterilfilterMinisart [®] , 0,22 µm	Sartorius, Göttingen
Stickstoff, flüssig	Air Liquide, Berlin
Streptomycin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
SYBR Green PCR Master Mix	Roche Diagnostics, Mannheim
SzintillatorRotiszint 22	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tetrahydrofuran	VWR, Darmstadt
Trichloressigsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tris-Base	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Tris-HCl	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Trypanblau-Lösung (0,4 %)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Trypsin	Biochrom, Berlin
Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Maus	MiltenyiBiotec, Teterow
Tween 20	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
VPC12249	Avanti Polar Lipids, USA
Zellkulturflaschen TPP (25 cm ² und 75 cm ²)	Biochrom, Berlin
Zellkulturplatten 6-Loch, Flachboden, TPP	Biochrom, Berlin
Zellkulturschalen TPP, 10 cm, 6 cm	Biochrom, Berlin
Zellkulturschaber	Biochrom, Berlin

Zentrifugenröhrchen TPP (15 und 50 ml)

Biochrom, Berlin

Zitronensäure

Sigma-Aldrich, Schnelldorf

2.1.3 Antikörper

Antikörper	Hersteller
Phospho-Akt (Ser473)	New England Biolabs, Frankfurt
Akt	New England Biolabs, Frankfurt
Phospho-GSK3 β (Ser9)	New England Biolabs, Frankfurt
GSK3 β	New England Biolabs, Frankfurt
Phospho-FOXO (Thr24)/FOXO3a (Thr32)	New England Biolabs, Frankfurt
FOXO	New England Biolabs, Frankfurt
Phospho-eNOS (Ser1177)	BD Biosciences, Heidelberg,
eNOS	BD Biosciences, Heidelberg,
IR β	New England Biolabs, Frankfurt
IRS-2	New England Biolabs, Frankfurt
4G10® Platinum Anti-Phosphotyrosin,	New England Biolabs, Frankfurt
Phospho-JNK (Thr183/Tyr185)	New England Biolabs, Frankfurt
JNK	New England Biolabs, Frankfurt
Phospho-P70S6K (Thr389)	New England Biolabs, Frankfurt
Phospho-mTOR (Ser2448)	New England Biolabs, Frankfurt
mTOR	New England Biolabs, Frankfurt
Phospho-PI3K-P85 (Tyr458)/P55 (Tyr199)	New England Biolabs, Frankfurt
PI3K-P85	New England Biolabs, Frankfurt
Phospho-PKC δ (Thr505)	New England Biolabs, Frankfurt
PKC δ	New England Biolabs, Frankfurt
Anti-methyl-PP2A. C subunit Clon 2A10	Millipore, Eschborn
β -actin Antikörper, HRP-gekoppelt	Abcam, Cambridge, Großbritannien
Anti-Maus Antikörper, HRP-gekoppelt	New England Biolabs, Frankfurt
Anti-Rabbit Antikörper, HRP-gekoppelt	New England Biolabs, Frankfurt

2.1.4 Lösung der Testsubstanzen

LPA:	Zur Herstellung der Stammlösung (2×10^{-3}) wurde LPA in einem silikonisierten Glasröhrchen in Ethanol und Aqua. bidest im Verhältnis 1:1 gelöst und anschließend im Ultraschallbad für 15 min sonifiziert. Die Lagerung erfolgte bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vor der Verwendung wurde die Stammlösung mit 0,1 %iger BSA/PBS auf $300\text{ }\mu\text{M}$ verdünnt.
Insulin:	$100\text{ }\mu\text{M}$ Lösung in 0,1%iger BSA/PBS, pH-Wert auf 3 mit HCl eingestellt und steril filtriert
OMPT:	1 mM Lösung des LPA ₃ -Rezeptoragonisten in 0,1 %iger BSA/PBS
VPC 12249:	1 mM Lösung des LPA ₁₋₃ -Rezeptorantagonisten in 3 %iger BSA/PBS
DGPP:	10 mM Lösung des LPA ₁₋₃ -Rezeptorantagonisten in 0,1 %iger BSA/PBS
PTX:	100 ng/ml Lösung des G _i -Inhibitors in Aqua bidest
BAPTA/AM	13 mM Lösung des Ca ⁺² -Inhibitors in DMSO
PMA:	1 mM Lösung des PKC-Aktivators in DMSO
GF 109203X:	1 mM Lösung des general PKC-Inhibitors in DMSO
GÖ 6976:	10 mM Lösung des konventionell PKC-Inhibitors ($\alpha, \beta 1, \beta 2$ in) DMSO
Rottlerin:	10 mM Lösung des PKC δ -Inhibitors in DMSO
LY294002:	10 mM Lösung des PI3K-Inhibitors in DMSO
L-NAME:	100 mM Lösung des NO-Inhibitors in DMSO
TNF α :	100 $\mu\text{g/ml}$ Lösung in 0,1 %iger BSA/PBS
IL-1 β :	100 $\mu\text{g/ml}$ Lösung in 0,1 %iger BSA/PBS
IFN- γ :	100 $\mu\text{g/ml}$ Lösung in 0,1 %iger BSA/PBS
KN-93:	2 mM Lösung des CaMK II-Inhibitors in DMSO
U73122:	1 mM Lösung des PLC-Inhibitors in DMSO

2.2 Methoden

2.2.1 Methoden zur Kultivierung der Zellen

2.2.1.1 Zellkultur

Für diese Arbeit wurde die murine Insulinom β -Zelllinie MIN-6 (Prof. Schürmann, Potsdam) sowie die primäre humane Pulmonalarterien Endothelzellen (HPAEC) von der Firma ATCC (American Type Culture Collection) verwendet.

2.2.1.2 Lösungen zur Zellkultivierung

HPAECs-Wachstumsmedium

Endothelzellen-Wachstumsmedium (EGM-2 BulletKit) wurde aus Endothelzellbasalmedium (EBM-2) durch Zugabe folgender Substanzen hergestellt:

- 2 % FKS
- Heparin
- VEGF
- R³-IGF-1
- hEGF
- Hydrocortison
- Gentamicin Sulfat/Amphotericin-B
- hFGF-B
- Vitamin C

MIN-6 Zellen-Wachstumsmedium

Für die Kultivierung der murine β -Zelllinie MIN-6 wurde MIN-6 Wachstumsmedium aus DMEM (low glucose 1g/L) durch Zugabe folgender Substanzen hergestellt:

- 10 % FKS
- 4 mM L-Glutamin
- 100 U/ml Penicillin
- 100 μ g/ml Streptomycin

Die Experimente wurden mit DMEM ohne Glucose, FKS und L-Glutamin durchgeführt, da Glutamin über eine Stimulation der Insulinsekretion direkt den Akt-Signalweg beeinflussen kann.

Stoppmedium

10 % FKS
100 U/ml Penicillin
100 µg/ml Streptomycin
in DMEM

HPAECs-Einfriermedium

10 % FKS
10 % DMSO
in EGM-2

MIN-6 Zellen-Einfriermedium

10 % FKS
10 % DMSO
in DMEM

Trypsin-EDTA-Lösung

1,67 mg/ml Trypsin
0,67 mg/ml EDTA
in PBS-Lösung

Krebs-Henseleit-Puffer für HPAECs

modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung (pH-7,4)

132 mM NaCl
3,9 mM KCl
2,8 mM CaCl₂

Material und Methoden

1,2 mM	MgCl ₂
1,5 mM	KH ₂ PO ₄
10 mM	HEPES
5,5 mM	D-Glucose

3 h vor Versuchsbeginn mit HPAECs fand ein Mediumwechsel auf Krebs-Henseleit-Puffer statt.

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) (pH 7,4)

0,2 g/l	KCl
8,0 g/l	NaCl
0,2 g/l	KH ₂ PO ₄
1,44 g/l	NaHPO ₄
in	Aqua bidest.

2.2.1.3 Passagierung der Zellen

Die Zellen wurden in Wachstumsmedium in T75 Kulturflaschen bei 37 °C, 5 % CO₂ und mindestens 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Eine Passagierung der Zellen erfolgte wöchentlich in einem Konfluenzgrad von 80 - 90 %. Dazu wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen um Reste des FKS-haltigen Wachstumsmediums zu entfernen, da diese die Wirkung des Trypsins inhibieren. Das Ablösen der Zellen erfolgte durch Inkubation mit 1,5 ml Trypsin-EDTA-Lösung im Brutschrank für 1 min für MIN-6 Zellen und bei RT für HPAECs. Das Ablösen der Zellen wurde unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Da eine zu lange Inkubation mit Trypsin-EDTA Schädigungen der Zellen auslösen kann, wurde die Trypsinreaktion durch Zugabe von 5 ml Stoppmedium beendet. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml-Röhrchen überführt und für 5 min bei 1200 rpm und 4 °C für HPAECs und bei 900 rpm und 4 °C für MIN-6 Zellen zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellpellets in 10 ml Wachstumsmedium resuspendiert und $1,2 \times 10^6$ Zellen (MIN-6) bzw. 1×10^6 Zellen (HPAECs) in 10 ml Medium in einer Zellkulturflaschen eingesät. Alle 2 Tage wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und durch 10 - 15 ml frisches Wachstumsmedium ersetzt. Für die Experimente wurden HPAECs in den Passagen 7 - 9 und MIN-6 Zellen in den Passagen 17 - 20 verwendet.

2.2.1.4 Kryokonservierung und Auftauen der Zelle

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von 80 - 90 % kultiviert. Dann wurden die Zellen mit PBS gewaschen, abtrypsiniert und bei 1000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in kaltem Einfriermedium derart resuspendiert, dass 1 ml Einfriermedium $1,5 \times 10^6$ MIN-6 Zellen bzw. 1×10^6 HPAECs enthielt. Die Zellen wurden zunächst für 1 Woche bei -80 °C und anschließend bei -196 °C in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Auftauen wurden die tiefgefrorenen Zellen bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und in ein 10 ml-Röhrchen überführt, welches 9 ml PBS enthielt. Nach Zentrifugation bei 4 °C und 1000 rpm für 5 min wurde der DMSO-haltige Überstand abgesaugt, das Zellpellet durch Zugabe von frischem Medium vorsichtig resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt. Nach 1 - 2 Tagen wurde das Medium gewechselt.

2.2.1.5 Zellzahlbestimmung und Aussaat der Zellen

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde der Zellzähler CASY-1 verwendet. Nach Resuspendierung in frischem Wachstumsmedium wurde die Bestimmung der Zellzahl aus 100 µl Zellsuspension in einem Gefäß mit 10 ml isotonischer Lösung CASYton® gemischt und im Zellzähler gemessen. Der Messbereich für die Größe der vitalen Zellen lag zwischen 8 bis 30 µm. Entsprechend der benötigten Zellzahl wurde die Zellsuspension mit Zellkulturmedium verdünnt und in die gewählten Zellkulturschalen verteilt. Um die Zellen gleichmäßig in den Wells zu verteilen, wurde die Platte vorsichtig geschwenkt. Anschließend wurde die Platte bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

2.2.2 Bestimmung der LPA-Gehalte mittels HPLC-ESI-MS/MS

Zur Gehaltsbestimmung verschiedener LPA-Spezies in MIN-6 Zellen wurde die Methode ESI-LC-MS/MS (electrospray ionisation liquid chromatography/tandem mass spectrometry) verwendet. Diese Methode ermöglicht eine Trennung und Bestimmung von Molekülen durch eine Kombination der Flüssigchromatographie mit der Massenspektrometrie. Dabei dient die Chromatographie zur Auftrennung von Molekülen in einem Extraktionsgemisch und die anschließende Massenspektrometrie zur Identifizierung und Quantifizierung der Substanzen. Die Lipidextraktion für die Gehaltsbestimmung wurde nach Bjerve und Baker unter Verwendung von 1-Butanol durchgeführt (Baker et al., 2001; Bjerve et al., 1974).

Für die Quantifizierung des intrazellulären LPA-Gehaltes wurden 2×10^6 MIN-6 Zellen in 6 cm Zellkulturschalen ausgesät und für 48 h kultiviert. Nach der Stimulation mit 300 µM Plamitat in 15 mM Glucose enthaltendem Medium über einen Zeitraum von 24 h, wurden die Zellen mit PBS

gewaschen. Mit Hilfe eines Zellschabers wurden die Zellen in 200 μ l von Zitronensäure-Phosphat-Puffer (30 mM Zitronensäure, 40 mM Na_2HPO_4 , gelöst in Aua. bidest, pH=4) abgekratzt. Die Suspension wurde in einem silikonisierten Glasröhrchen überführt und im Ultraschallbad auf Eis für 15 min homogenisiert. Das Volumen der Proben wurde durch Zugabe von Zitronensäure-Phosphat-Puffer auf exakt 1 ml aufgefüllt und für 1 min durchgemischt. Nun erfolgte die Zugabe von 2 μ l von 17:1-LPA (100 μ M) als internem Standard, 2 ml 1-Butanol und 1 ml wassergesättigtes 1-Butanol (1 Teil H_2O , 1 Teil 1-Butanol, kräftig schütteln, obere Phase ist wassergesättigtes 1-Butanol). Das Gemisch wurde erneut durchgemischt. Die Phasentrennung erfolgte durch 10-minütiges Zentrifugieren bei 4000 rpm und 10 °C. Die obere Phase (Butanolphase) wurde sorgfältig abgenommen und in ein neues Röhrchen überführt. Die Butanolphase wurde unter Stickstoff eingedampft und in 100 μ l MeOH resuspendiert und kurz gevortext und für 10 min auf Eis im Ultraschallbad inkubiert. Die Detektion von LPA erfolgte im targeted-Modus unter Aufzeichnung der dazugehörigen Full-scan-MS-Spektren (m/z 30 - 700) und Full-scan-MS/TOF-Spektren (m/z 30 - 70). Die Messung erfolgte im negativen Ionenmodus.

Tabelle 2.2.2: Parametereinstellungen für die LPA-Bestimmung am Gerät im negativen Ionenmodus

Mobile Phase A	Wasser mit 0,1 % Ammoniumhydroxid		
Mobile Phase B	Methanol/Acetonitril 9:1 (v/v)		
Elutionsart	Gradientenelution:		
	Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
	0	30	70
	2	0	100
	4	0	100
	10	30	70
Flussrate	0,5 ml/min		
Octopolspannung	800 V		
Säule	X-Bridge™ C18 von Waters		
Skimmer	65 V		
Sheatgastemperatur	300 °C		
Sheatgasflussrate	9 l/min		
Nebulizer pressur	30 psig		
Dryinggastemperatur	350 °C		
Dryinggasflussrate	8 l/min		
Kapillarspannung	3000 V		
Fragmentatorspannung	200 V		
Nozlespannung	2000 V		
Kollisionsenergie	LPA 23 V	(17:0-LPA 20 V)	
Precrusor-Ionen [M-H] ⁻	17:0-LPA	<i>m/z</i> 423,2517	
	18:1-LPA	<i>m/z</i> 435,2517	
Detektionszeit	15 min+ 5 min post run		

2.2.3 Methoden zum Nachweis von Proteinen

2.2.3.1 Zellyse

Lösung zur Zellyse

RIPA-Puffer

50 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
150 mM	NaCl
1 %	Nonidet P-40
0,5 %	Na-Desoxycholinsäure
0,1 %	SDS
in	Ca ²⁺ -und Mg ²⁺ -freier PBS-Lösung

supplementiert mit:

10 mM	NaF
1 mM	Na ₃ VO ₄
1 mM	PMSF
2 µg/ml	Aprotinin
10 µg/ml	Leupeptin
1 µg/ml	Pepstatin
5 mM	EDTA
1 mM	EGTA

Durchführung der Zellyse

MIN-6 Zellen wurden in einer Zelldichte von 2×10^5 Zellen in 6-Wellplatten für Western-Blot-Experimente eingesät, ebenso wie 3×10^5 Zellen HPAEC-Zellen in 6 cm Zellkulturschalen. Nach der Stimulation wurden die Zellen mit eiskalter PBS-Lösung gewaschen, mit 50 µl Lyspuffer behandelt und danach 30 min bei 4 °C auf dem Schaukelschüttler inkubiert. Mit Hilfe des Zellschabers wurden

die Zellen abgekratzt und die erhaltenen Zelllysate in Eppendorf-Röhrchen überführt. Anschließend wurden die Zelllysate bei 4 °C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Proteingehaltsbestimmung nach Bradford genutzt.

2.2.3.2 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt des Zelllysates wurde mittels einer modifizierten Methode nach Bradford quantifiziert (Bradford 1976). Zur Proteinbestimmung wurde Bradford-Reagenz im Verhältnis 1:5 mit Aqua bidest verdünnet. Zunächst wurde mittels einer BSA-Lösung bekannter Konzentration (1 µg/µl Aqua bidest) eine Eichkurve erstellt, welche einen Proteingehalt von 0 - 20 µg Protein umfasst. Die Ansätze wurden mit Aqua bidest. zu 100 µl ergänzt und mit 1 ml Bradford-Lösung gemischt. Die Reagenzmischung wurde mit Hilfe eines Photometers bei 595 nm quantifiziert. Für die Proteinbestimmung der Proben wurden 5 µl Zelllysate mit 95 µl Aqua bidest. und 1 ml Bradford-Lösung gemischt und anschließend der Gehalt an Protein mit Hilfe des Photometers und einer erstellten Standardkurve ermittelt. Es wurde für die anschließende Elektrophorese zwischen 50 µg und 80 µg Protein eingesetzt.

2.2.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Lösung für die Gelelektrophorese und Western-Blot-Analyse

Trenngelpuffer (pH 8,8)

1,5 M Tris-HCl

in Aqua bidest.

Trenngel

Tabelle 2.2.3.3: Trenngelzusammensetzung

Polyacrylamidkonzentration	8 %	10 %	12 %
Aqua bidest.	4,7 ml	4,1 ml	3,4 ml
SDS (10 % in Aqua bidest.)	100 µl	100 µl	100 µl
Trenngelpuffer	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl
APS (0,1 g/ml Aqua bidest.)	50 µl	50 µl	50 µl
AcrylamidRotiphorese® Gel 30	2,7 ml	3,3 ml	4 ml

Material und Methoden

Sammelgelpuffer (pH 6,8)

0,5 M Tris-HCl
in Aqua bidest.

Sammelgel (4 % Polyacrylamid)

6,1 ml Aqua bidest.
100 µl SDS (10 % in Aqua bidest.)
2,5 ml Sammelgelpuffer
10 µl TEMED
50 µl APS (0,1 mg in Aqua bidest.)
1,3 ml AcrylamidRotiphorese® Gel 30

Laufpuffer (10 ×, pH 8,3)

30,3 g/l Tris-Base
144 g/l Glycin
10 g/l SDS
in Aqua bidest.

Laemmli Sample Puffer (6×)

1,2 g SDS
6,0 g Glycerol
6 mg Bromphenolblau
385 mg DTT
2,5 ml Tris-HCl (1,5 M, pH 6,8)

Die ganze Mischung wurde auf ca. 50 °C erwärmt und bis zur vollständigen Lösung aller Komponenten mit einem Minirührfisch durchmischt.

Durchführung der SDS-PAGE

Die beschriebene Methode bezieht sich auf das Minigel-System der Firma Biometra. Die Auftrennung des Proteingemisches erfolgte elektrophoretisch durch die diskontinuierliche Gelelektrophorese, mit der Trennung der Proteine nach ihrer Molekularmasse. Trenngelmix (8-12 % Polyacrylamid) wurde zwischen zwei Glasplatten pipettiert und mit Isopropanol beschichtet, um eine Austrocknung und unregelmässige Polymerisation des Gels zu verhindern und etwa 20 min bei RT gehalten. Das 4 %ige Sammelgelmix wurde zusammenpipettiert, kurz gemischt und sofort gegossen. Anschließend wurde der Taschenkamm eingesetzt. Das Sammelgel war nach etwa 20 min bei RT polymerisiert.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte nach Laemmli (Laemmli 1970). Dazu wurden 20 - 70 µg Protein äquivalente Volumina des Zelllysats mit der entsprechenden Menge an 6 × Laemmli Sample Puffer versetzt und zur Denaturierung der Proteine für 5 min auf 95 °C im Heizblock erhitzt. Die aufbereiteten Proben und der Proteingrößenmarker wurden in die Geltaschen eines diskontinuierlichen Systems aus Sammel- und Trenngel aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei konstanter Spannung von 200 V und 60 mA pro Gel in einem mit Laufpuffer gefüllten Elektrophoresesystem.

2.2.3.4 Western-Blot-Analyse

Lösung für die Western-Blot-Analyse

Blotpuffer (10×, pH 8,3)

144 g/l	Glycin
30 g/l	Tris-Base
in	Aqua bidest.

Bjerrum-Schäfer-Nielsen-Puffer

5,82 g/l	Tris-Base
2,93 g/l	Glycin
3,75 ml	10%ige SDS –Lösung
in	Aqua bidest.

TBS Puffer (10×)

12,14 g/l	Tris-HCl
-----------	----------

Material und Methoden

87,66 g/l NaCl

in Aqua bidest

zur Herstellung von TBST wurde 0,1 % Tween 20 hinzugefügt und der pH-Wert auf 8 eingestellt.

Ponceau S-Lösung

0,2 % Ponceau S

In 3%iger Trichloressigsäure

Coomassie-Blue Lösung

45 % Methanol

9 % Essigsäure

0,25 % Coomassie Blue R250

BlockPuffer

5 % Magermilchpuffer Sucofin®

in TBST

Sauer-Basisch Strip-Puffer

Puffer 1

15,01 g/l Glycin

29,22 g/l NaCl

in Aqua bidest.

Der pH wurde mit HCl auf 2 eingestellt.

Puffer 2

60,57 g/l Tris

in Aqua bidest.

Der pH wurde mit NaOH oder HNO₃ auf 11 eingestellt.

Durchführung des Western Blots

Beim Western Blot wurden die aufgetrennten Proteine aus dem Gel durch Anlegen eines elektrischen Feldes auf eine Polyvinylidendifluorid-(PVDF)-Membran transferiert.

Die Gele wurden aus der Elektrophoresekammer genommen und zusammen mit den Filterpapieren und Schwämmen für 15 min in Blotpuffer gelegt. In der Zwischenzeit erfolgte die Aktivierung der PVDF-Membranen in Methanol für 15 sec. Anschließend wurde die Membran mit Aqua bidest. für 2 min gewaschen und dann in Blotpuffer für 15 min equilibriert. Der Proteintransfer erfolgte in zwei Systemen: ein Tank-Blot für Proteine >120 kDa, ein Semi-dry-System für kleine Proteine <10 kDa. Im Tank-Blot wurde 1000 ml Blotpuffer in eine Tank-Blotkammer gefüllt und über Nacht bei konstanter Spannung von 30 V und 90 mA pro Gel geblottet. Im Semi-dry-System diente Bjerrum-Schäfer-Nielsen-Puffer als Transferpuffer und hier wurde bei 25 V für 30 min geblottet (Bjerrum und Schäfer-Nielsen 1986).

Zur Überprüfung des erfolgreichen Transfers der Proteine wurden die Membran mit Ponceau und das Gel mit Coomassie gefärbt. Die Membran wurde dann kurz in TBST-Puffer gewaschen und in 5 %iger Magermilchlösung in TBST eine Stunde in Blockpuffer bei 37 °C geblockt, um eine unspezifische Bindung von Proteinen an der Membran zu verhindern. Nach drei Waschschritten mit TBST für jeweils 5 min bei RT wurden die Membranen mit dem primären Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 in TBST mit 5 % BSA über Nacht bei 4 °C auf dem Schaukelschüttler inkubiert. Danach wurde die Lösung des Primärantikörpers entfernt und dreimal mit TBST gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit Sekundärantikörper (Verdünnung 1:1000 in Blocklösung) bei RT für 1 h. Nach dreimaligem Waschen mit TBST wurde die Membran mit Hilfe des LumiGlo® Chemilumineszenz-Reagenzes behandelt, um die gebundenen Antikörper zu detektieren. Diese Lumineszenzsignalstärke erfolgt mit Hilfe des Detektors ChemiDoc XRS+ System. Für die Detektion von weiteren Proteinen auf derselben Membran wurden die Antikörper durch Inkubation der Membran in Strip-Puffer entfernt. Dazu wurde die Membran kurz in Puffer 1 vorgespült und 10 min bei RT inkubiert, anschließend erfolgte ein kurzes Spülen mit Puffer 2 und 15 min Inkubation, ebenfalls bei RT.

2.2.4 Immunpräzipitation mit Dynabeads

Mit spezifischen Antikörpern können gezielt Proteine aus einem Proteingemisch, wie z. B. Zellysate, gebunden werden. Danach werden der Antikörper an Protein-A- und Protein-G-Beads gekoppelt und die Antikörper-Protein-Komplexe aus dem Proteingemisch präzipitiert. Die Immunpräzipitation in

dieser Arbeit wurde mit Hilfe eines magnetischen Protein-A-Beads (Dynabeads Protein A) vorgenommen.

Die MIN-6 Zellen wurden in 10 cm Kulturschalen eingesät. Nach der Versuchsdurchführung erfolgte die Proteinisolierung und -bestimmung. Für die IP wurde 0,5 mg Protein mit 2 µg Antikörper über Nacht bei 4 °C und unter ständiger Rotation inkubiert. In einem Reaktionsgefäß wurden 50 µl vom Dynabeads überführt und danach mit Hilfe eines Magnetständers der Überstand entfernt. Nach der Mischung des AK-Protein-Komplexes mit den Beads erfolgte eine 30-minütige Inkubation bei RT unter Rotation, um die Bindung des AK an die Beads zu ermöglichen. Danach wurden unter Verwendung eines Magnetständers der Überstand entfernt und die Beads-AK-Komplexe dreimal mit 200 µl PBS/0,01-Tween-20 gewaschen und anschließend mit 1× Laemmli Sample Puffer vermischt und bei 95 °C im Heizblock erhitzt. Dann fand eine SDS-Elektrophorese statt.

2.2.5 Untersuchung der mRNA-Transkription

2.2.5.1 RNA-Isolierung

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus MIN-6 Zellen und HPAEC-Zellen erfolgte unter Verwendung des RNA Isolierungskits (High Pure RNA Isolation Kit) der Firma Roche. Nach der Stimulation wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 200 µl PBS und 400 µl Lysepuffer behandelt. Mittels Zellschaber wurden die Zellen abgelöst, das Lysat in eine Glasfasersäule in einem Sammelgefäß überführt und 15 sec bei 8000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Daraufhin wurden die Proben mit jeweils 100 µl DNase I Lösung (90 µl DNaseI Inkubationspuffer und 10 µl DNaseI) für 15 min bei RT inkubiert. Hierauf erfolgten zwei Waschvorgänge mit 500 µl Waschpuffer I bzw. Waschpuffer II, wonach jeweils 15 sec bei 800 x g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen wurde. Zum Trocknen der Säule erfolgte am Ende für 2 min eine Zentrifugation bei 13.000 x g, nachdem je 200 µl Waschpuffer II auf die Säulen pipettiert worden war. Danach wurden die Säulen jeweils in ein steriles Tube gestellt und die RNA mit 50 µl Elutionspuffer durch 1-minütige Zentrifugation bei 8000 x g in ein von DNase- und RNase freies Eppendorf Tube eluiert. Die eluierten Proben wurden anschließend sofort auf Eis gestellt.

Die Konzentration der RNA-Lösung wurde mit Hilfe eines Photometers unter Verwendung eines pH-neutralen, sterilen Tris-HCl-Puffers bestimmt. In einer Quarzküvette erfolgte die Vermessung von 2 µl RNA-Probe in 98 µl Tris-HCl Puffer (Verdünnung 1:50) im Photometer bei 260 nm und 280 nm.

Die Berechnung der RNA-Konzentration folgt der Formel:

$$\text{RNA-Konzentration [ng/}\mu\text{l]} = A_{260\text{nm}} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

$A_{260\text{nm}}$ = Absorption bei 260 nm

Einen Anhalt zur Reinheit der isolierten RNA gibt das Verhältnis A_{260}/A_{280} . Für die weiteren Analysen wurden nur Gesamt-RNA-Proben verwendet, bei denen die Berechnung dieses Quotienten einen Wert von $> 1,6$ ergab.

2.2.5.2 cDNA-Synthese mittels reverser Transkription

Zur cDNA-Synthese aus der isolierten RNA wurde das Revert Aid™ -First-Strand-cDNA-Synthesis-Kit der Firma Fermentas verwendet. 2 - 3 µg der isolierten RNA aus MIN-6 Zellen und HPAECs wurden zusammen mit 1 µl Oligo-dTPrimern (0,5 µg/ml) bei 65 °C für 5 min denaturiert. Dazu erfolgte die Zugabe von 4 µl des Reaktionspuffers, zusammengesetzt aus 20 nM Tris-HCl (pH 8,3), 3,75 mM KCl und 15 mM MgCl₂, sowie 1 µl des Ribonuclease-Inhibitors RiboLock™ in einer Konzentration von 20 U/µl. Weiterhin wurden 2 µl Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTP, 10 mM) und 1 µl RevertAid M-MuLV Reverse Transkriptase (200 U/µl) zugesetzt und nach Zentrifugation des Gemisches bei 42 °C für 60 min inkubiert. Das Erhitzen des Reaktionsansatzes auf 70 °C für 10 min terminierte die Reaktion. Die synthetisierte cDNA wurde für spätere Anwendungen bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.5.3 Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die real time RT-PCR ist eine Methode zur quantitativen Analyse der Genexpression. Denaturierung der doppelsträngigen DNA, Bindung spezifischer Oligonukleotidprimer an die jeweiligen komplementären DNA-Stränge und Polymerisation neuer DNA-Doppelstränge dienen der raschen Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen. Gleichzeitig interkaliert der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green in die doppelsträngige DNA. Die Quantifizierung der DNA Menge erfolgt durch Fluoreszenzmessung am Ende jedes PCR-Zyklus, wobei das Fluoreszenzsignal zur Menge der PCR-Produkte direkt proportional ist. Für die Amplifikation wurde das Gerät LightCycler 480® verwendet.

Zur Durchführung des Versuchs wurden zunächst geeignete Primer mit Hilfe der Primer Design Software LaserGene (DNASar, Madison, USA) ausgewählt (Tab. 2.2.5.3). Die nachfolgenden Arbeitsschritte wurden unter Kühlung durch Eis durchgeführt. Anschließend erfolgte die Herstellung der Reaktionsansätze, welche sich aus je 2 µl DEPC-Wasser, 0,5 µl sowohl des Reverse- als auch des Forward-Primers (je 10 µM) und 5 µl des SYBR Green I Master Mixes® zusammensetzte. In einer 96-Multiwellplatte wurden 2 µl (entsprechend 50 ng/µl) cDNA vorgelegt, 8 µl der Reaktionslösung zugegeben und die Platte mit Hilfe einer Verschlussfolie verschlossen. Nach Zentrifugation der Platte wurde die Real-Time PCR unter folgenden Bedingungen durchgeführt: initiale Denaturierung für

Material und Methoden

10 min bei 95 °C, 45 Zyklen bestehend aus Denaturierung für 10 sec bei 90 °C, Annealing für 10 sec bei 60 °C und Elongation für 10 sec bei 72 °C. Anschließend wurde eine Schmelzkurve für 1 min bei 65 °C, gefolgt von einer kontinuierlichen Temperaturerhöhung von 0,1 °C/sec bis auf 95 °C erstellt, um die Bildung von unspezifischen Primerdimeren zu kontrollieren. Die relative mRNA-Expression des untersuchten Gens wurde durch die Normalisierung der erhaltenen Daten gegen GAPDH als Referenzen berechnet. Die Größe des jeweiligen PCR-Produktes wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

Tab. 2.2.5.3: Sequenzen der verwendeten Primer

Zielgen	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer
LPA1 _{hum}	5'-TGGCAATCTATGTCAACC-3'	5'-AGGAGCCATGTGCTAAC-3'
LPA2 _{hum}	5'-ACTCGCATCATGCTTCC-3'	5'-TCAGTCAGTCCTGTTGGT-3'
LPA3 _{hum}	5'-GACTGTCTTAGGGGCGTTTGTGGT-3'	5'-TTCACGACGGAGTTGAGCAGCG-3'
LPA4 _{hum}	5'-GGACCCTGCCAATGGTAAC-3'	5'-AGTAGCATTGCCAACCTGG-3'
LPA5 _{hum}	5'-CCTGAGGAGGTCTCTGCTG-3'	5'-GGAGGTCATGGGAATGTGGG-3'
GAPDH _{hum}	5'-ATCATCCCTGCCTCTACT-3'	5'-CTGCTTCACCACCTTCTT-3'
LPA1 _{mur}	5'-ACCGCCGCTTCCATTTCCCTATT-3'	5'-CACAGATGCAGTTCCAGCCACAC-3'
LPA2 _{mur}	5'-GCCCCGTCGCCCCATAACA-3'	5'-CCTTCCTTCCAACCCAGCGTTCC-3'
LPA3 _{mur}	5'-CCCCGGGTCTGGTGGTTC-3'	5'-GAGGCGTCCGTGGCTTAGG-3'
LPA4 _{mur}	5'-GAATGAGCGGTTTGCAGTAAGGAG-3'	5'-TGAGTGCCCAAGAAAGAGTGTGC-3'
LPA5 _{mur}	5'-CTGGCGGCTGTCGTCTATTTCGTCT-3'	5'-AGCACCCCGCGCACCTGAT-3'
PKC α _{mur}	5'-GTCGGGAAATTTAAGGAGCCACAA-3'	5'-TAGTCCGGAGTCCCACAGAAGGTC-3'
PKC β _{mur}	5'-ATCGCTGCTGTATGGACTTATTCA-3'	5'-TCTTGGTCTTCTGTTTGCTCTCAC-3'
PKC δ _{mur}	5'-CACATTGGATTGGCTGGCATTTC-3'	5'-AAGTGGGCTGGATAGGCGTTTTTC-3'
PKC θ _{mur}	5'-GTCTCCCATGCTCCACCAAAAAC-3'	5'-CTCGACGTCATCATCCATCAACAC-3'
PKC γ _{mur}	5'-TCACAACCAGGGCATCATCTACAG-3'	5'-CTCTTCCTCATCTTCCCCATCAAA-3'
PKC ζ _{mur}	5'-AGACTGGGACCTGCTGGAAAAGAA-3'	5'-CTGGGGCCTGGACACAAGAGAT-3'
PDX-1 _{mur}	5'-ACCATGAACAGTGAGGAGCAGTA-3'	5'-TTTTGGAACCAGATTTTGATGTG-3'
GAPDH _{mur}	5'-TTTGGCATTGTGGAAGGGCTCAT-3'	5'-GACGGACACATTGGGGGTAGGAAC-3'

2.2.6 Proliferationsnachweis mittels [³H]-Thymidin-Inkorporation

Lyse-Puffer

50 ml 1% SDS- Lösung

166,7 ml 0,3 M NaOH-Lösung

Ad 500 ml Aqua bidest.

Versuchsdurchführung

Die Proliferation der Zellen wurde durch Einbau von [³H]-Thymidin in die neue gebildete DNA sich teilender Zellen quantifiziert. Dazu wurden 7×10^4 MIN-6 Zellen in 6-Loch-Platten eingesät. Nach 48 h folgte ein Mediumwechsel auf das Basalmedium, und danach eine Stimulation der Zellen für 24 h. In den letzten 4 h wurde folgte 2 μ Ci[³H]-Methyl -Thymidin zugegeben. Die nachfolgenden Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Nach der Stimulation wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Zunächst wurden die Zellen mit 10 %iger eiskalter Trichloressigsäure für 30 min inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit 5 %iger eiskalter Trichloressigsäure für jeweils 10 min erfolgt die Behandlung der Zellen mit 300 μ l Lysispuffer und das Sammeln der Zellreste mit der präzipitierten-DNA mit Hilfe eines Zellschabers. In Szintillationsröhrchen wurden 5 ml des SzintillatorsRotiszint 22 vorgelegt und das DNA-Präzipitāt in die Szintillationsröhrchen überföhrt und danach die Proben in einem Flüssigszintillationsspektrometer (Beckman Coulter LS6000 LL) gemessen.

2.2.7 Quantifizierung der Aktivität der Caspase 3/7

In dieser Arbeit wurde der Caspase-Glo 3/7-Assay der Firma Promega verwendet. Die Caspase-Glo Kit beinhaltet die prolumineszente Substanz Tetrapeptidsequenz Z-DEVD-Aminoluciferin, durch die in der Probe enthaltene Caspasen 3/7 gespalten wurden. Dadurch entsteht ein Substrat, das durch das Enzym Luciferase unter Lumineszenz zur Freisetzung von Licht föhrt (Abb. 2.2.7). Das gemessene Lumineszenzsignal ist proportional zur Caspase-Aktivität in den Zellen.

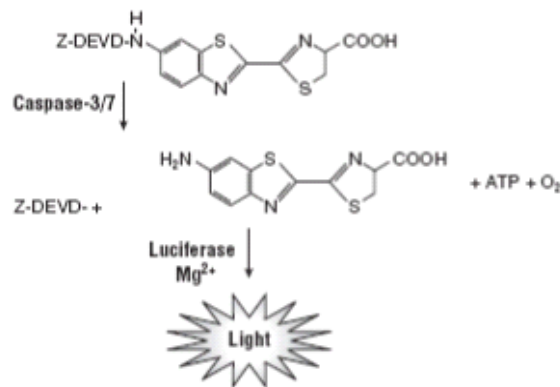


Abbildung 2.2.7: Abspaltung der Z-DEVD-Sequenz von Aminoluciferin durch Caspas 3 und 7 führt zur Freisetzung von Licht. Caspase-Glo 3/7 Assay, Promega

Für die Durchführung des Versuchs wurden 20×10^4 MIN-6 Zellen in einer weißen 96-Loch Platte eingesät und die Zellen 48 h im Brutschrank anwachsen gelassen. Auf dem Basalmedium erfolgte eine Stimulation der Zellen, anschließend wurden 50 ng/ml TNF α , 50 ng/ml IFN- γ und 10 ng/ml IL-1 β zugegeben und für 18 h inkubiert. Nach dem Protokoll des Herstellers wurden Caspase-Glo3/7 und Caspase 3/7 Puffer im vorgegebenen Verhältnis miteinander gemischt und 100 μ l davon in jedes Well gegeben, anschließend die Platte für 1 h im Brutschrank inkubiert. Die entstandene Fluoreszenz wurde mit dem Mikroplattenlesegerät FLUOStar OPTIMA[®] bei 37 °C analysiert.

2.2.8 NO-Bestimmung durch DAF-2D

Eine direktere Detektion der intrazellulären NO-Produktion bietet die Fluoreszenzmikroskopie. Der Fluoreszenzfarbstoff ist das membranpermeable Diaminofluorescindiazetat DAF-2DA, das in die Zellen geschleust wird, um intrazelluläres NO zu messen. Durch die Aktivität intrazellulärer Esterasen entsteht 4, 5-Diaminofluorescein (DAF-2), das mit NO in Anwesenheit von O₂ zum stark fluoreszierenden Triazolofluorescein (DAF-2T) reagiert (Kojima et al., 1998). Die zugrunde liegende Reaktion ist in Abb. 2.2.8 dargestellt.

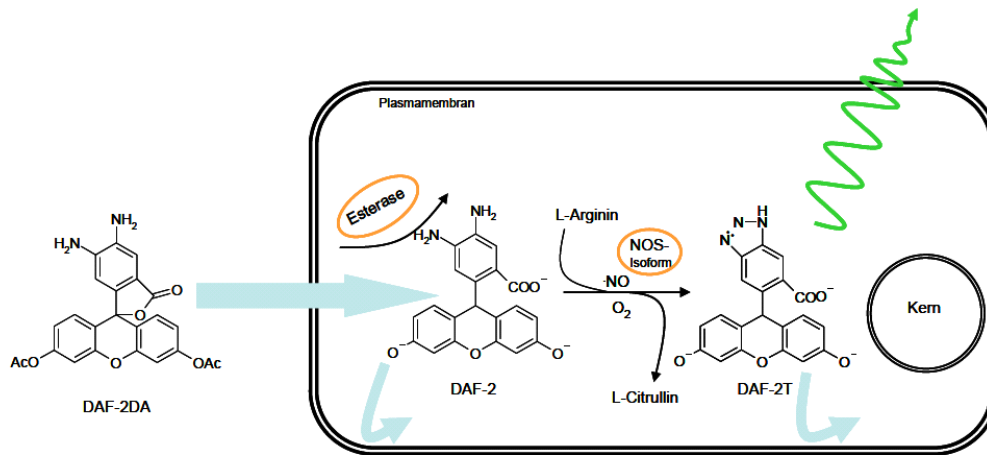


Abbildung 2.2.8: NO-Bestimmung mit DAF-2DA. Modifiziert nach (Kojima et al. 1998).

Zur Durchführung der Versuche wurden 4×10^4 Zellen von HPAECs in einer 12-Loch-Platte eingesät. Nach 24 h folgte 3 h Inkubation der Zellen mit Krebs-Henseleit Puffer und anschließend wurden die Zellen für 30 min in einem Brutschrank mit 10 μ M DAF-2DA inkubiert. Nach der Stimulation mit LPA (10 μ M für 10 min) wurden die Zellen mit PBS-Lösung gewaschen und mit 10 μ l Fluoromount-Lösung fixiert. Im Anschluss wurde die NO-Bildung mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie detektiert.

2.2.9 Organbad-Experimente

In Organbadstudien werden Kontraktion und Relaxation verschiedener Gewebe (Blutgefäße und Bronchus) untersucht. Das Organbad besteht aus doppelwandigen Glasbehältern, welche mit 20 ml Krebs-Henseleit-Lösung befüllt sind. Durch kontinuierliche Begasung dieser Lösung mit Carbogen (Gasgemisch aus 95 % O₂ und 5 % CO₂) wird ein physiologischer pH-Wert von 7,4 gewährleistet. Um in den Organbädern eine gleichbleibende Temperatur von 37 °C zu gewährleisten, werden die äußeren Hohlräume der Glasgefäße mit zirkulierendem, 37 °C warmen Wasser aus dem Heizkreislauf befüllt. Die einzelnen Gefäßringe wurden an jeweils zwei Edelstahlhaken in eine Organbadkammer befestigt. Während der untere Edelstahlhaken unbeweglich am Boden der Kammer eingehängt wurde, war der obere Edelstahlhaken mit einem isometrischen Kraftaufnehmer (TF6V5) und Verstärker (Transducer Coupler TSE 4711 W. Fleck, Mainz, Germany) verbunden, um die Kraftänderung der Ringe zu vermessen. der Messverstärker übertrug die Werte auf einen graphischen Schreiber (Compensograph Siemens C1016).

Gefäßpräparation

Die Untersuchung der Vasoeffekte von LPA erfolgte an der isolierten Pulmonalarterie des Schweins. Die Lungen wurden von weiblichen und kastrierten männlichen Schlachtschweinen (*Sus scrofa*) von der Lehr- und Versuchsanstalt Teltow-Ruhlsdorf mit einem Gewicht zwischen 100 - 120 kg isoliert und in einen gekühlten 4 °C Krebs-Henseleit-Puffer transportiert. Die Pulmonalarterien wurden aus Schweinslungen präpariert und in eine Petrischale mit kalte, und durch Carbogen begaster (95 % O₂, 5 % CO₂), modifizierter Krebs-Henseleit-Lösung gelegt. Nach der Entfernung der umliegenden Binde- und Fettgewebe wurden die Gefäße in 3 - 4 mm lange und 2 mm breite Ringe geschnitten. Mit großer Vorsicht, um das Endothel des Gefäßringes nicht zu verletzen, wurden die Ringe horizontal zwischen zwei L-förmige Edelstahlhaken (300 µm Durchmesser) aufgehängt. Anschließend wurden die Ringe in den Organbädern eingehängt.

Lösungen für Organbadversuche

modifizierter Krebs-Henseleit-Lösung (KHS-Lösung) (pH-7,4)

118 mM	NaCl
4,7 mM	KCl
2,5 mM	CaCl ₂
1,2 mM	MgSO ₄
1,2 mM	KH ₂ PO ₄
25 mM	NaHCO ₃
10 mM	D-Glucose

Ablauf des Organbad-Experiments

Die zugeschnittenen Gefäßringe wurden mit einer Vorspannung von 20 mN für ca. 1 h äquilibriert. Während dieser Äquilibrationsphase wurde die KHS-Lösung in den Kammern alle 15 min (Ruhephase) ausgetauscht und nach jeder Spülung die Vorspannung der Ringe wieder auf 20 mN justiert. Sobald die Vorspannung stabil war, begann der Versuch gestartet. Danach erfolgte die Zugabe von 30 mM KCl in den Kammern, um eine Kontraktion auszulösen. Nachdem die maximale Kontraktion erreicht worden war, wurde 5 min mit frischer KHS-Lösung gespült. Danach folgte eine Ruhephase von 15 min. Sowohl das Waschen als auch die Ruhephase wurden wiederholt, um KCl-

Reste von den Gefäßen zu entfernen. Anschließend wurden die Gefäßringe mit 10 nM U46619 (Thromboxan Rezeptor Agonist) vorkontrahiert. Nach vollständiger Kontraktion erfolgte die Zugabe von 10 nM Bradykinin, einem potenten endothelabhängigen Vasodilatator. Dieser Schritt ist erforderlich, um die Integrität der Endothelschicht zu überprüfen. Die durch Bradykinin-induzierte Relaxation der Arterien wurde mit der von U46619 bewirkten Kontraktion durch ins Verhältnis gesetzt, um die Endothel-Intaktheit prozentual zu ermitteln. Wenn durch die Zugabe von Bradykinin mindestens 80 % der Kontraktion reduziert worden war, wurden die entsprechenden Arterienringe weiter verwendet. Nach einem Waschschrift von 10 min und einer Ruhephase von 15 min erfolgt der relaxierende Effekt von LPA. Anschließend wurden die Gefäße mit 10 nM U46619 vorkontrahiert. Nachdem die Kontraktionsplateaus erreicht worden war, wurde LPA in aufsteigenden Konzentrationen zugegeben. Nach Erreichen des maximalen relaxierenden Effektes von LPA wurde 10 nM Bradykinin zugesetzt und damit die vollständige Relaxation ausgelöst. Die relaxierenden Effekte von LPA wurden in Prozent des maximalen erreichbaren Effektes bei der vollständigen Relaxation nach der Zugabe von Bradykinin angegeben. Nach der Gabe von LPA folgte ein Waschschrift von 10 min mit KHS-Lösung und einer 60-minütige Ruhephase. Das Intervall von 60 min war suffizient, um die Desensibilisierung von LPA zu vermeiden. Die Experimente wurden parallel in Ab- und Anwesenheit des LPA-Rezeptorantagonisten DGPP (10 μ M) durchgeführt. Die Inkubation mit DGPP erfolgte für 15 min vor der Zugabe von U46619. Durch Entfernung des Endothels bzw. Anwendung von eNOS-Inhibitor konnte ausgeschlossen werden, dass die Wirkung von LPA endothelabhängig, bzw. eNOS-vermittelt war. Dabei wurde jeder Ring mit einer Pinzette gerollt um die Endothelschicht der Gefäßringpräparate mechanisch zu entfernen.

2.2.10 Statistische Auswertung

Alle Ergebnisse wurden mindestens zweimal unabhängig voneinander durchgeführt und anschließend die Mittelwerte \pm Standardabweichung berechnet. Die Daten der Organbad-Experimente wurden als Mittelwerte \pm S.E.M. („standard error of the mean“), mit Angabe der Anzahl der Experimente n präsentiert. Die Untersuchung der Daten auf signifikante Unterschiede erfolgte mit dem Student's t-Test ausgewertet. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Bedeutung von LPA für die Insulinresistenz in β -Zellen

3.1.1 Einfluss von Palmitat auf den intrazellulären LPA-Spiegel in MIN-6 Zellen

Die erhöhte Konzentration von FFA ist ein entscheidender Risikofaktor in der Pathogenese des T2D. Eine Erhöhung von FFA führt zur Akkumulation von TG in Nichtfettgewebe, was mit einer Lipotoxizität verbunden ist. Eine Akkumulation von TG in Muskelgewebe und Leber vermindert die durch Insulin stimulierte Glucoseaufnahme und Glucoseoxidation, wohingegen die Akkumulation von TG in pankreatischen β -Zellen zur Reduktion der Insulinsekretion und zur β -Zellapoptose führt. Verschiedene Lipidmediatoren werden aus FFA synthetisiert, die die Pathogenese der peripheren Insulinresistenz und β -Zelldysfunktion beeinflussen. LPA ist seit langem als ein Zwischenprodukt des intrazellulären Fettstoffwechsels während der *de-novo*-Synthese von TG bekannt. LPA kann in den Zellen aus Acyl-CoA und G3P durch die GPAT entstehen. Es wird beschrieben, dass die Inkubation der β -Zellen INS832/13 mit Palmitat und Glucose zum Anstieg der Expression von GPAT führt, was mit einer intrazellulären Akkumulation von DAG und TG und mit einer β -Zelldysfunktion und -tod verbunden ist (El-Assaad et al., 2010). Zudem besteht die Möglichkeit, dass der Gehalt an LPA über den FFA/TG-Zyklus erhöht wird. Aus diesen Gründen wurde der Gehalt von LPA im 15 mM Glucose enthaltenden Medium nach Stimulation mit Palmitat analysiert. Zu diesem Zweck wurden MIN-6 Zellen für 24 h mit 300 μ M Palmitat stimuliert; als Negativkontrollen dienten dabei die unstimulierten Zellen. Anschließend wurde der intrazelluläre LPA-Gehalt von MIN-6 Zellen mittels HPLC-ESI-MS/MS quantifiziert. Die Analyse der intrazellulären LPA-Spezies von MIN-6 Zellen ergab eine signifikante Steigerung im 16:0-LPA-Spiegel im Vergleich zu Negativkontrollen, aber keine signifikante Änderung der 18:1-, 18:0-LPA-Spiegel (Abb. 3.1.1).

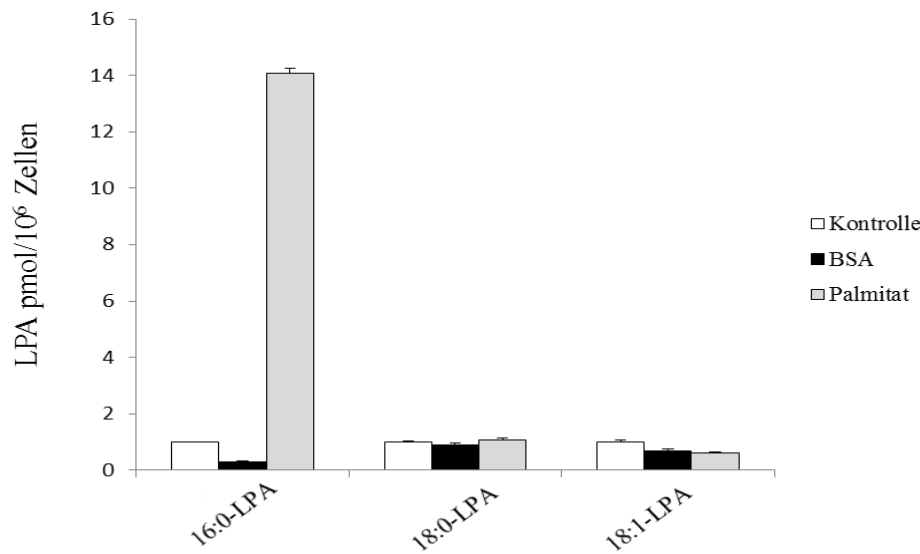


Abbildung 3.1.1: Einfluss von Palmitat auf den intrazellulären LPA-Spiegel in MIN-6 Zellen. Die Zellen wurden mit 300 μM Palmitat in Anwesenheit von 15 mM Glucose für 24 h stimuliert. Die LPA-Quantifizierung erfolgte mittels HPLC-ESI-MS/MS.

3.1.2 Einfluss von LPA auf die Insulin-vermittelte physiologische Wirkung in MIN-6 Zellen

3.1.2.1 Insulin-stimulierte β -Zellproliferation

Insulin spielt eine bedeutsame Rolle in der Regulation der β -Zellmasse durch Erhöhung der Proliferationsrate und Förderung einer anti-apoptischen Wirkung in β -Zellen (Alejandro Johnson, 2008; Ohsugi et al., 2005). Daher wurde der mitogene Effekt von Insulin durch [^3H]-Thymidin-Inkorporation untersucht. MIN-6 Zellen wurden 4 h in Basalmedium inkubiert, anschließend mit Insulin in verschiedenen Konzentrationen für 24 h stimuliert und in den letzten 4 h mit Thymidin behandelt. Die Stimulation mit 1 μM Insulin zeigte den stärksten wachstumsfördernden Effekt im Vergleich zu unstimulierten Zellen (Abb. 3.1.2.1).

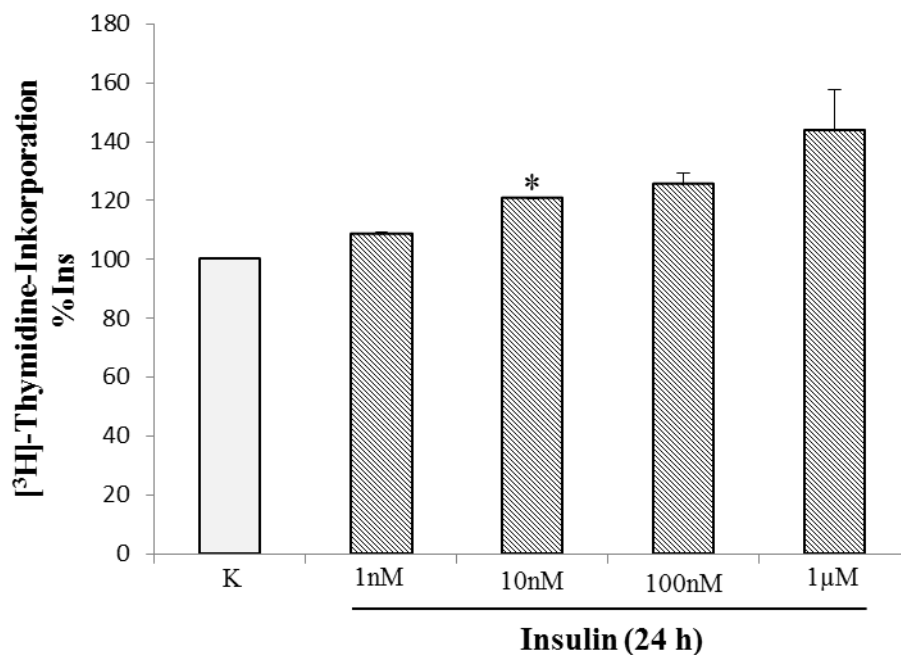


Abbildung 3.1.2.1: Einfluss von Insulin auf die Proliferation der MIN-6 Zellen. MIN-6 Zellen wurden für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen von Insulin stimuliert. Die Proliferationsrate wurde durch Inkorporation mit [³H]-Thymidin untersucht. * $p < 0,05$

3.1.2.2 Einfluss von LPA auf die Insulin-induzierte MIN-6 Zellproliferation

Die β -Zellmasse resultiert vor allem aus der balancierten Regulation zwischen β -Zellwachstum und β -Zellapoptose, welches unter Insulinbedürfnissen für einen konstanten Umsatz der β -Zellen sorgt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die mitogene Aktivität der β -Zellen durch die Stimulation mit Wachstumshormon oder verschiedene Faktoren wie IGF-1 und Insulin ansteigt. Typ-2-Diabetiker weisen im Vergleich zu Gesunden eine 40 - 50 % Reduktion in der β -Zellmasse auf. Dies wird durch eine Reduktion der Proliferation der β -Zellen und durch eine erhöhte Apoptoserate bewirkt. Die Akkumulation von Metaboliten aus FFA in den pankreatischen β -Zellen führt zur Hemmung der Insulinsekretion und Reduktion der β -Zellmasse. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Anstieg des LPA-Gehaltes in β -Zellen nach der Behandlung mit Palmitat nachgewiesen. Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass LPA mit einer Prädisposition für Diabetes korreliert. Hierbei wird eine erhöhte Konzentration von LPA im Plasma der Adipositas/Insulinresistenz und in adipösen HFD-Mäusen nachgewiesen (Dusaulcy et al., 2011; Rancoule et al., 2012). Außerdem löst LPA sowohl eine Störung der Glucosehomöostase über die Hemmung der GSIS als auch eine Reduktion der β -Zellmasse aus (Rancoule et al., 2013). Aus diesen Gründen war die Untersuchung von großem Interesse, ob LPA auch das Wachstum von pankreatischen β -Zellen beeinflussen kann. Der autokrine Effekt von Insulin

fördert die β -Zellproliferation; daher wurde untersucht, ob LPA eine Wirkung auf den mitogenen Effekt des Insulins in MIN-6 Zellen zeigt. Zu diesem Zweck wurde die Proliferation der MIN-6 Zellen mit Hilfe der Thymidin-Inkorporation verifiziert. Nach einer Inkubation von 4 h in Basalmedium wurden MIN-6 Zellen für 10 min mit 10 μ M LPA vorbehandelt und danach mit 1 μ M Insulin für 24 h inkubiert. In den letzten 4 h wurde Thymidin eingesetzt. Die Stimulation mit 1 μ M Insulin induzierte die Proliferation der MIN-6 Zellen, aber die Vorbehandlung mit LPA senkte die insulin-induzierte Proliferation der MIN-6 Zellen. Außerdem zeigte die Inkubation mit LPA allein keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferation der β -Zellen (Abb. 3.1.2.2).

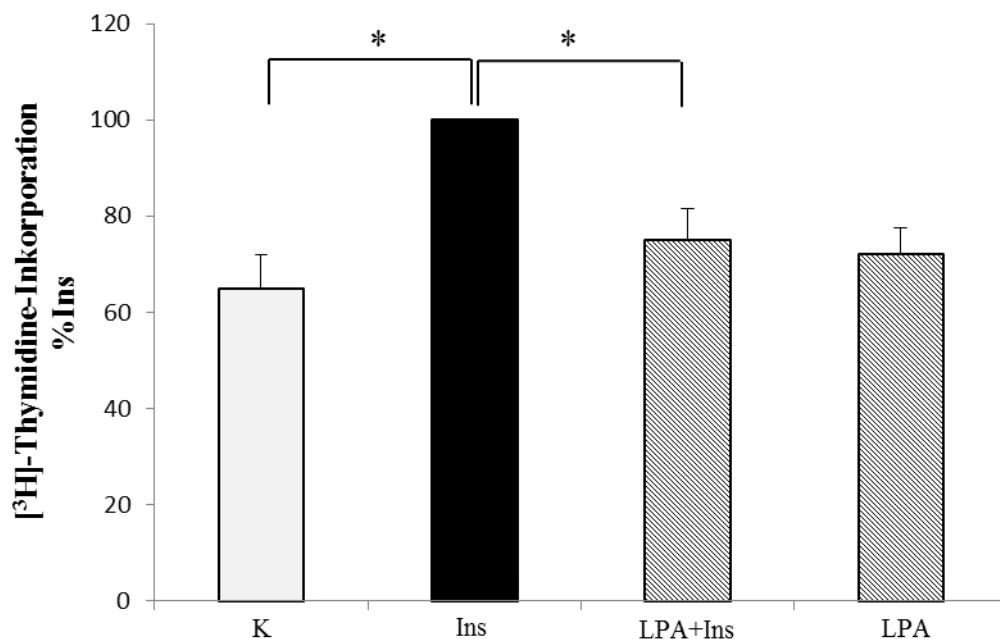


Abbildung 3.1.2.2: Einfluss von LPA auf die Insulin-induzierte MIN-6 Zellproliferation. Nach einer Vorinkubation der Zellen für 10 min mit 10 μ M LPA erfolgte eine Stimulation mit 1 μ M Insulin für 24 h. Die Proliferationsrate wurde durch Inkorporation mit [³H]-Thymidin untersucht. * $p < 0,05$

3.1.2.3 Einfluss von LPA auf den Insulin-vermittelten anti-apoptischen Effekt in den MIN-6 Zellen

Neben der mitogenen Wirkung auf β -Zellen kann Insulin auch einen anti-apoptischen Effekt ausüben (Elghazi et al., 2006; Johnson et al., 2006). In einer Untersuchung mit MIN-6 Zellen konnte nachgewiesen werden, dass Insulin eine konzentrationsabhängige anti-apoptische Wirkung induziert (Müller et al., 2006). Die erhöhte Apoptoserate der Inselzellen beim T2D könnte durch die Hemmung

der insulin-vermittelten Zytoprotektion auftreten. Daher wurde untersucht, ob LPA die anti-apoptotische Wirkung des Insulins beeinflussen kann. Hierzu wurden die Zellen mit 10 μM LPA für 10 min behandelt und mit 1 μM Insulin für 10 min stimuliert. Die Induktion der Apoptose erfolgte durch Behandlung der Zellen mit der Zytokinmischung ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, $\text{INF-}\gamma$) für 18 h. Die Apoptoserate wurde durch eine Messung der Caspase 3/7-Aktivität luminometrisch bestimmt. Dabei zeigte sich ein Anstieg der Caspaseaktivität der behandelten Zellen mit Zytokinen im Vergleich zu nicht behandelten Kontrollen. Die durch Zytokine induzierte Apoptose wurde durch Insulin auf 55 % der apoptotischen Kontrolle reduziert. Die Kombination mit Insulin und LPA führte zur Reduktion der anti-apoptotischen Wirkung des Insulins und einem Anstieg der Caspaseaktivität bis 30 % im Vergleich zu alleiniger Stimulation mit Insulin (Abb. 3.1.2.3). Eine Hemmung der Caspaseaktivität konnte auch durch die alleinige Inkubation mit LPA auftreten. Diese anti-apoptotische Wirkung ist in verschiedenen Zelltypen bekannt.

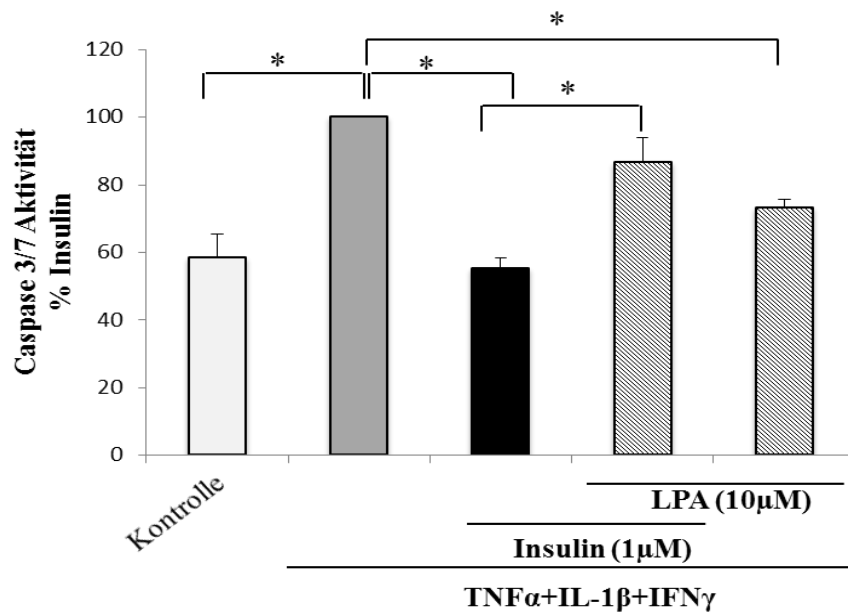


Abbildung 3.1.2.3: Hemmung der anti-apoptotischen Wirkung des Insulins durch LPA. MIN-6 Zellen wurden für 10 min mit 10 μM LPA vorbehandelt, und nach der Stimulation mit 1 μM Insulin für 10 min erfolgte die Inkubation mit Zytokinmischung ($\text{TNF}\alpha$ + $\text{IL-1}\beta$ + $\text{IFN}\gamma$) für 18 h. Die Apoptoserate wurde durch Caspase 3/7-Aktivität mit Hilfe des Luminometers untersucht. * $p < 0,05$

3.1.3 Einfluss von LPA auf Insulin-vermittelte Signalwege in MIN-6 Zellen

3.1.3.1 Bedeutung von Insulin für die Akt-Aktivierung

Sowohl Insulin als auch IGF-1, GLP und GIP spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der β -Zellmasse durch Steigerung der Proliferationsrate und Verminderung der Apoptoserate (Elghazi et al., 2006). Die proliferative und anti-apoptotische Wirkung des Insulins wird vor allem durch die Aktivierung der Akt-Kinase vermittelt (Lawlor Alessi, 2001).

Die Akt-Aktivierung wurde durch die Phosphorylierung an Ser473 mittels Western Blot untersucht. Wie in der Abbildung 3.1.3.1 zu sehen ist, führt die Behandlung mit Insulin zu einer im Vergleich zur Kontrolle deutlich gesteigerten Phosphorylierung von Akt an Ser473 nach 10 min und erreichte die maximale Phosphorylierung nach einer Stimulationsdauer von 30 min. Die Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit zeigte, dass Akt bei Konzentrationen 1 nM und 10 nM von Insulin kaum aktiviert wurde, während bei 100 nM eine deutliche Phosphorylierung zu erkennen war. Die maximale Aktivierung von Akt wurde bei einer Konzentration von 1 μ M Insulin erreicht.

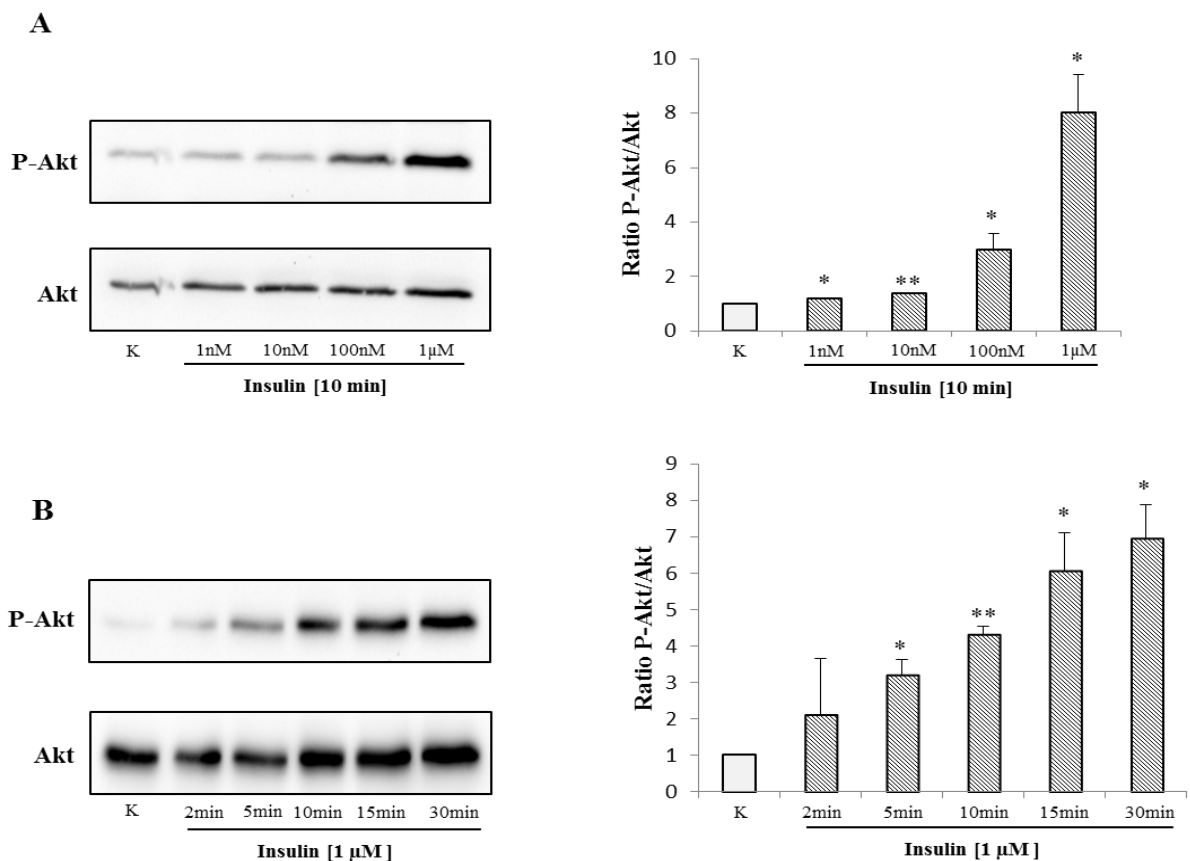


Abbildung 3.1.3.1: Aktivierung der Akt Kinase durch Insulin. Murine β -Zellen (MIN-6) wurden mit Insulin in Konzentrationsreihe (A) oder Zeitreihe (B) stimuliert und durch eine Western-Blot-Analyse auf phospho-Akt (Ser473) untersucht. Die Quantifizierung erfolgte gegen die gesamte Akt-Menge. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

3.1.3.2 Einfluss von LPA auf die Insulin-induzierte Akt-Aktivierung

Die Akt-Kinase scheint ein positiver Regulator der β -Zellmasse zu sein, so dass eine Reduktion der Akt-Aktivität in den β -Zellen zur Steigerung der Apoptoserate und zur Erniedrigung der β -Zellproliferation führt, was mit einer Reduktion der β -Zellmasse einhergeht (Wrede et al., 2002).

LPA hemmt die insulin-induzierte β -Zellproliferation und besitzt einen apoptotischen Effekt. Daher wurden im Folgenden die molekularen Mechanismen dieser Prozesse untersucht. Zuerst sollte ermittelt werden, ob LPA eine Hemmung der Insulin-induzierten Akt-Aktivierung hervorruft.

Dafür wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von LPA für 5 min vorinkubiert und nachfolgend mit $1 \mu\text{M}$ Insulin stimuliert. Anschließend wurde die Akt-Phosphorylierung mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Wie in der Abbildung 3.1.3.2A dargestellt, konnte eine deutliche

Reduktion der Insulin-induzierten Akt-Aktivierung durch LPA ab einer Konzentration von 1 μM gezeigt werden. Die maximale Hemmung wurde bei einer Konzentration von 10 μM LPA erreicht. Es konnte auch eine Zeitabhängigkeit der Hemmung der Insulin-induzierten Akt-Phosphorylierung durch LPA nachgewiesen werden. Hierzu wurden MIN-6 Zellen mit 10 μM LPA über verschiedene Zeiträume behandelt und danach mit 1 μM Insulin stimuliert. Es wurde nach einer Vorinkubation von LPA nach 5 min eine maximale Hemmung der Insulin-aktivierten Akt-Kinase beobachtet (Abb.3.1.3.2B). Interessanterweise verstärkte eine Vorinkubationsdauer von 60 min mit LPA die Insulin-induzierte Akt-Phosphorylierung im Vergleich zur Kontrolle, die ausschließlich mit Insulin stimuliert wurde, während bei einer Inkubationsdauer für 60 min mit LPA allein, also ohne Stimulation mit Insulin, keine aktivierte Akt nachweisbar war.

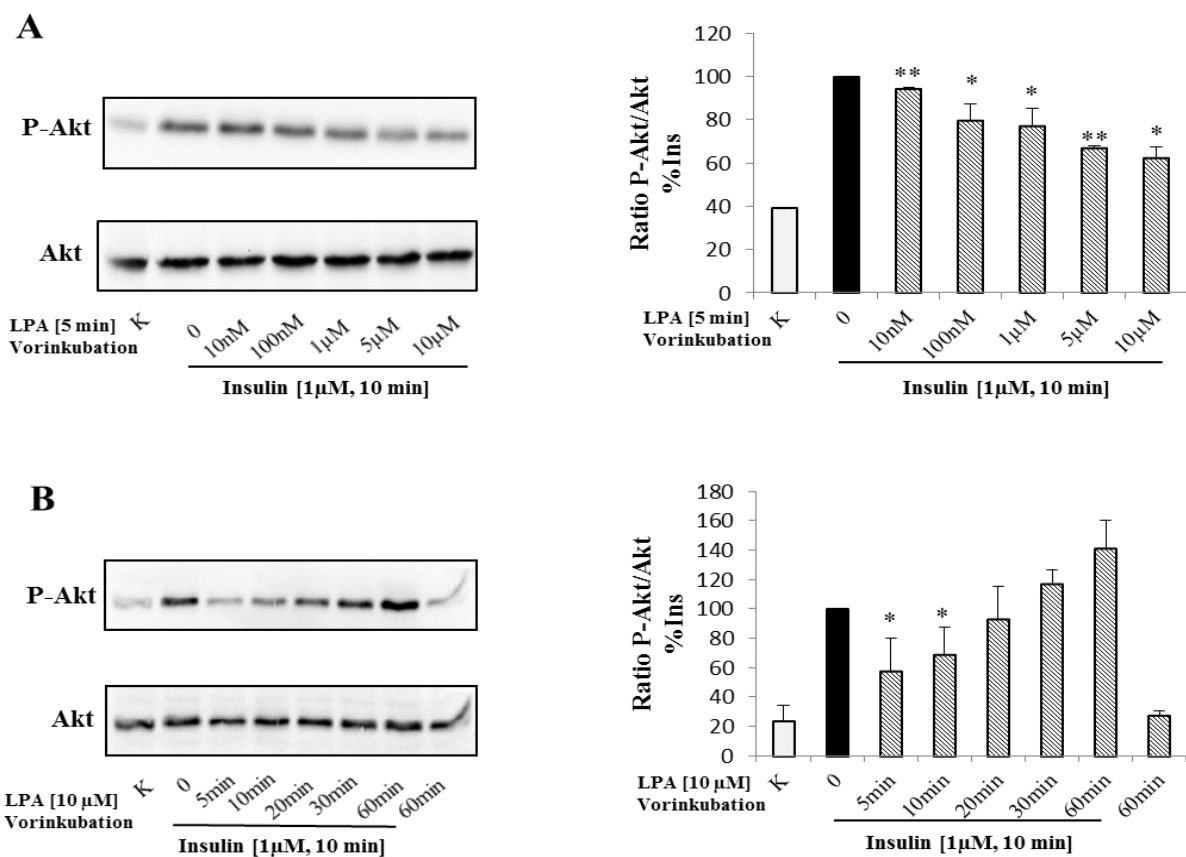


Abbildung 3.1.3.2: Hemmung der Insulin-induzierten Akt-Aktivierung durch LPA. MIN-6 Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen für 5 min (A) oder mit 10 μM LPA über verschiedene Zeiträume (B) vorinkubiert und anschließend mit Insulin stimuliert. Akt-Aktivierung wurde mittels Western Blot durch Verwendung phospho-Akt (Ser473) Antikörper detektiert. Die Quantifizierung erfolgte gegen die gesamte Akt-Menge. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

3.1.3.3 Einfluss von LPA auf die Insulin-induzierte IR β -Aktivierung

Die Bindung von Insulin an seinem IR führt zu einer Tyrosin-Autophosphorylierung an der β -Untereinheit des Rezeptors und reguliert somit verschiedene Funktionen in den β -Zellen. Hierzu gehören Insulingehalt, GSIS und β -Zellmasse. Die Reduktion der Phosphorylierung des IR hat eine Reduktion in der β -Zellmasse zur Folge (Ohsugi et al., 2005). LPA konnte die Insulin-induzierte Akt-Aktivierung hemmen, daher war es von Interesse, zu detektieren, auf welcher Ebene LPA den Insulin-Signalweg inhibieren könnte. Deshalb wurde untersucht, ob LPA auf die Phosphorylierung des IR einwirken kann. Die MIN-6 Zellen wurden mit 10 μ M LPA für 5 min vorinkubiert und danach mit 1 μ M Insulin für 10 min stimuliert. Die Tyrosin-Phosphorylierung von IR β wurde mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Die Abbildung 3.1.3.3 zeigt, dass die Vorinkubation mit LPA zu einer Hemmung der Insulin-induzierten Tyrosin-Phosphorylierung des IR führt.

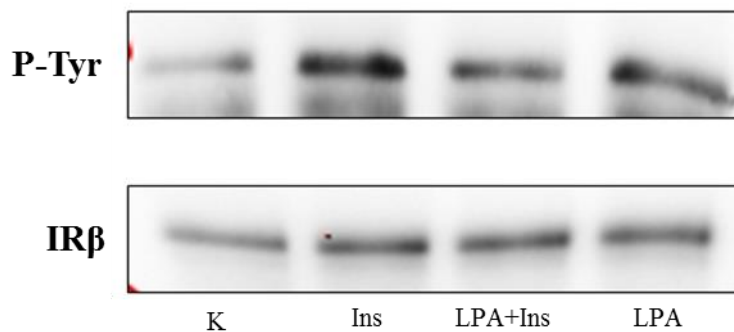


Abbildung 3.1.3.3: Einfluss von LPA auf die Insulin-induzierte Tyrosin-Phosphorylierung von IR β . MIN-6 Zellen wurden für 5 min mit 10 μ M LPA vorinkubiert und anschließend mit 1 μ M Insulin für 10 min stimuliert. Phospho-Tyrosin des IR β wurde mittels IP-Analyse untersucht.

3.1.3.4 Einfluss von LPA auf die Insulin-induzierte IRS-2-Phosphorylierung

Das IRS-2 besitzt eine Schlüsselfunktion für die Regulation der β -Zellproliferation und des β -Zellüberlebens. Frühere Studien konnten zeigen, dass die Behandlung mit FFA zu einer Reduktion der Tyrosin-Phosphorylierung von IRS-2 führt und dadurch die Apoptoserate der β -Zellen erhöht ist, was eine Reduzierung der β -Zellmasse zur Folge hat (Lingohr et al., 2003).

Daher wurde der Effekt von LPA auf die Tyrosinaktivität des IRS-2 mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Hierfür wurden MIN-6 Zellen mit 10 μ M LPA für 5 min vorinkubiert und danach für 10 min mit 1 μ M Insulin stimuliert. Wie in der Abbildung 3.1.3.4 zu sehen, führt die Vorinkubation

mit LPA im Vergleich zu von Insulin-stimulierten Zellen zur Reduktion der Tyrosin-Phosphorylierung von IRS-2.

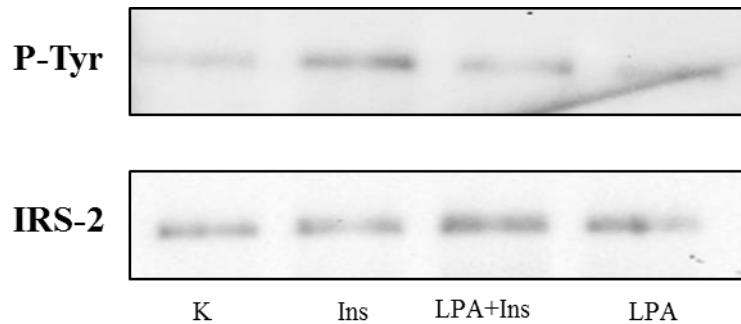


Abbildung 3.1.3.4: Einfluss von LPA auf die Insulin-induzierte Tyrosin-Phosphorylierung des IRS-2. MIN-6 Zellen wurden mit 10 μ M LPA für 5 min vorinkubiert und anschließend mit 1 μ M Insulin für 10 min stimuliert. Phospho-Tyrosin des IRS-2 wurde mittels IP-Analyse untersucht.

3.1.3.5 Einfluss von LPA auf die Insulin-induzierte PI3K-Aktivierung

Des Weiteren wurde der Einfluss von LPA auf die Insulin-vermittelte PI3K-Aktivität mittels Western-Blot-Analyse nachgewiesen. Hierzu wurde die Phosphorylierung von PI3K an P85 (Tyr458)/P55 (Tyr199) untersucht. Es konnte eine deutliche Erniedrigung der PI3K-Phosphorylierung durch die Vorinkubation der MIN-6 Zellen mit 10 μ M LPA im Vergleich zu den stimulierten Zellen mit 1 μ M Insulin detektiert werden (Abb. 3.1.3.5).

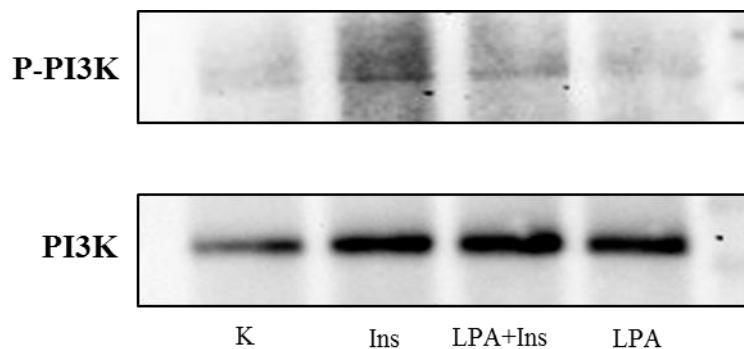


Abbildung 31.3.5: Einfluss von LPA auf die Insulin-induzierte PI3K-Phosphorylierung. Murine β -Zellen (MIN-6) wurden mit 10 μ M LPA für 5 min vorinkubiert und anschließend mit 1 μ M Insulin für 10 min stimuliert. Phospho-PI3K an P85(Tyr458)/P55(Tyr199) wurde mittels Western-Blot-Analyse untersucht.

3.1.3.6 Einfluss von LPA auf die Insulin-induzierte GSK-3 β -Phosphorylierung

Akt vermittelt die Regulation der β -Zellmasse über verschiedene Signalwege. GSK3 β wird von Akt phosphoryliert und spielt eine wichtige Rolle in der Proliferation und Funktion der β -Zellen. Eine Überexpression von GSK-3 β in diabetischen Mausmodellen zeigt, dass es zur Reduktion der β -Zellproliferation und Abnahme der β -Zellmasse kommt (Z. Liu et al., 2008).

Daher wurde untersucht, ob LPA die GSK-3 β beeinflussen kann. Die Detektion der Phosphorylierung an Ser9 der GSK-3 β erfolgte mittels Western Blot. Hierzu wurden die Zellen für 5 min mit 10 μ M LPA vorbehandelt. Anschließend erfolgte die Stimulation für 10 min mit 1 μ M Insulin. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass Insulin die GSK-3 β phosphorylieren kann und diese Phosphorylierung durch die Vorinkubation mit LPA aufgehoben wird (Abb. 3.1.3.6).

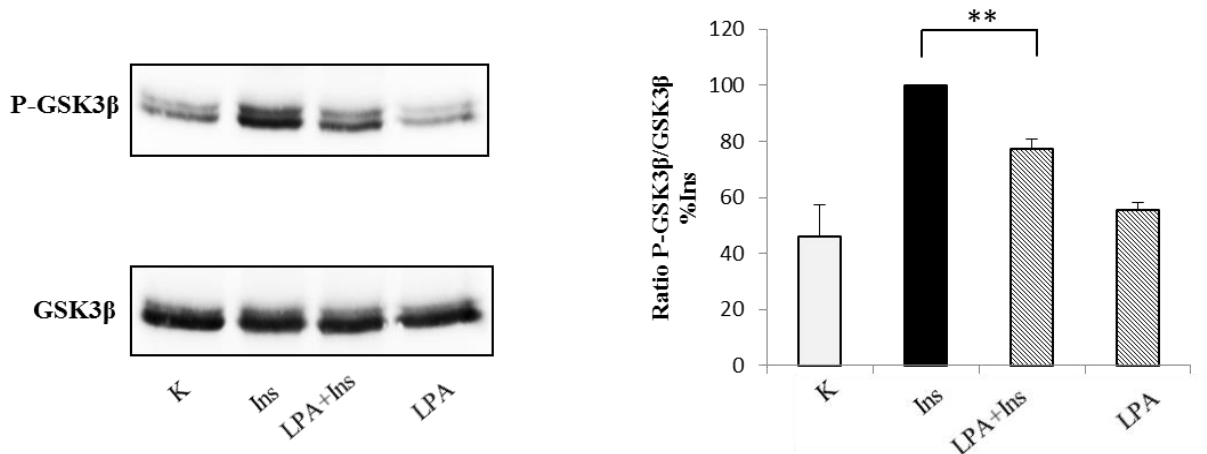


Abbildung 3.1.3.6: Einfluss von LPA auf die Insulin-induzierte GSK3 β -Phosphorylierung. Murine β -Zellen (MIN-6) wurden mit 10 μ M LPA für 5 min vorinkubiert und anschließend mit 1 μ M Insulin für 10 min stimuliert. Phospho-GSK3 β an Ser9 wurde mittels Western-Blot-Analyse untersucht. $**p < 0,01$

3.1.3.7 Einfluss von LPA auf die Insulin-induzierte mTOR/P70S6K-Phosphorylierung

Das Protein mTOR stellt ein Substrat der Akt dar und reguliert ebenfalls die Größe, Proliferation und Masse der β -Zellen. Es ist bekannt, dass eine Hemmung von mTOR durch Rapamycin zu einer deutlichen Reduzierung der Akt-induzierten Größe, Proliferation und Expansion der β -Zellen führt. S6K ist ein Target von mTOR und ein wesentlicher Regulator für die Proteinsynthese und Zellgröße

(Blandino-Rosano et al., 2012). Die genetische Ablation der S6K in Mäusen führt zur Reduktion der β -Zellgröße und zur Abnahme der β -Zellmasse (Xie Herbert, 2012). Folglich wurde eine mögliche Beteiligung des mTOR/S6K-Signalweges am Effekt von LPA auf den Insulin-Signalweg in MIN-6 Zellen näher untersucht. Hierzu wurde die Phosphorylierung von mTOR an Ser2448 und die Phosphorylierung der S6K an Thr389 mittels Western Blot untersucht. Wie in Abb. 3.1.3.7 zu sehen ist, führt die Vorinkubation mit LPA zu einer leichten Reduktion der Insulin-induzierten mTOR-Phosphorylierung und zu einer deutlichen Abnahme der Insulin-aktivierten S6K.

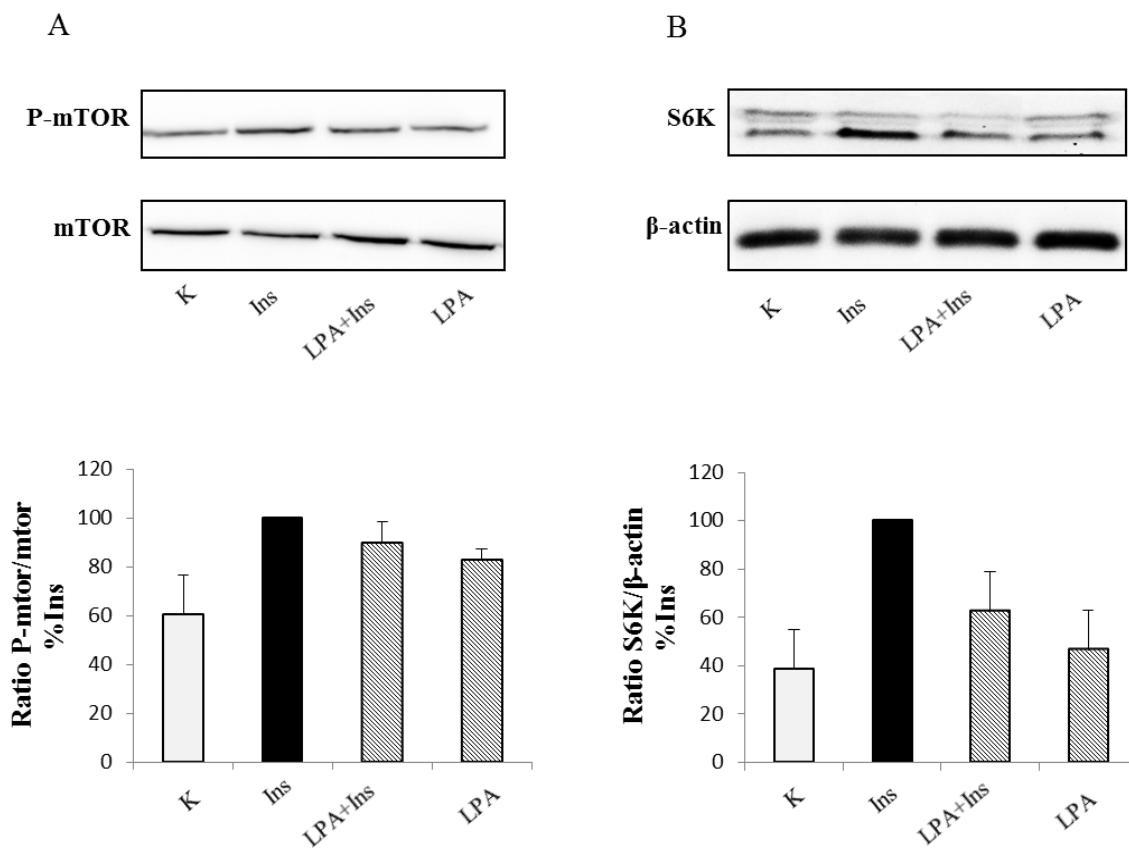


Abbildung 3.1.3.7: Einfluss von LPA auf den Insulin-induzierte mTOR/S6K Signalweg. Nach einer Vorbehandlung der MIN-6 Zellen für 5 min mit 10 μ M LPA erfolgte einer Stimulation für 10 min mit 1 μ M Insulin. Phospho-mTOR an Ser2448 (A) und Phospho-S6K an Thr389 (B) wurden mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Die Quantifizierung erfolgte gegen die gesamte mTOR- und β -actin-Menge.

3.1.3.8 Einfluss von LPA auf die Insulin-induzierte FOXO-Phosphorylierung

Im weiteren Verlauf wurde der Einfluss von LPA auf die FOXO1 untersucht. FOXO1 ist ein wichtiges Target für den Insulin-Signalweg und der Regulation der β -Zellmasse. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Überexpression von FOXO1 die Proliferation und Überleben der β -Zellen hemmt (Buteau et al., 2006). Zur Durchführung des Versuchs wurden MIN-6 Zellen für 5 min mit 10 μ M LPA vorinkubiert und danach mit 1 μ M Insulin stimuliert. Es konnte gezeigt werden, dass die Stimulation der Zellen mit Insulin eine deutliche Phosphorylierung der FOXO1 hervorruft, wohingegen die Vorinkubation mit LPA zu einer Hemmung der Insulin-vermittelten FOXO1-Phosphorylierung führt (Abb.3.1.3.8).

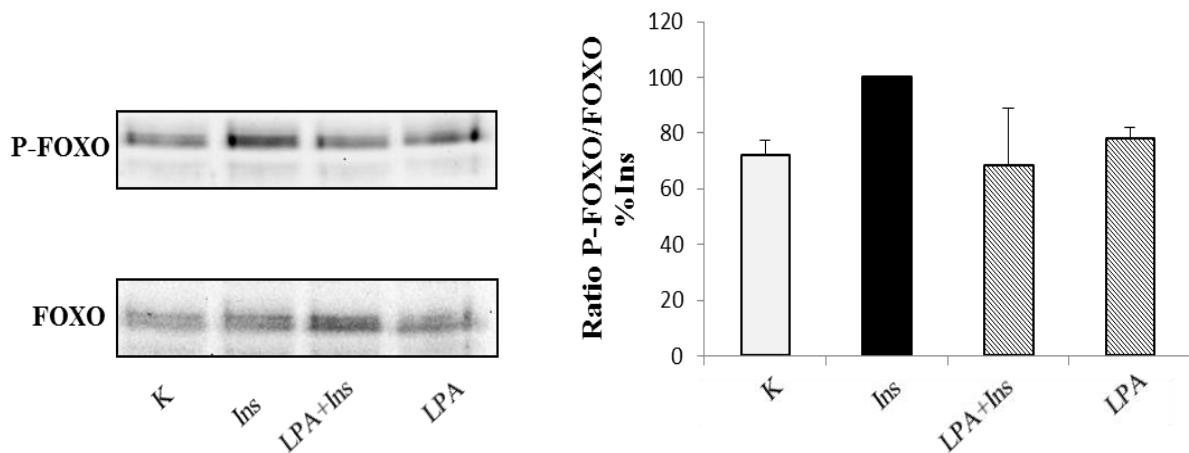


Abbildung 3.1.3.8: Einfluss von LPA auf die Insulin-induzierte FOXO-Phosphorylierung. MIN-6 Zellen wurden für 5 min mit 10 μ M LPA vorbehandelt, nachfolgend 10 min mit Insulin stimuliert und durch Western-Blot-Analyse unter Verwendung spezifischer phospho-FOXO (Thr24)/FOXO3a(Thr32) Antikörper untersucht.

3.1.3.9 Einfluss von LPA auf Insulin-Aktivierte PDX-1

Weiterhin wurde der Einfluss von LPA auf die PDX-1 untersucht. PDX-1 ist ein Transkriptionsfaktor, der eine entscheidende Rolle bei der pankreatischen β -Zellfunktion und -proliferation spielt. Es ist bekannt, dass PDX-1-Knockout-Mäuse eine Störung der GSIS sowie eine Reduktion der β -Zellmasse aufweisen, was zur Entwicklung des T2D beiträgt. Hierzu erfolgten die Vorinkubation der MIN-6 Zellen mit 10 μ M LPA im Verlauf von 2, 4, 6 h und anschließend die Stimulation mit 1 μ M Insulin für 2 h. Für die Untersuchung der Expression von PDX1 wurde der mRNA-Ebene durch RT-PCR vorgenommen. Wie in der Abbildung 3.1.3.9 dargestellt, zeigte die Vorinkubation der MIN-6 Zellen

mit LPA eine Reduktion der Expression von PDX-1 im Verlauf der Vorinkubationszeit gegenüber den mit Insulin stimulierten Zellen.

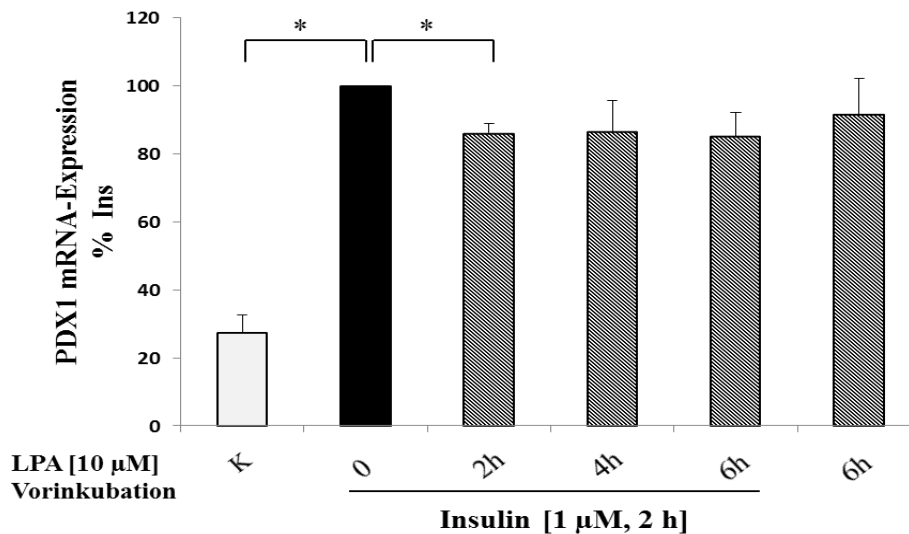


Abbildung 3.1.3.9: Einfluss von LPA auf die Aktivierte PDX-1 durch Insulin. MIN-6 Zellen wurden über verschiedene Zeiträume mit 10 µM vorinkubiert und anschließend mit 1 µM Insulin für 2 h stimuliert. PDX-1-Expression wurde durch RT-PCR untersucht. Die Normalisierung erfolgte gegen GAPDH als Referenzgen. Die Ergebnisse konnten jeweils in zwei weiteren unabhängigen Experimenten reproduziert werden.

3.1.3.10 Einfluss von 16:0-LPA auf die Insulin-vermittelte Akt-Aktivierung

In der vorliegenden Arbeit wurde herausgefunden, dass 16:0-LPA-Spiegel in MIN-6 Zellen durch die Stimulation mit Palmitat gesteigert werden. Da alle bisherigen Experimente dieser Arbeit mit 18:1-LPA durchgeführt wurden, welche eine hohe Affinität zu den LPA-Rezeptoren besitzt, war von Interesse zu untersuchen, ob 16:0-LPA einen ähnlichen Einfluss auf den Insulin-Signalweg zeigt. Für dieses Ziel wurde die Akt-Aktivierung mittels Western Blot detektiert. Eine Vorstimulation der MIN-6 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von LPA für 5 min und anschließender Stimulation für 10 min mit 1 µM Insulin führte zu einer signifikanten Hemmung der Akt-Phosphorylierung bei Konzentrationen von 1 µM und 5 µM (Abb. 3.1.3.10A). LPA zeigte auch eine zeitabhängige Hemmung der Akt-Phosphorylierung in MIN-6 Zellen. Eine signifikante Hemmung der Akt-Phosphorylierung konnte bei 5 min beobachtet werden (Abb. 3.1.3.10B). Dies weist darauf hin, dass beide, 16:0- und 18:1-LPA, einen ähnlichen Effekt auf den Insulin-Signalweg ausüben.

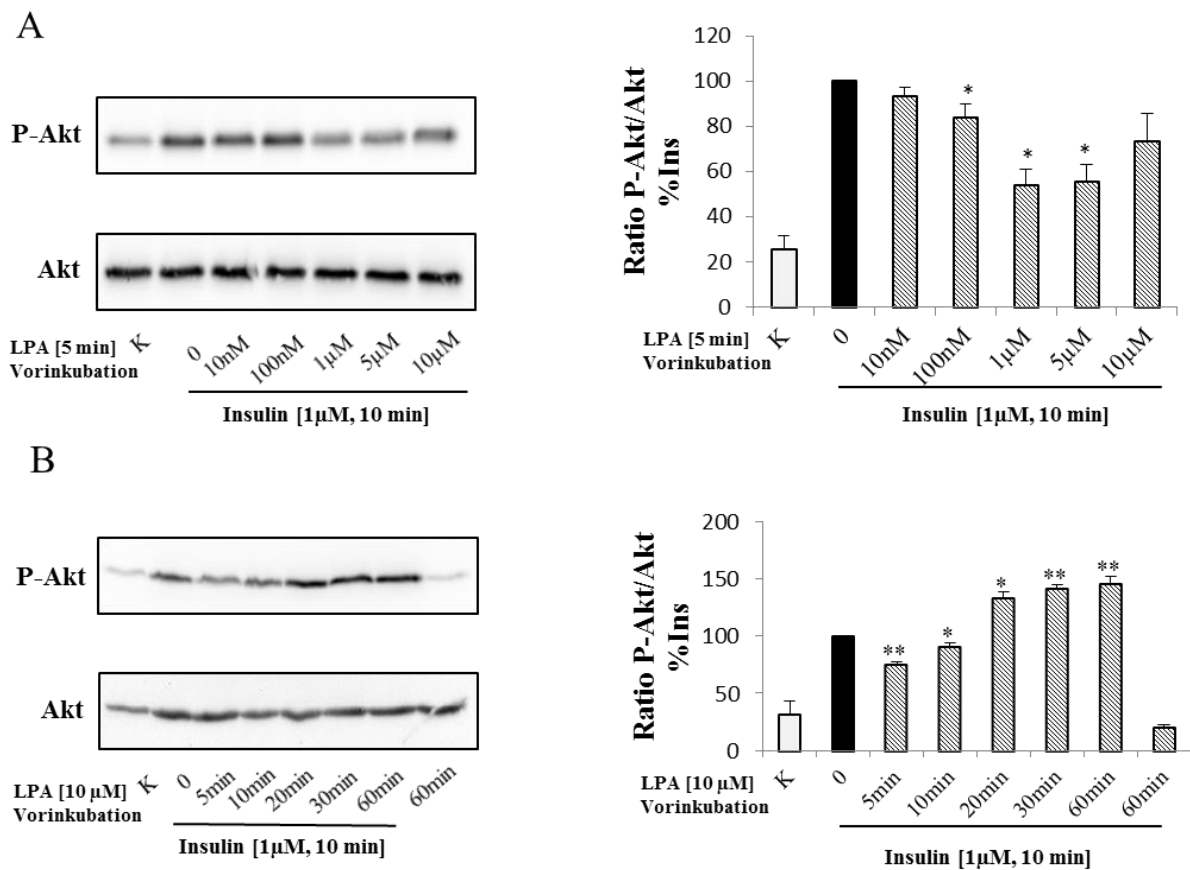


Abbildung 3.1.3.10: Einfluss von LPA 16:0 auf die Insulin-induzierte Akt-Aktivierung. MIN-6 Zellen wurden mit unterschiedlichen LPA-Konzentrationen für 5 min (A) oder mit 10 μM LPA über verschiedene Zeiträume (B) vorinkubiert und anschließend mit 1 μM Insulin für 10 min behandelt. Im Anschluss erfolgte die Untersuchung der Akt-Aktivierung mittels Western Blot unter Verwendung spezifischer phospho-Akt (Ser473) Antikörper. Die Quantifizierung erfolgte gegen die gesamte Akt-Menge. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

3.1.3.11 Einfluss von LPA auf die Insulin-induzierte ERK-Phosphorylierung

ERK1/2 wird durch den zweiten Insulin-Signalweg (Ras/Raf/MAPK) aktiviert. ERK1/2-Aktivierung fördert vor allem die Proliferation und das Wachstum der β-Zellen (Alejandro et al., 2010). Nun wurde die Interaktion zwischen LPA und ERK1/2 untersucht. Dafür wurden spezifische Antikörper für Phospho-P44/42-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) mittels Western Blot verwendet. Es zeigte sich, dass Insulin zu einer deutlichen ERK1/2-Phosphorylierung in MIN-6 Zellen führte. Außerdem induzierte LPA eine Phosphorylierung der ERK1/2 in den MIN-6 Zellen. Im Gegensatz zur insulinabhängigen ERK-Phosphorylierung war jedoch durch Vorbehandlung der Zellen mit LPA die ERK1/2-Phosphorylierung stark reduziert (Abb. 3.1.3.11).

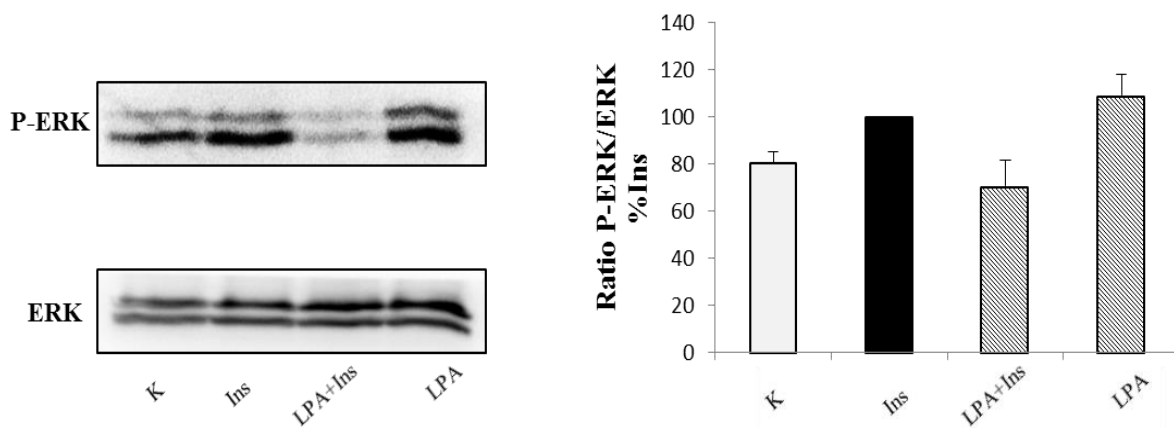


Abbildung 3.1.3.11: Einfluss von LPA auf die Insulin-induzierte ERK-Phosphorylierung. Nach einer Vorbehandlung der MIN-6 Zellen für 5 min mit 10 μ M LPA erfolgte einer Stimulation für 10 min mit 1 μ M Insulin. Phospho-P44/42-ERK1/2 an (Thr202/Tyr204) wurde mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Die Quantifizierung erfolgte gegen die gesamte ERK-Menge.

3.1.4 Bedeutung von LPA-Rezeptoren bei der Hemmung der Insulin-vermittelten Signalwege

3.1.4.1 Expression von LPA-Rezeptoren in MIN-6 Zellen

LPA kann einen großen Teil seiner zellulären Effekte über sechs Subtypen von G-Protein-gekoppelten LPA-Rezeptoren vermitteln. Unterschiedliche Expressionsmuster der LPA-Rezeptoren sind vom Zelltyp abhängig. In der humanen β -Zelllinie von PANC-1-Zellen ist die Expression der LPA_(1/2/3)-Rezeptorsubtypen nachgewiesen, jedoch wird LPA₃-Rezeptor stark exprimiert, der LPA₂-Rezeptor sehr gering (Liao et al., 2013). Im Hinblick auf die Vergleichbarkeit der humanen PANC-1 Zellen mit den in dieser Arbeit verwendeten murinen MIN-6 Zellen wurde der Gehalt an mRNA-Transkripten der LPA-Rezeptoren in den MIN-6 Zellen über eine quantitative Real-Time-PCR charakterisiert. Die Normalisierung der gewonnenen Daten gegen GAPDH als Referenzgen zeigte alle LPA-Rezeptorsubtypen in MIN-6 Zellen mit der stärksten Expression des LPA₂-Rezeptorsubtyps im Vergleich zu den PANC-1 Zellen (Abb.3.1.4.1). Der LPA₆-Rezeptor in MIN-6 Zellen wurde in dieser Arbeit nicht quantifiziert.

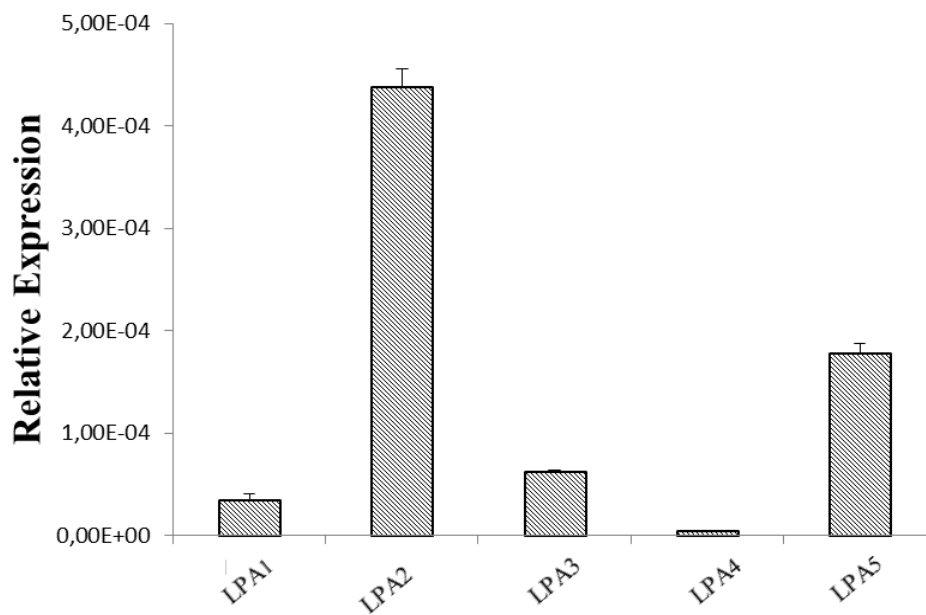


Abbildung 3.1.4.1: LPA-Rezeptorexpression in murinen β -Zellen (MIN-6). MIN-6 Zellen wurden für 24 h in Wachstumsmedium kultiviert. Die mRNA wurde isoliert und in cDNA umgeschrieben, anschließend wurde die LPA-Rezeptorexpression mittels RT-PCR analysiert. Die Normalisierung erfolgte gegen GAPDH als Referenzen. Die Ergebnisse konnten jeweils in zwei weiteren unabhängigen Experimenten reproduziert werden.

3.1.4.2 Einfluss von LPA-Rezeptoren-Agonisten und -Antagonisten auf die Insulin-vermittelte Akt-Aktivität

Nachdem gezeigt wurde, dass LPA für die Inhibierung der Insulin-induzierten Akt- Phosphorylierung mit nachfolgender Reduktion der β -Zellproliferation und Hemmung des β -Zellüberlebens verantwortlich war, sollte im Folgenden untersucht werden, über welchen Rezeptor die Akt-Phosphorylierung gehemmt wird. Dafür wurde der rezeptorspezifische Agonist OMPT, ein Agonist am LPA₃-Rezeptor, eingesetzt und anschließend mit Insulin stimuliert. Die Vorinkubation der MIN-6 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von OMPT führte zur signifikanten Hemmung der Insulin-induzierten Akt-Aktivität, die maximale Hemmung war bei einer Konzentration von 1 μ M von OMPT messbar (Abb. 3.1.4.2A). Außerdem wurde auch VPC12249, ein Antagonist an LPA_{1/3}-Rezeptoren, verwendet. Durch den Einsatz von 10 μ M VPC12249 für 30 min wurde die Hemmung der Insulin-vermittelten Akt-Aktivierung durch LPA im Vergleich zu mit LPA und Insulin inkubierten Zellen aufgehoben (Abb. 3.1.4.2B).

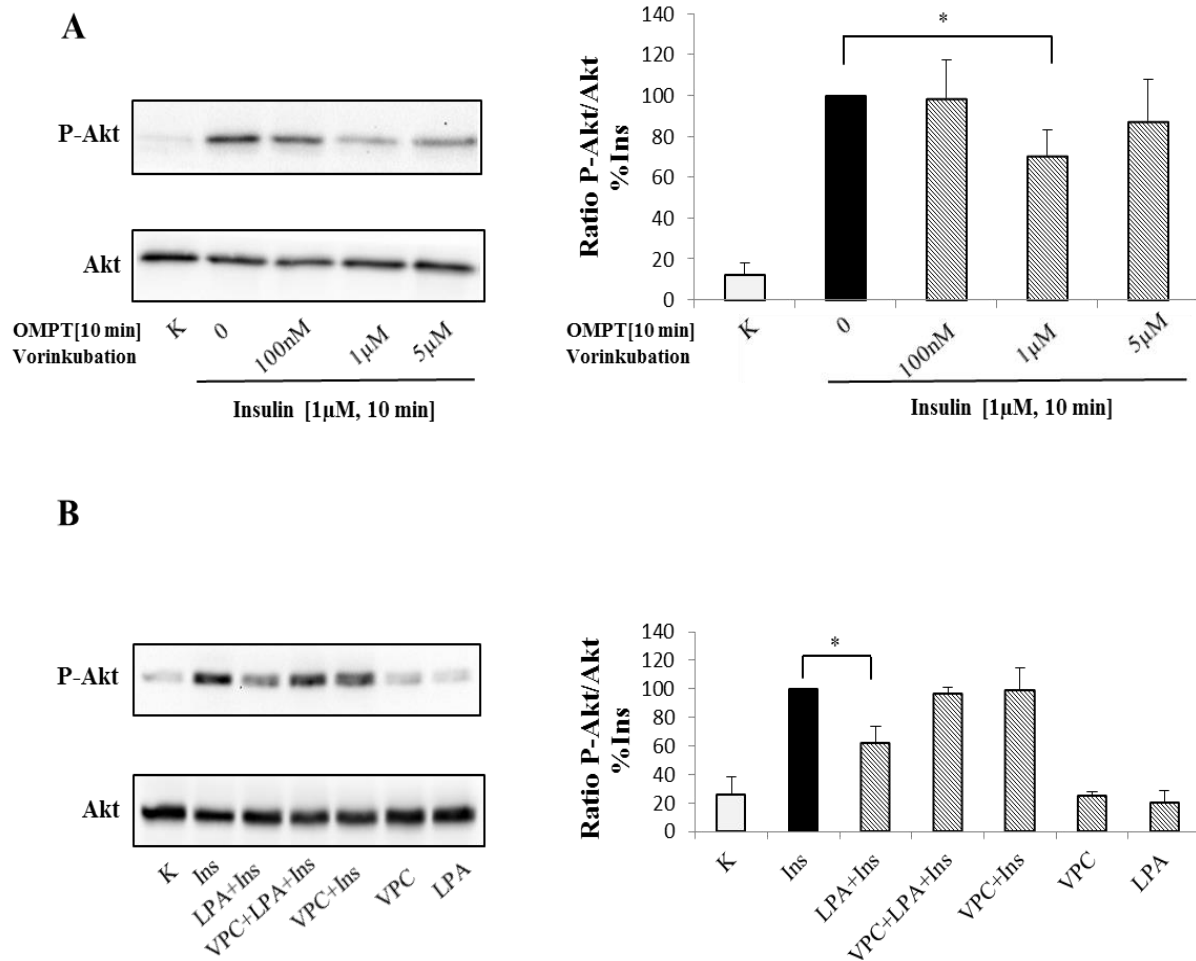


Abbildung 3.1.4.2: Einfluss von VPC12249 und OMPT auf die Hemmung der Akt-Phosphorylierung durch LPA. MIN-6 Zellen wurden mit unterschiedlichen OMPT-Konzentrationen für 10 min vorstimuliert und anschließend mit Insulin stimuliert (A) Nach der Behandlung der MIN-6 Zellen mit 10 µM VPC12249 für 30 min erfolgte eine Vorstimulation mit LPA und anschließend mit Insulin stimuliert (B). Die Bestimmung der Akt-Aktivierung erfolgte durch Western-Blot-Analyse unter Verwendung spezifischer phospho-Akt (Ser473) Antikörper. Die Quantifizierung erfolgte durch eine Bildung der Quotient aus phosphoryliertem Akt zu gesamten Akt-Menge. * $p < 0,05$

3.1.4.3 Einfluss von LPA-Rezeptor-Agonisten auf die Insulin-induzierte β -Zellproliferation

Die vorliegende Arbeit zeigt eine mögliche Beteiligung des LPA₃-Rezeptors an der Hemmwirkung des LPA auf die Insulin-induzierte Akt-Aktivierung. Im nachfolgenden wurde untersucht, ob die proliferationshemmende Wirkung des LPA auch durch den LPA₃-Rezeptor vermittelt wird. Dazu wurden die Zellen mit 5 µM OMPT für 10 min vorinkubiert und anschließend mit 1 µM Insulin für

24 h stimuliert. Die Vorbehandlung mit OMPT führte zur Hemmung der Insulin-induzierten β -Zellproliferation im Vergleich zu mit insulin-stimulierten Zellen (Abb. 3.1.4.3). Für diesen Versuch konnte kein LPA_{1/3}-Antagonist (VPC12249) verwendet werden, da VPC12249 bei langer Inkubationsdauer auf MIN-6 Zellen toxisch wirkte.

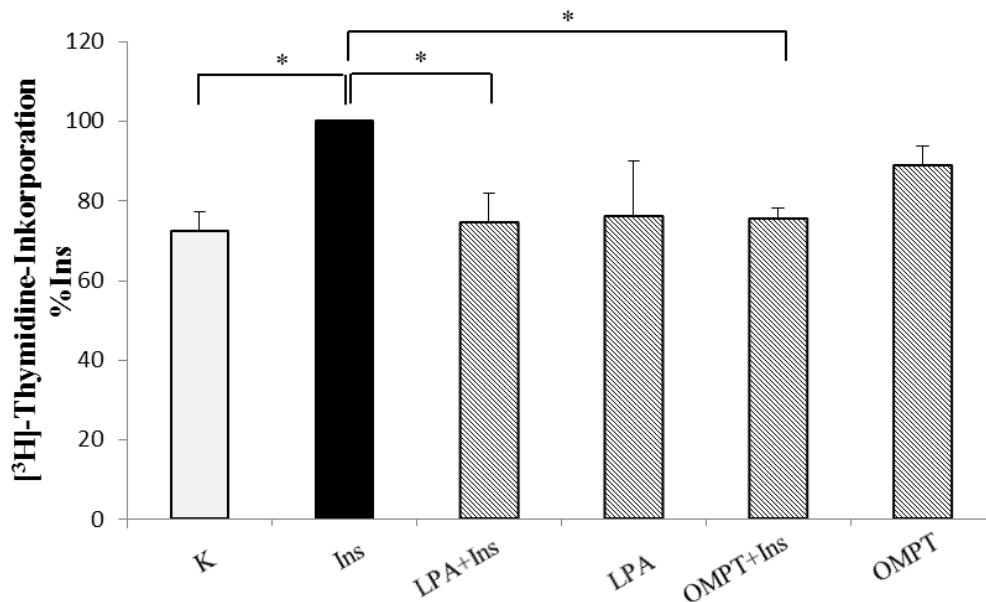


Abbildung 3.1.4.3: Einfluss von OMPT auf die Insulin-induzierte MIN-6 Zellproliferation. Nach einer Vorinkubation der Zellen mit 10 μ M LPA und 1 μ M OMPT für 10 min erfolgte Stimulation mit 1 μ M Insulin über 24 h. Die Proliferationsrate wurde durch Inkorporation mit [³H]-Thymidin untersucht. Bei den dargestellten Werten handelt es sich um die jeweiligen Mittelwerte von den drei unabhängigen Versuchen. * $p < 0,05$

3.1.4.4 Einfluss von LPA-Rezeptor-Agonisten auf den anti-apoptischen Effekt des Insulins

Da die Hemmung der Insulin-induzierten Akt-Aktivität über den LPA₃-Rezeptor vermittelt wird, sollte die Beeinflussung von OMPT auf den durch Insulin vermittelten anti-apoptischen Effekt untersucht werden. Wie zu erwarten war, führte die Vorinkubation mit OMPT zu einer signifikanten Hemmung der anti-apoptischen Wirkung des Insulins. Darüber hinaus zeigte die alleinige Stimulation mit OMPT ohne Insulin eine leichte anti-apoptische Wirkung (Abb. 3.1.4.4).

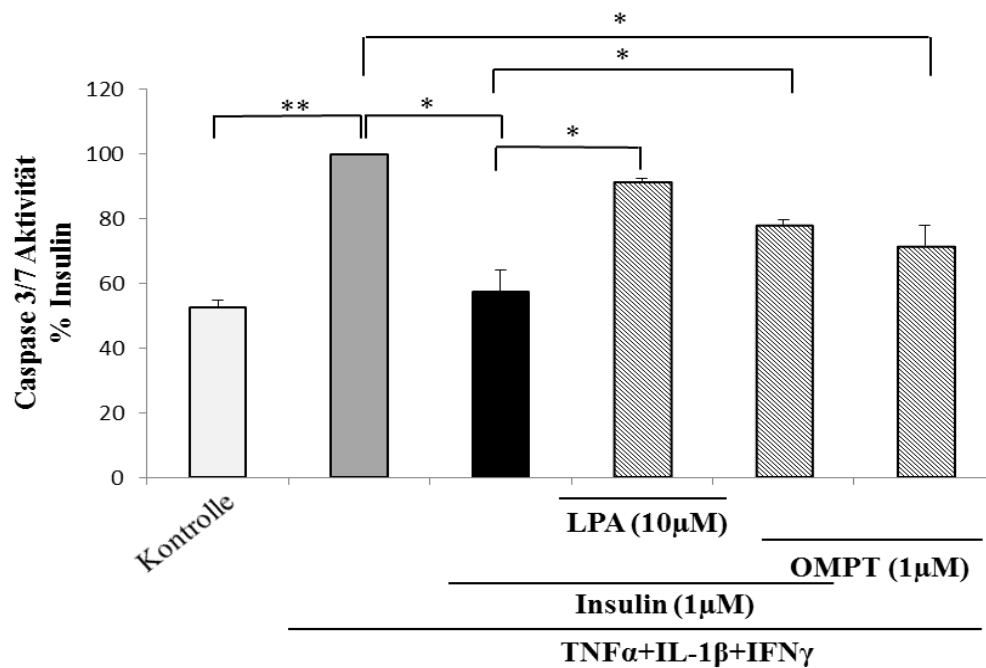


Abbildung 3.1.4.4: Einfluss von OMPT auf die anti-apoptotische Wirkung des Insulins. MIN-6 Zellen wurden mit 10 µM LPA und 1 µM OMPT für 10 min vorbehandelt, und nach Stimulation mit 1 µM Insulin für 10 min erfolgte die Inkubation mit TNFα+IL-1β+IFNγ für 18 h. Die Apoptoserate wurde durch Caspase 3/7 Aktivität mit Hilfe des Luminometers untersucht. Die Ergebnisse konnten in zwei weiteren unabhängigen Experimenten reproduziert werden. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

3.1.4.5 Einfluss von PTX bei der LPA-vermittelten Wirkung

Es ist bekannt, dass LPA sein Wirkung nach der Bindung an den LPA-Rezeptoren über verschiedene G-Proteine $G_{12/13}$, G_i und $G_{q/11}$ -Proteine vermitteln kann. Um eine mögliche Beteiligung von G_i -Proteinen an der hemmenden Wirkung von LPA auf die Insulin-vermittelte Akt-Aktivierung und die folgende Proliferationshemmung zu überprüfen, wurde Pertussistoxin (PTX) eingesetzt. PTX katalysiert die Ribosylierung der α -Unterheit des G_i -Proteins und verhindert so die Aktivierung der nachgeschalteten Signaltransduktion. Die MIN-6 Zellen wurden mit 200 ng/ml PTX für 60 min behandelt. Nach der Vorinkubation mit LPA wurden die Zellen mit Insulin stimuliert und die Akt-Phosphorylierung mittels Western Blot ermittelt. In Abb. 3.1.4.5 ist zu sehen, dass die Hemmung der Insulin-stimulierten Akt-Phosphorylierung durch LPA nach Inkubation mit PTX aufgehoben wurde.

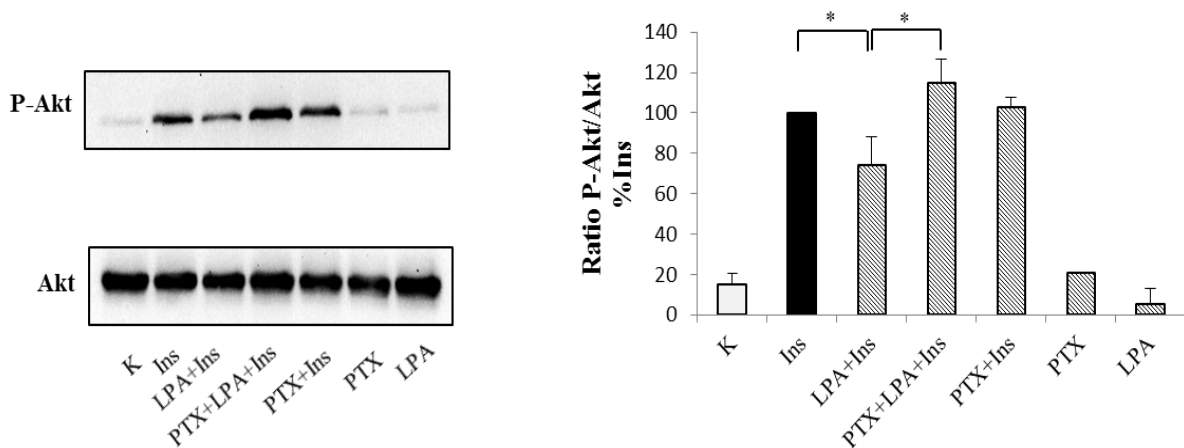


Abbildung 3.1.4.5: Einfluss von PTX auf die LPA-vermittelte Hemmung der Akt-Aktivität. MIN-6 Zellen wurden 1 h mit 200 ng PTX vorinkubiert, mit LPA behandelt und anschließend mit Insulin stimuliert. Die Akt-Aktivierung wurde mittels Western Blot unter Verwendung spezifischer phospho-Akt (Ser473) Antikörper ermittelt. Die Quantifizierung erfolgte gegen die gesamte Akt-Menge. * $p < 0,05$

3.1.5 Bedeutung von LPA-induzierten Signalwegen für die Hemmung der Insulin-vermittelten Wirkung und Signalwege

Wie bereits gezeigt worden ist, kann LPA die Insulin-Signalkaskade unterbrechen. Im Folgenden soll dargestellt werden, über welche intrazellulären Signalwege LPA den Insulin-Signalweg moduliert.

3.1.5.1 PP2A-Aktivierung durch LPA

PP2A besteht aus einer strukturalen Untereinheit (A), einer regulatorischen Untereinheit (B) und einer katalytischen Untereinheit (C) (Stanevich et al., 2011). Unterschiedliche Effektoren können PP2A beeinflussen und damit aktivieren, wodurch die Akt-Aktivität gehemmt wird (Galbo et al., 2011). PP2A wird durch die Methylierung der katalytischen Untereinheit aktiviert. Es wurde nachgewiesen, dass die Aktivierung einer mitochondrialen PP2A durch Ceramide zur Dephosphorylierung der Akt führt und damit wahrscheinlich zur Einleitung der Apoptose in den β -Zellen und zur Hemmung der GSIS (Lang et al., 2011). Daher wurde untersucht, ob die Aktivität der PP2A durch LPA erhöht wird. MIN-6 Zellen wurden mit 10 μ M LPA über verschiedene Zeiträume stimuliert und der Methylierungsstatus des PP2A mittels Western Blot untersucht. Die Untersuchung des PP2A zeigte allerdings keinen Anstieg der PP2A-Aktivität durch LPA, sondern die Aktivität nahm durch LPA ab (Abb. 3.1.5.1).

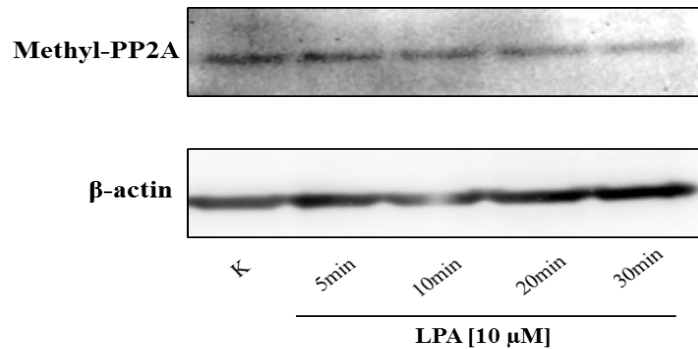


Abbildung 3.1.5.1: Einfluss von LPA auf die PP2A-Aktivierung. MIN-6 Zellen wurden mit 10 μM stimuliert. Anschließend erfolgte eine Western-Blot-Analyse mit einem Anti-methyl-PP2A Antikörper. Als Proteinladekontrolle diente die Bestimmung der β -actin.

3.1.5.2 Untersuchung zur Beteiligung von JNK an der LPA-Wirkung auf die Akt-Aktivität

Zellulärer Stress kann bestimmte Mitglieder der MAPK-Familie aktivieren. ERK1/2, JNK/SPAK und P38 sind Mitglieder der MAPK-Familie. ERK hat eine große Bedeutung für die Induktion der zellulären Prozesse Proliferation, Überleben und Differenzierung, während JNK und P38 durch Stress aktiviert werden und an der Induktion der Apoptose beteiligt sind. JNK wird vor allem durch oxidativen Stress und ER-Stress sowie pro-inflammatorische Zytokine aktiviert. Die Aktivierung der JNK induziert die Apoptose in β -Zellen und bewirkt eine Verringerung der GSIS (Fransson et al., 2014; Quan et al., 2013). Zu Beginn wurde untersucht, ob LPA eine Aktivierung der JNK durch die Phosphorylierung an Thr183/Tyr185 in MIN-6 Zellen induzieren kann. Die Stimulation mit 10 μM LPA über verschiedene Zeiträume zeigte tatsächlich mit steigender Inkubationsdauer eine Zunahme der JNK-Phosphorylierung. Nach 30 min wurde eine deutliche Phosphorylierung nachgewiesen, wobei nach 60 min die maximale Aktivierung erreicht war (Abb. 3.1.5.2A).

Des Weiteren wurde die Wechselwirkung zwischen LPA und Insulin auf die JNK untersucht. Erstaunlicherweise führte die Stimulation mit Insulin zu einer JNK-Phosphorylierung, während die Vorbehandlung mit LPA zu einer Reduktion der Insulin-aktivierten JNK beitrug (Abb. 3.1.5.2B). Somit deutet dies Ergebnis darauf hin, dass die JNK-Aktivierung mit der hemmenden Wirkung des LPA nicht korreliert.

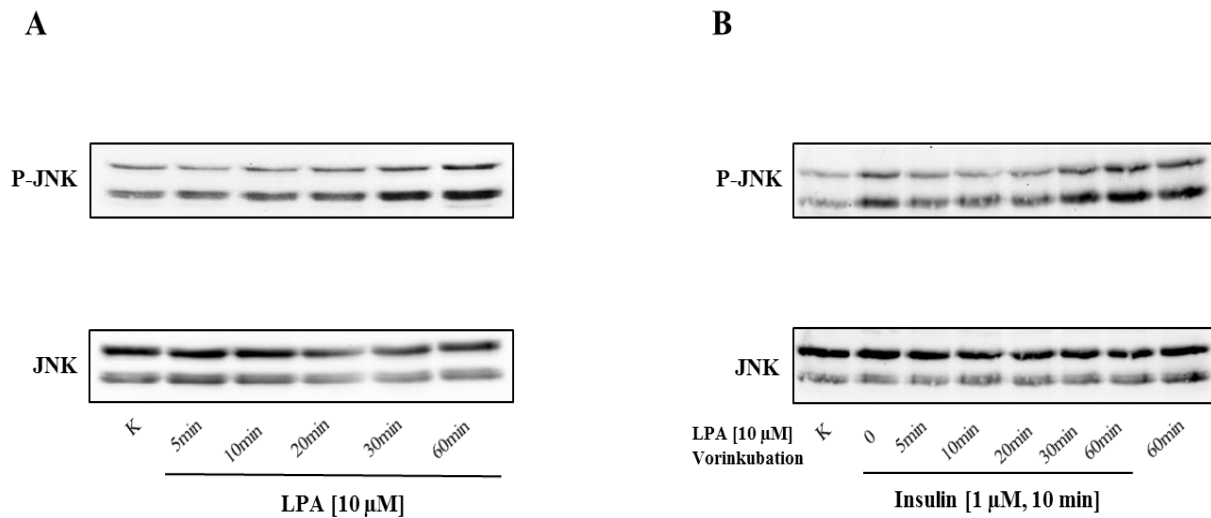


Abbildung 3.1.5.2: Einfluss von JNK auf die hemmende Wirkung des LPA. MIN-6 Zellen wurden mit 10 µM LPA über verschiedene Zeiträume stimuliert (A). MIN-6 Zellen wurden mit LPA vorinkubiert und anschließend mit Insulin stimuliert (B). Die JNK-Aktivierung wurde mittels-Western-Blot-Analyse durch Verwendung spezifischer phospho-JNK (Thr183/Tyr185) Antikörper detektiert. Als Proteinladekontrolle diente die Bestimmung der gesamten JNK-Menge.

3.1.5.3 Einfluss von LPA auf den Ca²⁺-Haushalt in MIN-6 Zellen

Postuliert wird, dass eine Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentrationen zur Apoptose der β -Zellen über Induktion verschiedener Apoptose-Signalwege führt, was zur Progression des T2D beiträgt (Y. Wang et al., 2011). In einer Untersuchung mit MIN-6 Zellen wurde gezeigt, dass der Anstieg des intrazellulären Ca²⁺ eine Dephosphorylierung und Inaktivierung der Akt und dadurch eine β -Zellapoptose induziert (S. E. Choi et al., 2007). Um festzustellen, dass LPA eine mögliche Erhöhung des intrazellulären Ca²⁺ in MIN-6 Zellen induzieren kann und dadurch eine Dephosphorylierung der Akt ausübt, wurde ein Ca²⁺-Chelator BAPTA/AM (25 µM, 30 min) eingesetzt und ein Western Blot zur Detektion der Akt-Phosphorylierung an Ser473 durchgeführt. Wie in der Abbildung 3.1.5.3 dargestellt, verstärkte die Anwesenheit von BAPTA/AM die Hemmung der Insulin-stimulierten Akt-Phosphorylierung durch LPA. Auch verminderte BAPTA/AM die Phosphorylierung von Akt durch Insulin im Vergleich zur Insulinbehandlung ohne Vorinkubation. Die verstärkte Hemmung der Akt-Phosphorylierung durch LPA in Anwesenheit von BAPTA/AM konnte jedoch auf die Reduktion der Insulin-induzierten Akt-Phosphorylierung durch BAPTA/AM zurückgeführt werden. Demnach scheint die erhöhte intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration an der LPA-induzierten Akt-Hemmung nicht beteiligt zu sein.

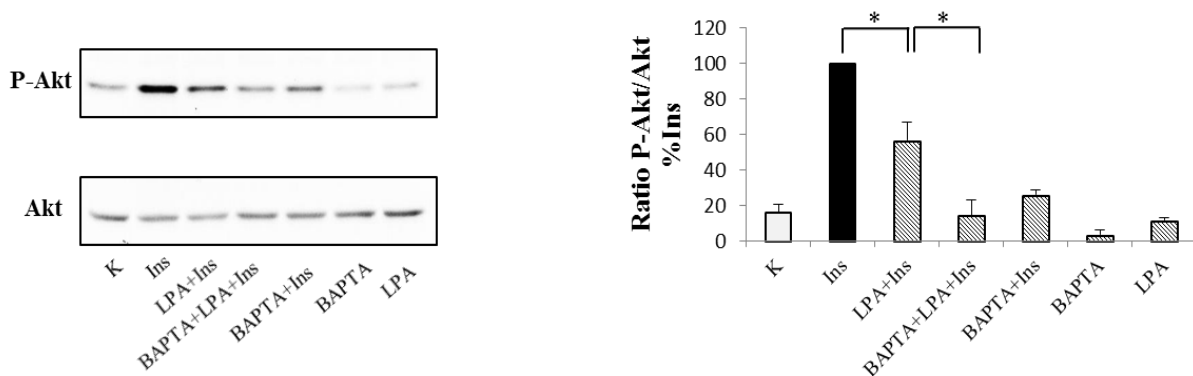


Abbildung 3.1.5.3: Einfluss der Ca^{2+} -Hemmung auf die Akt Aktivität. MIN-6 Zellen wurden mit 25 μ M BAPTA für 30 min vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen mit 10 μ M LPA für 5 min vorinkubiert und danach mit Insulin stimuliert. Es folgte eine Analyse der Akt-Aktivierung mittels Western Blot. * $p < 0,05$

3.1.5.4 Untersuchung zur Beteiligung von PKC an der LPA-Wirkung auf die Akt Aktivität

3.1.5.4.1 Hemmung der Insulin-induzierten Akt-Phosphorylierung durch eine PKC-Aktivierung

Aus der Literatur besitzt PKC an verschiedenen Zelltypen sowohl aktivierende als auch hemmende Effekte auf den Insulin-Signalweg (Turban Hajduch, 2011). Bei der Adipositas und T2D konnte nachgewiesen werden, dass verschiedene Lipidmetaboliten eine Aktivierung von PKC auslösen, was zur Abschwächung des Insulin-Signalweges führt. Die Aktivierung von PKC führt zu einer Serin-Phosphorylierung am Insulinrezeptor und zur Hemmung der Tyrosin-Phosphorylierung oder zur Hemmung der Akt-Kinase und dadurch zur Insulinresistenz, β -Zelldysfunktion sowie auch β -Zellapoptose. Um zu überprüfen, ob die Aktivierung von PKC eine Hemmung der Insulin-induzierten Akt-Phosphorylierung auslösen kann, wurde PMA, ein PKC-Aktivator, verwendet. Nach der Vorinkubation mit verschiedenen Konzentrationen von PMA für 10 min wurden MIN-6 Zellen mit 1 μ M Insulin für 10 min stimuliert. Eine konzentrationsabhängige Hemmung der Insulin-induzierten Akt-Aktivierung durch PMA konnte gezeigt werden, wobei eine maximale Hemmung mit 1 μ M erreicht war (Abb. 3.1.5.4.1). Das deutet darauf hin, dass PKC eine bedeutende Rolle in der Hemmung der Akt-Aktivität spielt.

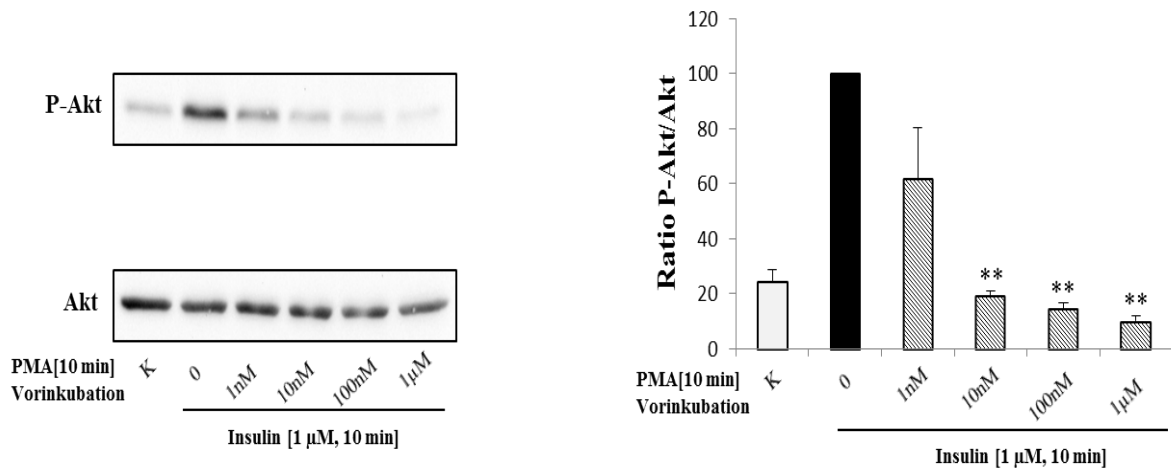


Abbildung 3.1.5.4.1: Einfluss der PKC-Aktivierung durch PMA auf die Akt-Phosphorylierung. MIN-6 Zellen wurden mit unterschiedlichen PMA-Konzentrationen für 10 min vorinkubiert und anschließend mit 1 µM Insulin für 10 min behandelt. Im Anschluss erfolgte die Untersuchung der Akt-Aktivierung mittels Western Blot unter Verwendung spezifischer phospho-Akt (Ser473) Antikörper. Die Quantifizierung erfolgte gegen die gesamte Akt-Menge. ** $p < 0,01$

3.1.5.4.2 Expression der PKC in MIN-6 Zellen

Um den Effekt von PKC hinsichtlich der Hemmung der Akt-Phosphorylierung näher zu untersuchen, wurde im Folgenden die Expression der PKC in MIN-6 Zellen mittels RT-PCR mit spezifischen Primern gegen PKC α , PKC β , PKC γ , PKC δ , PKC θ und PKC ζ quantifiziert. Die Normalisierung erfolgt durch GAPDH als Referenzgen. Abbildung 3.1.5.4.2 zeigte eine starke Expression von PKC α , PKC δ und PKC θ in MIN-6 Zellen. Eine Expression von PK ζ wurde in MIN-6 Zellen nicht gefunden.

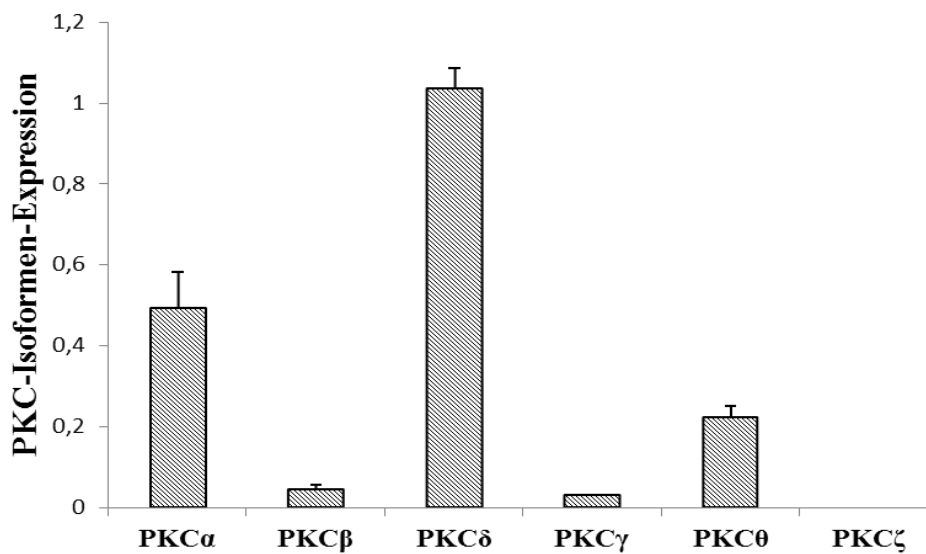
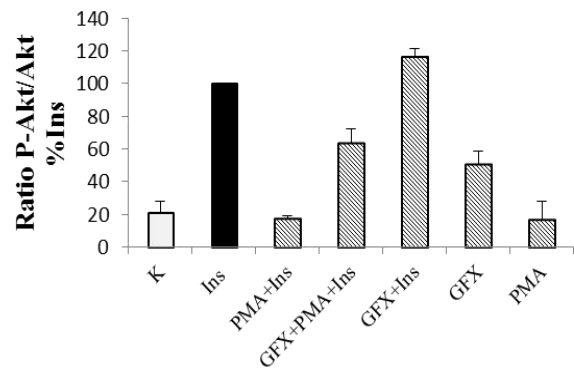
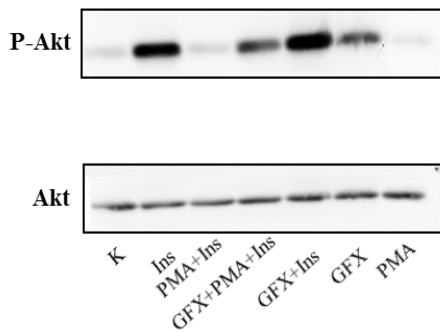


Abbildung 3.1.5.4.2: Quantitative Bestimmung der Expression der PKC-Isoformen in MIN-6 Zellen. Die PKC-Isoformen-spezifischen mRNA Transkripte MIN-6 Zellen wurden mittels Real-time PCR-Analyse quantifiziert. Die Normalisierung erfolgte gegen GAPDH als Referenzen. Der Versuch wurde drei Mal wiederholt, wobei vergleichbare Ergebnisse erhalten wurden.

3.1.5.4.3 Einfluss des generalen PKC-Inhibitors (GF109203X) auf die Hemmung der Insulin-induzierten Akt-Aktivierung durch LPA

Zur weiteren Verifizierung der Bedeutung einer Aktivierung der PKC wurde die Aktivität der Akt-Kinase durch Einsatz von GF109203X, einem selektiven PKC-Inhibitor, untersucht. Im ersten Schritt wurden MIN6-Zellen mit 200 nM von GF109203X inkubiert, dann mit PMA vorbehandelt und anschließend mit 1 μ M Insulin stimuliert. Es konnte gezeigt werden, dass die PMA-vermittelte Hemmung der Insulin-induzierten Akt-Phosphorylierung durch GF109203X reduziert war (Abb. 3.1.5.4.3A). Um zu untersuchen, ob PKC an der Wirkung von LPA beteiligt ist, wurde dieser Versuch parallel mit LPA durchgeführt. Nach der Behandlung der MIN-6 Zellen mit 200 nM GF109203X für 30 min erfolgte eine Vorinkubation für 5 min mit 10 μ M LPA und anschließend eine Stimulation mit 1 μ M Insulin. GF109203X konnte die Hemmung der Insulin-vermittelten Akt-Phosphorylierung durch LPA vollständig aufheben (Abb. 3.1.5.4.3B). Auch verstärkte GF109203X die Phosphorylierung von Akt durch Insulin. Es ist demnach sehr wahrscheinlich, dass die PKC-Aktivierung einen entscheidenden Einfluss auf die hemmende Wirkung von LPA hat.

A



B

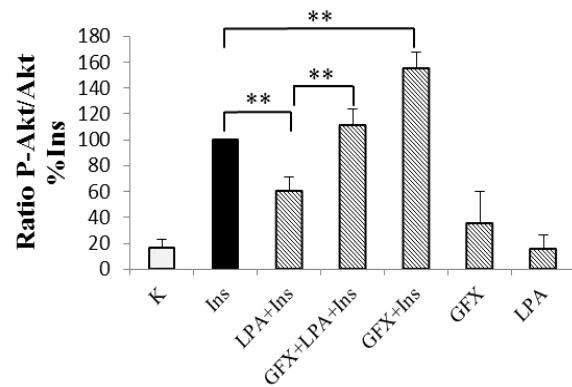
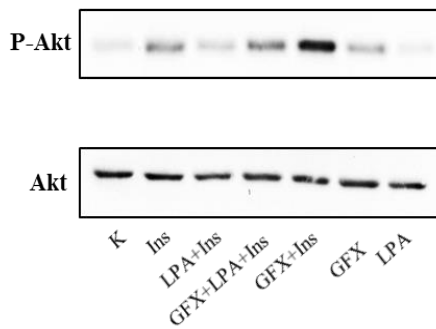


Abbildung 3.1.5.4.3: Einfluss des PKC-Inhibitors auf die Akt-Aktivität. MIN-6 Zellen wurden mit 200 nM GF109203X vorinkubiert, danach mit PMA (A) oder mit LPA (B) behandelt. Im Schluss erfolgte die Stimulation mit Insulin. Eine Detektion der Akt-Aktivierung erfolgte durch Western-Blot-Analyse unter Verwendung spezifischer phospho-Akt (Ser473) Antikörper. Die Quantifizierung erfolgte gegen die gesamte Akt-Menge. $**p < 0,01$

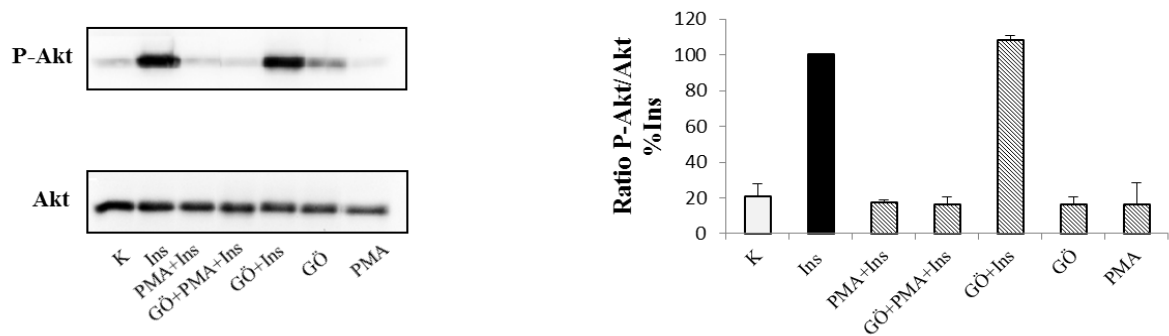
3.1.5.4.4 Einfluss des konventionellen PKC-Inhibitors (GÖ6976) auf die Hemmung der Insulin-induzierten Akt-Aktivierung durch LPA

Die bereits gezeigten Ergebnisse lassen die Möglichkeit zu vermuten, dass LPA die Akt-Hemmung durch einen PKC-abhängigen Signalweg vermittelt. Verschiedene PKC-Subtypen regulieren die Proliferation der Zellen sowohl positiv als auch negativ. Nun stellte sich die Frage, welcher PKC-Subtyp an der durch LPA vermittelten Wirkung beteiligt ist. Die cPKC-Isoformen, PKC α und PKC β spielen eine entscheidende Rolle bei der Hemmung des Insulin-Signalweges und der nachfolgenden Induktion der Insulinresistenz (Sajan et al., 2015). Hierfür wurde der Hemmstoff GÖ6976 (Inhibition der cPKC) in einer Konzentration von 100 nM für 30 min angewendet. Aus der Literatur ist bekannt,

dass PMA die cPKC und nPKC aktivieren kann. GÖ6976 konnte die PMA-vermittelte Hemmung der Insulin-induzierten Akt-Phosphorylierung nicht beeinflussen (Abb. 3.1.5.4A). Ebenfalls zeigte GÖ6976 keine Auswirkung auf die LPA-induzierte Hemmung der Insulin-vermittelten Akt-Aktivierung (Abb. 3.1.5.4B). Zusätzlich wurde die Phosphorylierung von Akt durch Insulin in Anwesenheit von GÖ6976 verstärkt.

Vermutlich war die cPKC nicht an der Hemmung des Insulin-Signalweges durch LPA beteiligt. Ebenfalls scheint cPKC in die Hemmung der Insulin-induzierten Akt-Aktivierung durch PMA nicht involviert zu sein.

A



B

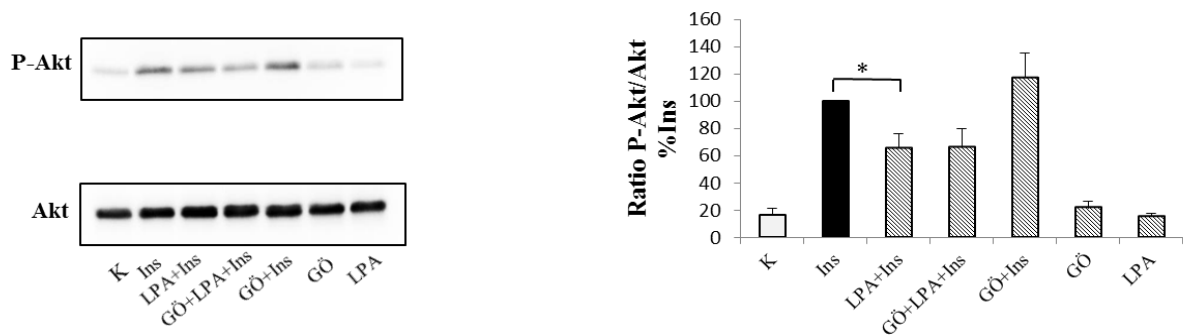


Abbildung 3.1.5.4.4 : Einfluss des konventionellen PKC-Inhibitors auf die Akt-Aktivität. Nach der Behandlung der MIN-6 Zellen mit 100 nM GÖ6976 erfolgte die vorinkubation entweder mit PMA (A) oder mit LPA (B) und anschließend die Stimulation mit Insulin. Eine Detektion der Akt-Aktivierung erfolgte durch Western-Blot-Analyse unter Verwendung spezifischer phospho-Akt (Ser473) Antikörper. Die Quantifizierung erfolgte gegen die gesamte Akt-Menge. * $p < 0,05$

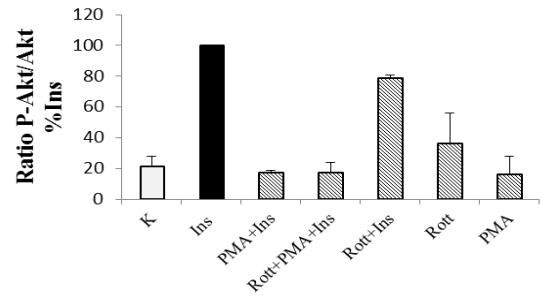
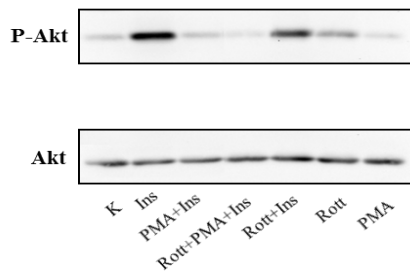
3.1.5.4.5 Einfluss des PKC δ -Inhibitors (Rottlerin) auf die Hemmung der Insulin-induzierten Akt-Aktivierung durch LPA

PKC δ reguliert die Zellapoptose und das Überleben in Abhängigkeit von Zelltypen und Stimuli. In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass PKC δ verschiedene pro-apoptische Signalwege beeinflusst, hierzu gehören JNK/P38, Caspase 3-Aktivierung und Akt-Hemmung (Basu Pal, 2010; Gomel et al., 2007). Die Aktivierung von PKC δ vermittelt die Akt-Hemmung an Ratteninsulinomazellen und humanen β -Zellen und die nachfolgende Proliferationshemmung und Apoptoseinduktion (Wrede et al., 2003). Die durch FFA-induzierte nukleare Akkumulation von PKC δ führt zu einer Aktivierung der TRB3, wodurch Akt inhibiert wird (Qin et al., 2014). Im folgenden wurde eine mögliche Beteiligung von PKC δ an der LPA-induzierten Akt-Hemmung untersucht.

Die Regulation der Aktivität der Akt-Kinase wurde in Anwesenheit des spezifischen PKC δ -Hemmstoffs Rottlerin in einer Konzentration von 5 μ M untersucht. Nach einer Inkubation mit Rottlerin für 30 min wurden die Zellen für 5 min mit 1 μ M LPA vorinkubiert und danach mit 1 μ M Insulin stimuliert. Die Vorinkubation mit Rottlerin veränderte die hemmende Wirkung von PMA nicht (Abb. 3.1.5.4.5A), während Rottlerin die Hemmung der Insulin-stimulierten Akt-Phosphorylierung durch LPA hingegen reduzieren konnte (Abb. 3.1.5.4.5B).

Die hemmende Wirkung von LPA könnte somit teilweise durch PKC δ bedingt sein. Obwohl PMA PKC δ aktivieren kann, scheint jedoch PKC δ an der PMA-induzierten Akt-Hemmung nicht beteiligt zu sein.

A



B

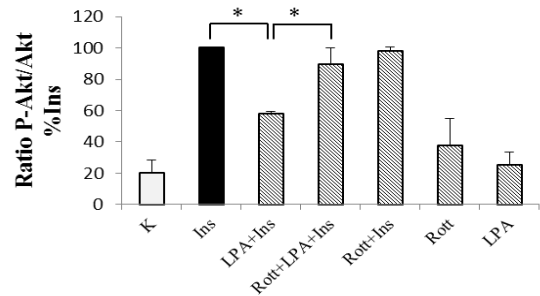
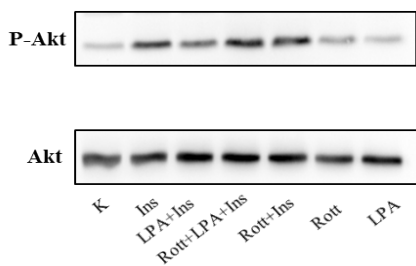


Abbildung 3.1.5.4.5: Einfluss des PKC δ -Inhibitors auf die Akt-Aktivität. MIN-6 Zellen wurden mit 5 μ M Rottlerin vorinkubiert, anschließend erfolgte die Vorinkubation entweder mit PMA (A) oder mit LPA (B) und zunächst die Stimulation mit Insulin. Die Akt-Aktivierung wurde durch Western-Blot-Analyse unter Verwendung spezifischer phospho-Akt (Ser473) Antikörper untersucht. Die Quantifizierung erfolgte gegen die gesamte Akt-Menge. * $p < 0,05$

3.1.5.4.6 PKC δ -Aktivierung durch LPA

Um zu untersuchen, ob LPA seine Wirkung auf den Insulin-Signalweg über eine Aktivierung der PKC δ vermittelt, wurde der Einfluss von LPA auf die PKC δ -Aktivierung näher untersucht. Hierfür wurde die Aktivierung der PKC δ durch LPA überprüft. Die Aktivierung der PKC δ an Thr505 wurde mittels Western-Blot-Analyse detektiert. Als Positivkontrolle diente die Stimulation für 10 min mit 1 μ M PMA. In der Tat führte eine Stimulation der MIN-6 Zellen mit PMA zu einer PKC δ -Aktivierung. Gleichzeitig induzierte LPA eine konzentrationsabhängige Aktivierung der PKC δ , eine maximale Phosphorylierung wurde mit 10 μ M LPA erreicht (Abb. 3.1.5.4.6).

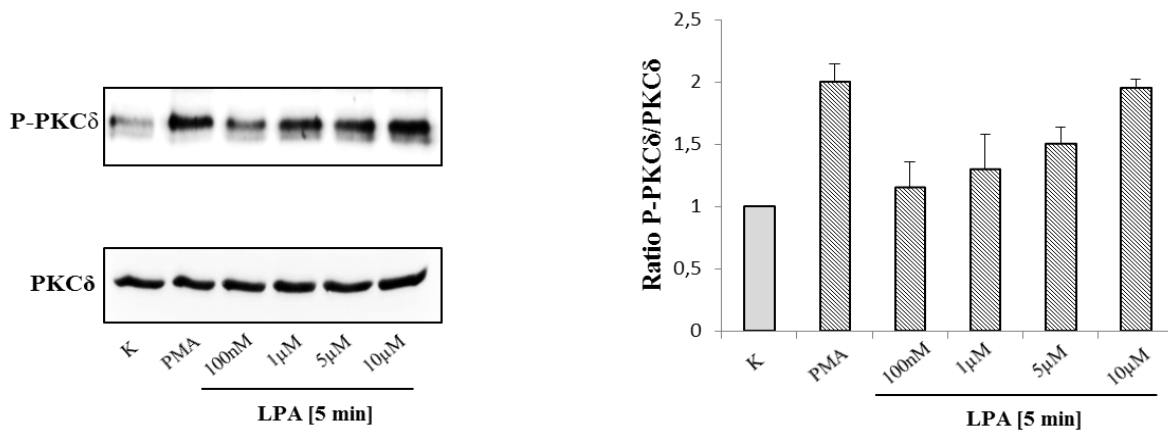


Abbildung 3.1.5.4.6: Aktivierung der PKC δ durch LPA. MIN-6 Zellen wurden mit verschiedenen LPA-Konzentrationen für 5 min stimuliert. Eine Inkubation mit 1 μ M PMA für 10 min diente als Positivkontrolle. Eine Detektion der PKC δ -Aktivierung erfolgte durch Western-Blot-Analyse unter Verwendung spezifischer phospho-PKC δ (Thr505) Antikörper. Die Quantifizierung erfolgte gegen die gesamte PKC δ -Menge.

3.2 Bedeutung von LPA bei der Relaxation der vorkontrahierten Pulmonararterien vom Schwein

3.2.1 Konzentrationsabhängigkeit der Vasorelaxation durch LPA

In-Vivo- und *in-Vitro*-Studien konnten gezeigt werden, dass LPA eine große Bedeutung innerhalb des Gefäßsystems besitzt und so an der Blutdruckregulation beteiligt ist. Die physiologischen und pathophysiologischen Einflüsse von LPA auf die Gefäßregulation sind bis heute lediglich unzureichend untersucht. In einer Untersuchung moduliert LPA den Gefäßtonus in Abhängigkeit vom Endothelium. So führt LPA zur Reduktion der Bradykinin-induzierten endothelabhängigen Vasodilatation der isolierten Koronararterien von Schweinen (C. Chen et al., 2012). Andererseits kann LPA den Blutdruck verschiedener Tiere beeinflussen (Tokumura et al., 1978). Deshalb sollte in einer Versuchsreihe untersucht werden, welche vasoaktive Wirkung LPA besitzt. Um die Wirkung von LPA auf den Gefäßtonus zu überprüfen, wurden Organbadversuche an isolierten Pulmonalarterien von Schweinen durchgeführt. Dazu wurden Gefäßringe mit intaktem Endothel durch die Applikation von 10 nM U46619 vorkontrahiert und anschließend, nach Erreichen eines konstanten Vorkontraktionsniveaus, LPA in steigenden Konzentrationen (16 - 5000 nM) hinzugefügt. Nach Erreichen des maximalen relaxierenden Effektes wurde 10 nM Bradykinin appliziert und die vollständige Relaxation induziert. Durch LPA kam es zu einer deutlichen dosisabhängigen

Vasodilatation der vorkontrahierten Gefäßringe (Abb. 3.2.1). Sie betrug 40 % der durch Bradykinin-induzierten Vasodilatation. Die Effekte sind als Prozent der maximal auslösbaren Relaxation, induziert durch Bradykinin (10 nM), dargestellt.

Gleichzeitig wurden die Experimente auch in der Anwesenheit des selektiven LPA_{1/3}-Rezeptorantagonisten DGPP (10 µM) durchgeführt. Die Konzentrations-Wirkungskurve zeigt, dass LPA im Vergleich zu Ansätzen mit LPA allein zur Abschwächung der Vasodilatation führt (Abb.3.2.1).

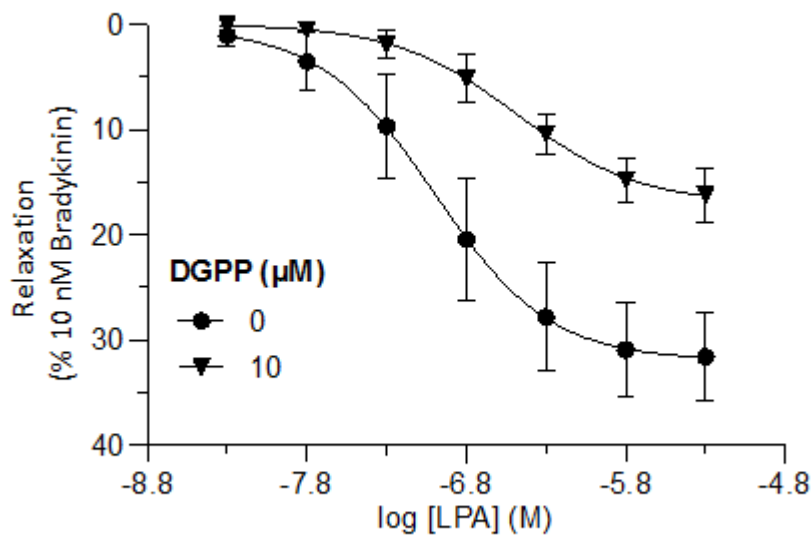


Abbildung 3.2.1: Relaxierende Effekte von LPA an der Schweinepulmonalarterie in Ab- und Anwesenheit des LPA_{1/3}-Rezeptoren-Agonist (10 µM DGPP). Dargestellt sind Mittelwerte als % bezogen auf die maximale Relaxation durch 10 nM Bradykinin ± S.E.M. von 4 Tieren.

3.2.2 Die LPA-induzierte Vasorelaxation ist NO-abhängig

Um die Abhängigkeit der ersichtlichen Vasodilatation von der eNOS und der damit verbundenen NO-Produktion zu überprüfen, wurde die eNOS durch den spezifischen Hemmstoff N-Nitro-L-Arginine Methyl Ester (L-NAME) (100 µM) irreversibel gehemmt. Dafür wurden die Gefäßringe durch U46619 vorkontrahiert und nach Erreichen eines konstanten Vorkontraktionsniveaus wurde LPA (2 µM)

zugegeben. LPA war in der Lage, eine Vasodilatation durch eNOS zu stimulieren, welche durch L-NAME völlig gehemmt werden konnte (Abb. 3.2.2).

Zur zusätzlichen Überprüfung der endothelabhängigen Vasodilatation durch LPA wurde das Endothelium der Gefäße mechanisch entfernt und anschließend der Versuch durchgeführt. Nach Endothelentfernung ist ebenfalls keine Vasodilatation mehr durch LPA auslösbar (Abbildung nicht gezeigt).

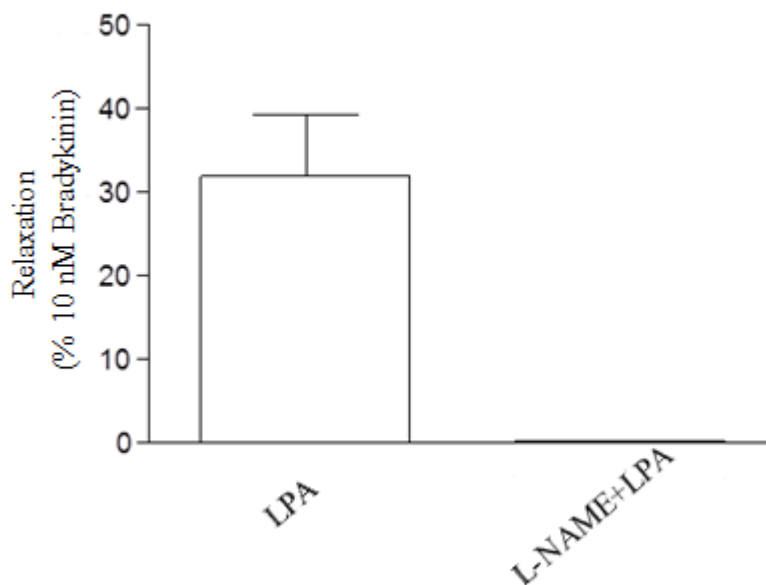


Abbildung 3.2.2: Relaxierender Effekt von LPA an der Schweinepulmonalarterie in Ab- und Anwesenheit des eNOS-Inhibitors (L-NAME 100 μ M). Dargestellt sind Mittelwerte als % bezogen auf die maximale Relaxation durch 10 nM Bradykinin \pm S.E.M. von 4 Tieren.

3.3 Beteiligung von Signalkaskaden am dilatierenden Effekt von LPA auf die humane Pulmonalarterien Endothelzellen (HPAECs)

3.3.1 Aktivierung der eNOS durch LPA

Unter normalen Bedingungen spielt die eNOS die wichtigste Rolle bei der Regulation des lokalen Gefäßtonus. Die Aktivierung der eNOS mit anschließender NO-Sekretion bewirkt eine direkte

Relaxation glatter Gefäßmuskelzellen mit einer damit einhergehenden Vasodilatation der Gefäße. Um zu untersuchen, ob die LPA-vermittelte endothelabhängige Vasorelaxation durch eine Aktivierung der eNOS hervorgerufen wird, wurde eine Western Blot-Analyse zur Detektion einer Phosphorylierung der eNOS an Ser1177 durchgeführt. Durch die begrenzte Verfügbarkeit von Endothelzellen vom Schwein wurden primäre humane Pulmonalarterien Endothelzellen (HPAECs) als mögliche Alternative bei diesem Prozess verwendet, da Schweine sehr nah mit dem Menschen verwandt sind. Die Stimulation mit 10 μ M LPA führte zu einer beginnenden eNOS-Aktivierung nach 5 min, mit einem detektierbaren Maximum der eNOS-Phosphorylierung nach 15 min (Abb. 3.3.1A). Darüber hinaus konnte eine Konzentrationsabhängigkeit bei der Aktivierung der eNOS durch LPA gezeigt werden. Erst ab 10 nM setzte die Phosphorylierung der eNOS ein und erreichte bei der Stimulation mit 10 μ M LPA den maximalen Effekt (Abb. 3.3.1B).

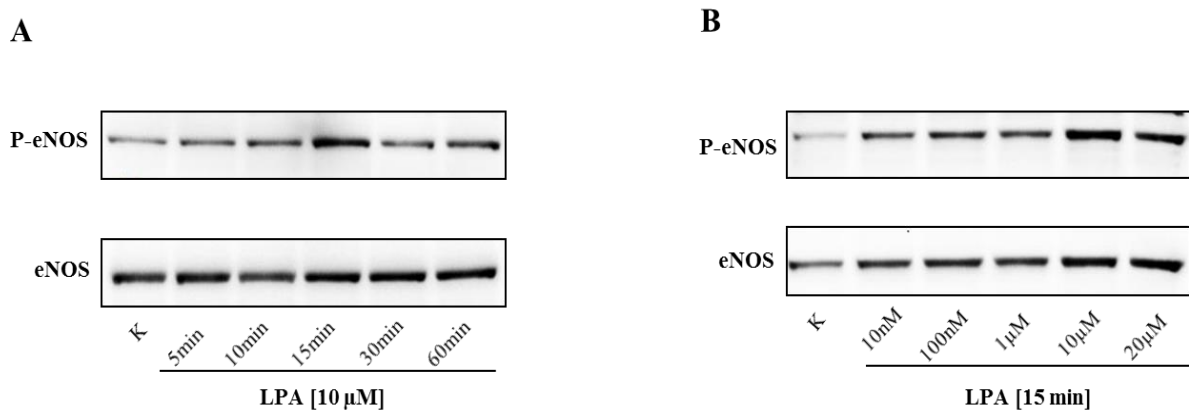


Abbildung 3.3.1: Aktivierung der eNOS durch LPA. HPAECs wurden mit 10 μ M LPA über verschiedene Zeiträume (A) oder mit steigenden Konzentrationen für 15 min (B) inkubiert. Die eNOS-Phosphorylierung an Ser 1177 wurde durch Western Blot untersucht. Die Blots sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente mit vergleichbaren Resultaten.

3.3.2 Einfluss von LPA auf die NO-Freisetzung in den HPAECs

In den vorherigen Ergebnissen wurde nachgewiesen, dass LPA zur eNOS-Aktivierung führte. Nun stellt sich die Frage, ob die eNOS-Aktivierung tatsächlich zu einer verstärkten NO-Bildung führt. Zum direkten Nachweis der durch LPA induzierten NO-Produktion wurde die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung mit dem NO-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff 4,5-Di-Amino-Fluorescein-Di-Acetat (DAF-2DA) an HPAECs durchgeführt. Wie in der Abbildung 3.3.2 zu sehen ist, konnte gezeigt werden, dass die Stimulation der HPAECs mit 10 μ M LPA für 15 min eine starke Fluoreszenz hervorrief; demgegenüber war bei unbehandelten Zellen kaum Fluoreszenz messbar. Durch

gleichzeitige Stimulation der HPAECs mit 10 μM LPA und dem eNOS-Inhibitor L-NAME (100 μM) für 30 min zeigte sich eine signifikante Verminderung der Fluoreszenz im Vergleich zu dem LPA-induzierten Fluoreszenzanstieg und die erkennbare NO-Produktion war gleich der basalen NO-Produktion unstimulierter HPAECs.

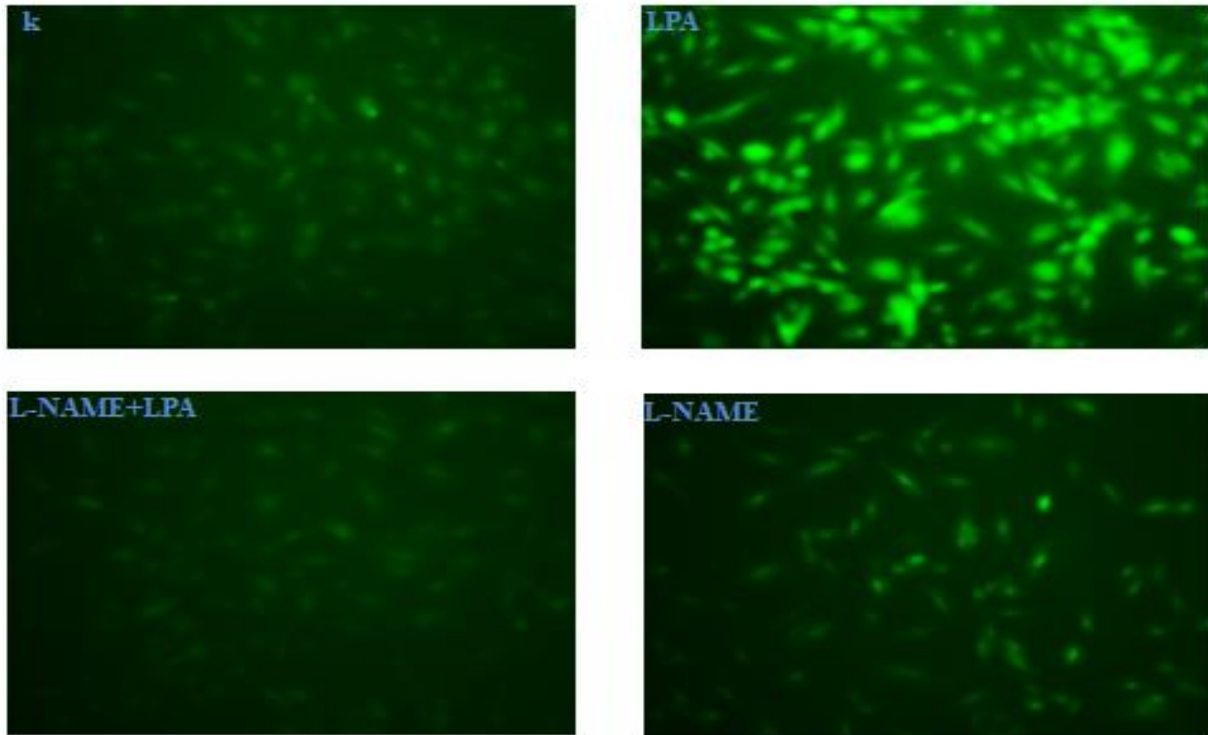


Abbildung 3.3.2: Einfluss von LPA auf die NO-Bildung in HAPECs. Nach einer Inkubation der HAPECs mit DAF-2DA für 30 min erfolgte eine Stimulation für 15 min mit 10 μM LPA in Ab- und Anwesenheit von eNOS-Inhibitor (L-NAME 100 μM). Die NO-Produktion wurde durch Fluoreszenzmikroskopie detektiert. Die fluoreszenzmikroskopische Detektion des NO wurde in zwei weiteren unabhängigen Experimenten reproduziert.

3.3.3 Untersuchung der Signalkaskade der LPA-vermittelten eNOS-Phosphorylierung

3.3.3.1 Expression der LPA-Rezeptoren in den HPAECs

LPA vermittelt seine zellulären Effekte über die Aktivierung von G-Protein-gekoppelten LPA-Rezeptoren. Daher wurde der Gehalt an mRNA-Transkripten der LPA-Rezeptoren in den HPAECs über eine quantitative Real-Time-PCR-Analyse charakterisiert. Die Normalisierung erfolgte gegen GAPDH als Referenzgen und es wurde die relative mRNA-Expression quantifiziert. Es konnte gezeigt

werden, dass alle untersuchten LPA₍₁₋₅₎-Rezeptorsubtypen mit dem am stärksten exprimierten LPA₂-Rezeptor in den HPAECs nachgewiesen wurden (Abb. 3.3.3.1).

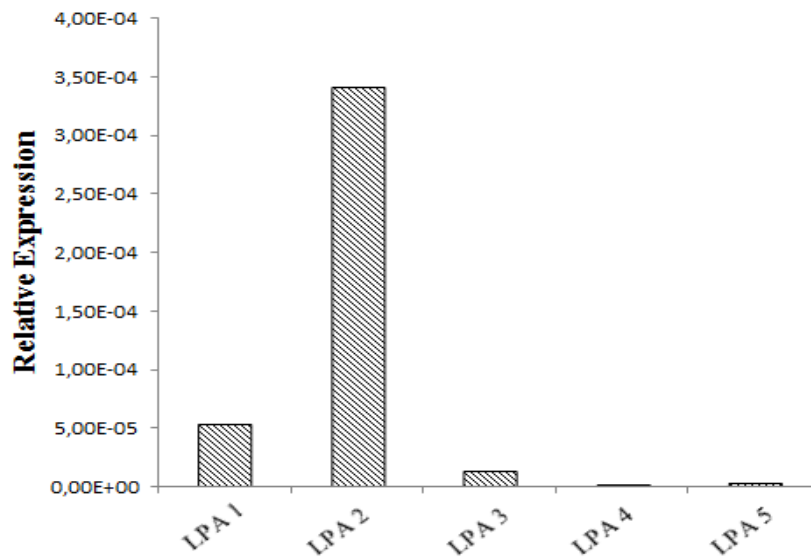


Abbildung 3.3.3.1: LPA-Rezeptorexpression in HPAECs. HPAECs wurden für 24 h in Wachstumsmedium kultiviert. Die mRNA wurde isoliert und in cDNA umgeschrieben, anschließend wurde die LPA-Rezeptorexpression mittels RT-PCR analysiert. Die Normalisierung erfolgte gegen GAPDH als Referenzgen. Die Ergebnisse konnten jeweils in zwei weiteren unabhängigen Experimenten reproduziert werden.

3.3.3.2 Einfluss des LPA-Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten auf die eNOS-Aktivierung

Im folgenden Schritt sollte nun der an der eNOS-Aktivierung beteiligte LPA-Rezeptorsubtyp durch den Einsatz von Agonisten und Antagonisten identifiziert werden. Dazu wurden DGPP und VPC12249 als LPA_{1/3}-Rezeptorenantagonisten verwendet und die eNOS-Phosphorylierung mittels Western Blot untersucht. Die Vorbehandlung der Zellen mit diesen Rezeptorantagonisten (10 μ M, 30 min) führte zu einer Hemmung der durch LPA-induzierten eNOS-Phosphorylierung (Abb. 3.3.3.2A,B). Im Weiteren wurde der selektive LPA₃-Rezeptoragonisten OMPT eingesetzt. Tatsächlich führte die Stimulation der HPAECs mit OMPT zu einer konzentrationsabhängigen eNOS-Aktivierung. Der maximale Effekt wurde bei der Konzentration von 5 μ M (OMPT) detektiert (Abb.3.3.3.2C).

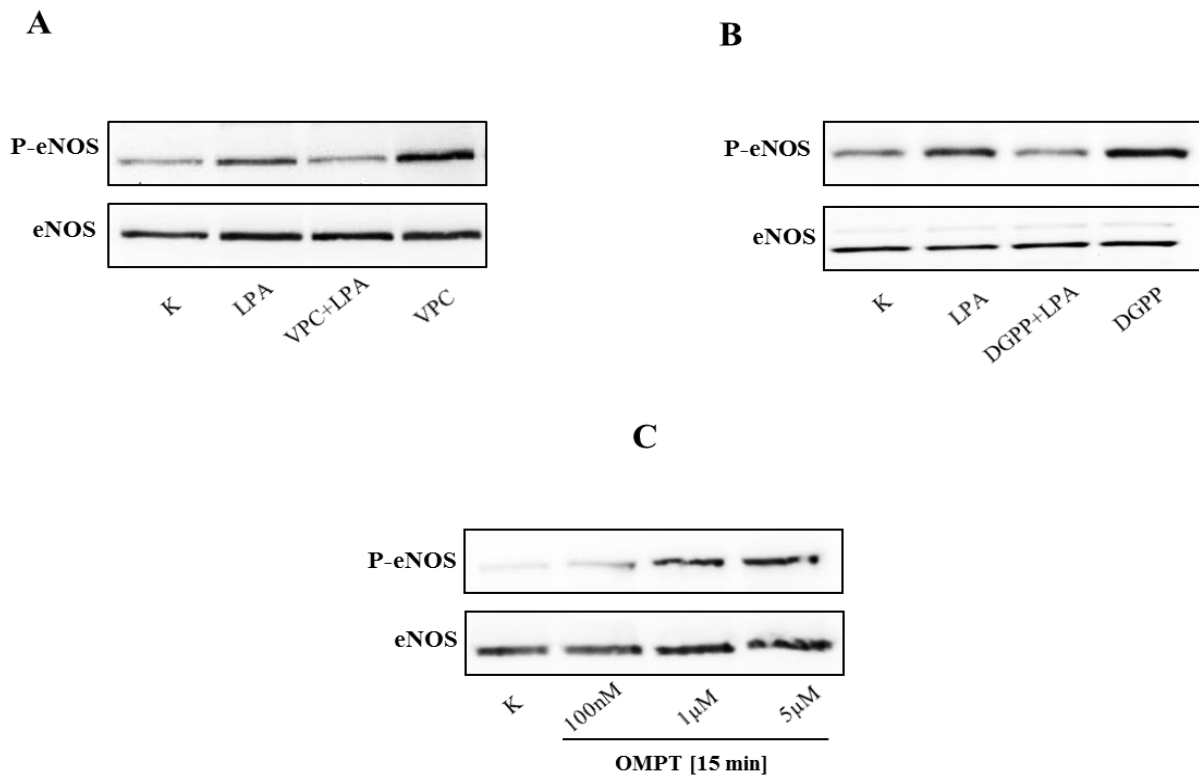


Abbildung 3.3.3.2: Einfluss von LPA-Rezeptorantagonisten und -agonisten auf die eNOS-Aktivierung. HPAECs wurden mit DGPP und VPC12249 vorbehandelt und danach mit LPA stimuliert (A,B). Mit den LPA₃-Agonisten OMPT wurden die Zellen für 15 min stimuliert (C). Im Anschluss erfolgte die Untersuchung der eNOS-Aktivierung mittels Western Blot unter Verwendung spezifischer phospho-eNOS (Ser1177) Antikörper. Der Versuch wurde drei Mal wiederholt, wobei vergleichbare Ergebnisse erhalten wurden.

3.3.3.3 Einfluss von PTX auf die eNOS-Aktivierung

Um eine Beteiligung der LPA-Rezeptoren an der Aktivierung der eNOS zu untersuchen, wurden die Zellen mit PTX behandelt und anschließend mit LPA für 15 min stimuliert. Die Western-Blot-Analyse zeigte, dass die Hemmung der Signaltransduktion über G_i-gekoppelte Rezeptoren durch PTX zu einer vollständigen Aufhebung der eNOS-Phosphorylierung des LPA führte (Abb. 3.3.3.3). Das G_i-Protein und damit gekoppelte Rezeptoren scheinen an der durch LPA-vermittelten Aktivierung der eNOS beteiligt zu sein.

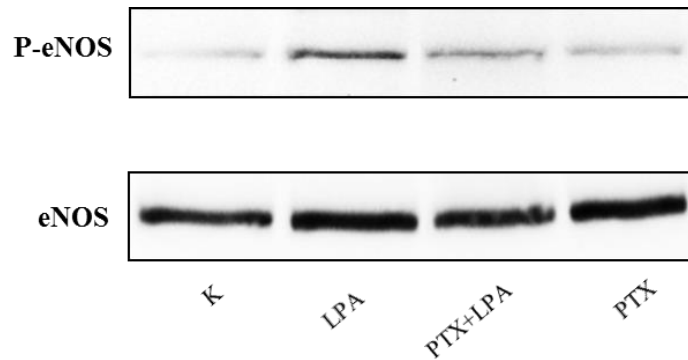


Abbildung 3.3.3.3: Einfluss von PTX auf die LPA-induzierte eNOS-Aktivierung. Vor der Stimulation mit LPA wurden HPAECs mit 200 ng/ml für 1h vorinkubiert und anschließend eNOS-Aktivierung unter Verwendung spezifischer phospho-eNOS (Ser1177) Antikörper durch Western Blot untersucht. Die Ergebnisse konnten jeweils in zwei weiteren unabhängigen Experimenten wiederholt werden.

3.3.3.4 Bedeutung der PI3K/Akt für die eNOS-Aktivierung

Nun sollte der molekulare Mechanismus des Signaltransduktionswegs der eNOS-Aktivierung nach Stimulation mit LPA untersucht werden. In zahlreichen Studien konnte erfolgreich nachgewiesen werden, dass die eNOS über einen von der PI3/Akt-Kinase abhängigen Weg durch Phosphorylierung an der Phosphorylierungsstelle Ser1177 aktiviert wird (Dimmeler et al., 1999). Daher sollte nun der Einfluss des PI3K/Akt-Signalweges auf die Aktivierung der eNOS verifiziert werden. Zur Untersuchung einer möglichen Beteiligung der PI3K/Akt am Signalweg der eNOS-Phosphorylierung durch LPA wurden die folgenden Versuche durchgeführt.

3.3.3.4.1 Einfluss von LPA auf die Akt-Phosphorylierung

Zur Untersuchung des Einflusses von LPA auf die Akt-Aktivität wurde eine Western-Blot-Analyse für die Detektion der Akt-Phosphorylierung an Ser473 durchgeführt. Die Stimulation der HPAECs mit 10 μ M LPA über verschiedene Zeiträume führte nach 5 min zu einer signifikanten Akt-Phosphorylierung, die nach 60 min wieder das Kontrollniveau erreichte (Abb. 3.3.3.4.1A). Darüber hinaus konnte eine Konzentrationsabhängigkeit für die durch LPA hervorgerufene Akt-Phosphorylierung gezeigt werden. Die 10 μ M-Konzentration von LPA zeigte die stärkste Aktivierung der Akt (Abb. 3.3.3.4.1B).

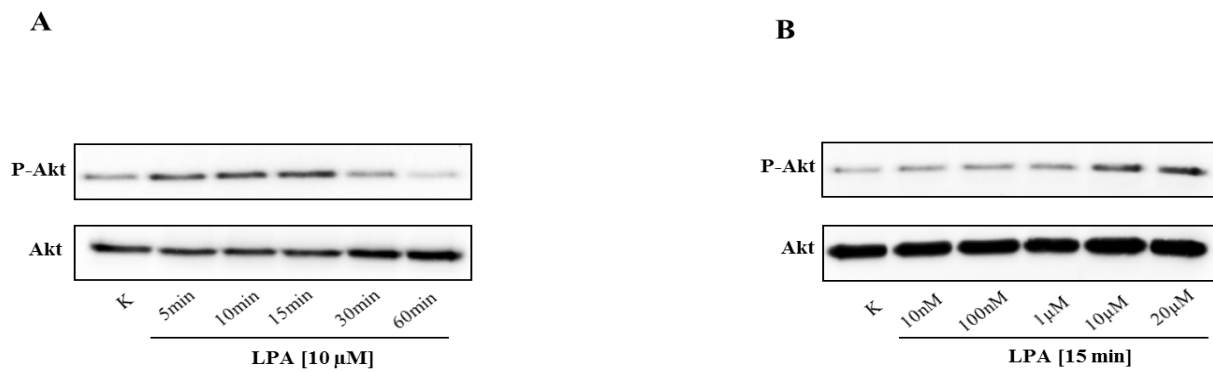


Abbildung 3.3.3.4.1: Aktivierung der Akt durch LPA. HPAECs wurden mit 10 μM LPA über unterschiedliche Zeiträume (A) oder mit unterschiedlichen LPA-Konzentrationen für 15 min (B) stimuliert. Die Akt-Phosphorylierung wurde unter Verwendung spezifischer phospho-Akt (Ser473) Antikörper durch Western-Blot-analyse untersucht. Die Blots sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente mit vergleichbaren Resultaten.

3.3.3.4.2 Einfluss von LPA-Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten auf die Akt-Aktivierung

Durch den Einsatz von spezifischen Agonisten und Antagonisten wurde der an der Akt-Phosphorylierung beteiligte LPA-Rezeptorsubtyp identifiziert. Die Vorinkubation der HPAECs mit den LPA_{1/3}-Antagonisten DGPP und VPC12249 führte zur signifikanten Erniedrigung der Akt-Phosphorylierung im Vergleich zu den mit LPA behandelten Zellen (Abb. 3.3.3.4.2A,B). Weiterhin führte die Stimulation der Endothelzellen mit steigenden Konzentrationen des LPA₃-Agonisten (OMPT) zur signifikanten Phosphorylierung der Akt bei einer Konzentration von 5 μM (Abb. 3.3.3.4.2C).

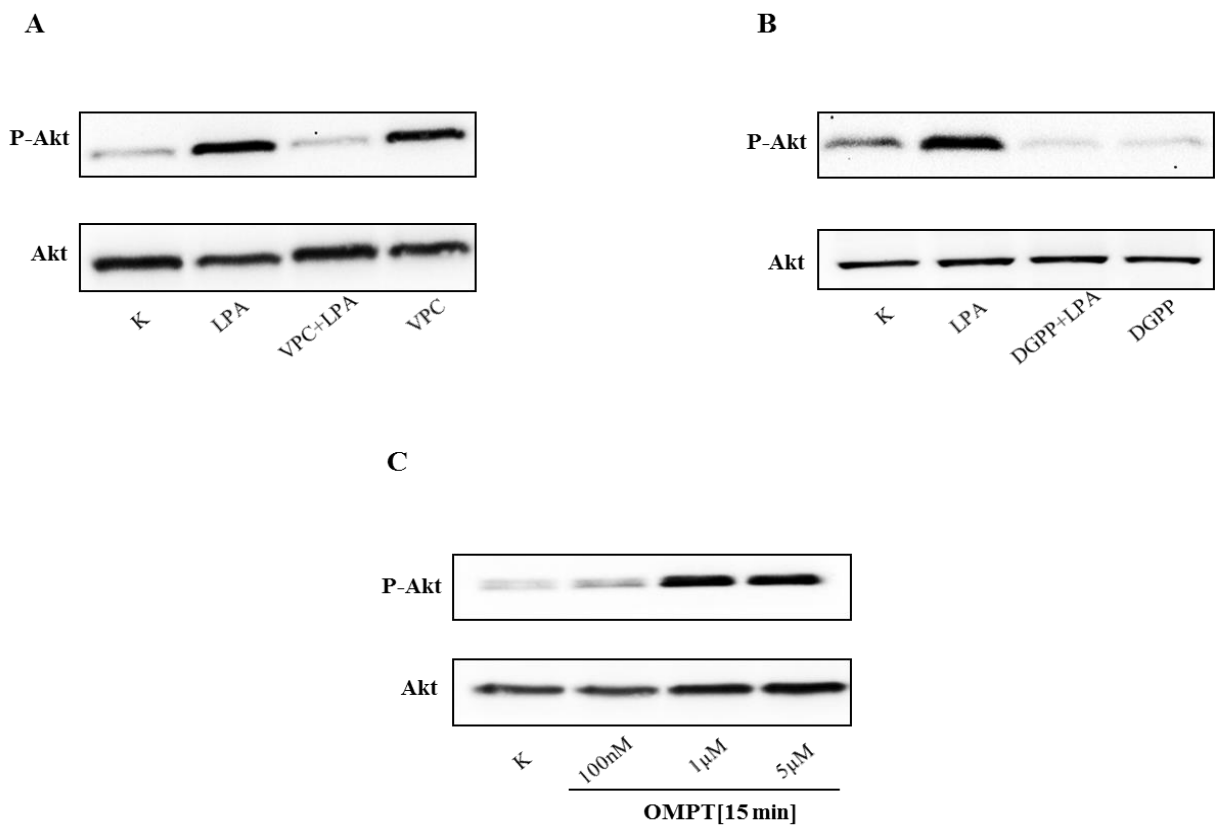


Abbildung 3.3.3.4.2: Einfluss von LPA-Rezeptorantagonisten und -agonisten auf die Akt-Aktivierung. HPAECs wurden mit DGPP und VPC12249 vorbehandelt und danach mit LPA stimuliert (A, B). Mit den LPA₃-Agonisten OMPT wurden die Zellen für 15 min stimuliert (C). Im Anschluss erfolgte die Untersuchung der Akt-Aktivierung mittels Western Blot unter Verwendung spezifischer phospho-Akt (Ser473) Antikörper. Der Versuch wurde drei Mal wiederholt, wobei vergleichbare Ergebnisse erhalten wurden.

3.3.3.4.3 Einfluss von PTX auf Akt-Aktivierung

Die Beteiligung von G_i-Protein-gekoppelten Rezeptoren an der LPA-vermittelte Wirkung erfolgte durch den Einsatz von PTX. HPAECs wurden mit 200 ng/ml PTX vorbehandelt und anschließend mit 10 µM LPA stimuliert. Durch PTX konnte die durch LPA hervorgerufene Akt-Phosphorylierung verhindert werden (Abb. 3.3.3.4.3).

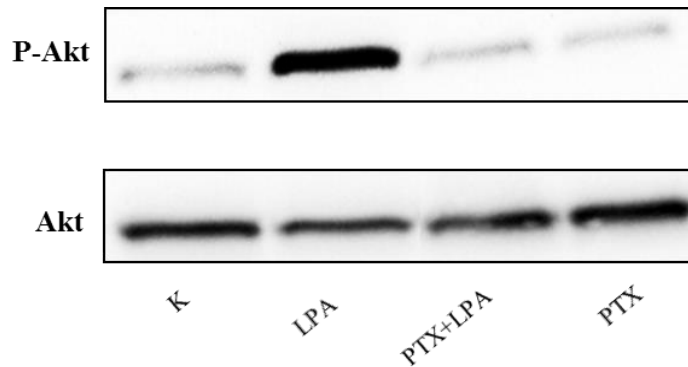


Abbildung 3.3.3.4.3: Einfluss von PTX auf die LPA-induzierte Akt-Aktivierung. HPAECs wurden mit 200 ng/ml PTX für 1 h vorbehandelt und danach für 15 min mit 10 μ M LPA stimuliert. Anschließend wurde die Akt-Aktivierung mittels Western Blot unter Verwendung spezifischer phospho-Akt (Ser473) Antikörper untersucht. Die Ergebnisse konnten jeweils in zwei weiteren unabhängigen Experimenten wiederholt werden.

3.3.3.4.4 Einfluss der Hemmung des PI3K/Akt-Signalweges auf die eNOS-Aktivierung

Die vorherigen Ergebnisse zeigten, dass LPA zu einer Akt-Aktivierung führt. Nun sollte untersucht werden, ob die Phosphorylierung von Akt an Ser473 durch PI3-K wiederum eNOS an Ser1177 phosphoryliert. Dafür wurden die Zellen mit dem PI3-Kinase-Inhibitor (LY 294002) in einer Konzentration von 1 μ M für 30 min vorbehandelt und anschließend mit LPA stimuliert. Die Western-Blot-Analyse der Phosphorylierung von eNOS an Ser1177 und Akt an Ser473 zeigte, dass der Einsatz von LY294002 zu einer vollständigen Hemmung der durch LPA hervorgerufenen Akt-Aktivierung führte, aber nicht zur Senkung der eNOS-Phosphorylierung (Abb. 3.3.3.4.4). Die PI3K/Akt scheint daher nicht in den Signalweg der eNOS-Aktivierung durch LPA involviert zu sein.

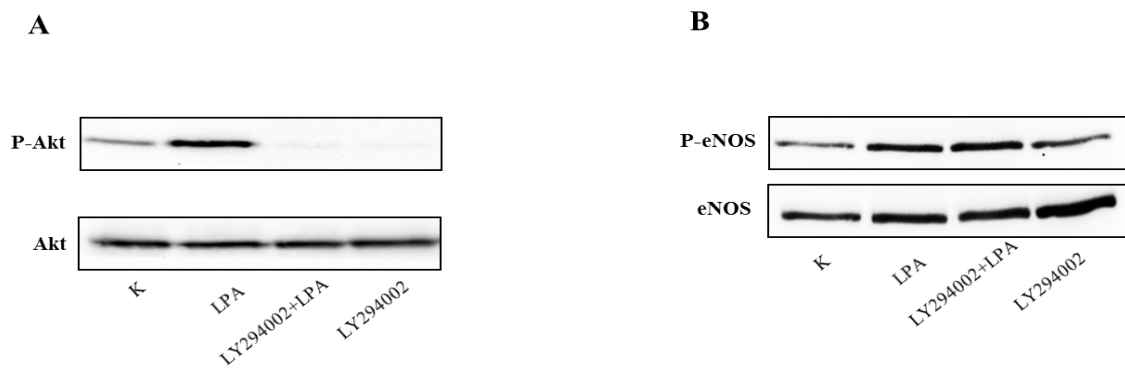


Abbildung 3.3.3.4: Einfluss der Hemmung der PI3K auf die LPA-induzierte Akt- und eNOS-Aktivierung. HPAECs wurden mit LY294002 für 30 min vorbehandelt und danach mit LPA stimuliert. Durch Western Blot erfolgte die Detektion der Phospho-Akt (A) und Phospho-eNOS (B). Die Blots sind repräsentativ für zwei weitere unabhängige Experimente mit vergleichbaren Resultaten.

3.3.3.5 Einfluss des PLC-Inhibitors auf die eNOS-Aktivierung

Das vorherige Ergebnis zeigte, dass der Signalweg PI3K/Akt in der eNOS-Phosphorylierung durch LPA nicht beteiligt ist. Daher wurde der weitere Signaltransduktionsweg der eNOS-Aktivierung untersucht. In den Untersuchungen weiterer möglicher Signalwege bei der Aktivierung der eNOS wurde die PLC-abhängige Ca^{2+} -Mobilisation überprüft. Zu diesem Zweck wurden HPAECs mit dem PLC-Inhibitor U73122 (100 nM für 30 min) vorinkubiert und anschließend mit LPA stimuliert. Durch den PLC-Inhibitor erfolgte eine Erniedrigung der eNOS-Phosphorylierung (Abb. 3.3.3.5).

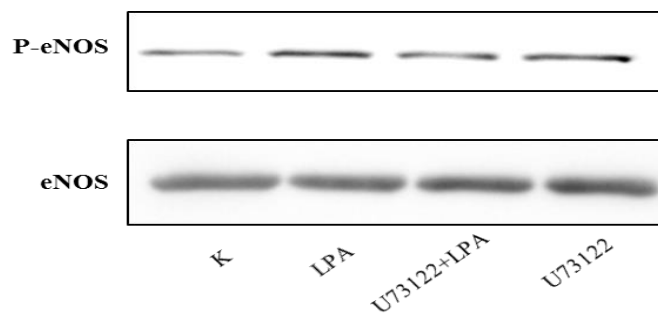


Abbildung 3.3.3.5: Einfluss der Hemmung der PLC auf die LPA-induzierte eNOS Aktivierung. HPAECs wurden mit dem Inhibitor U73122 in einer Konzentration von 100 nM für 30 min vorinkubiert, anschließend mit 10 μ M LPA für 15 min stimuliert. Im Anschluss erfolgte die Untersuchung der eNOS-Aktivierung mittels Western Blot unter Verwendung spezifischer Phospho-eNOS (Ser1177) Antikörper. Der Versuch wurde drei Mal wiederholt, wobei vergleichbare Ergebnisse erhalten wurden.

3.3.3.6 Einfluss des Ca²⁺-Inhibitors (BAPTA/AM) auf eNOS-Aktivierung

Die Aktivität der eNOS stellt durch Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration den wichtigsten aktivierenden Mechanismus dar (Fleming Busse, 1999). Zur Untersuchung der möglichen intrazellulären Calciumabhängigkeit der eNOS-Aktivierung durch LPA wurden die Zellen mit dem Calciumchelator BAPTA/AM in der Konzentration von 25 µM für 30 min vorbehandelt und anschließend mit LPA stimuliert. Interessanterweise führte die Vorinkubation mit BAPTA-AM zu einer deutlichen Hemmung der LPA-induzierten Akt-Phosphorylierung (Abb.3.3.3.6A). Die Vorbehandlung der HPAECs mit dem Calciumchelator BAPTA-AM verhinderte vollständig die durch LPA-hervorgerufene Phosphorylierung der eNOS (Abb. 3.3.3.6B). Die LPA-induzierte Phosphorylierung der eNOS ist somit ebenfalls Calciumabhängig

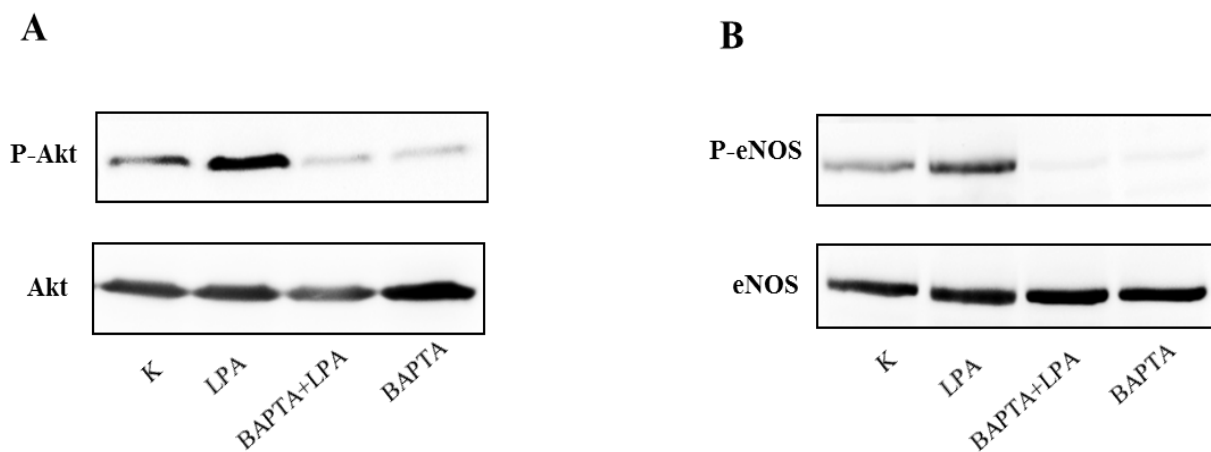


Abbildung 3.3.3.6: BAPTA-AM verhindert die LPA-induzierte Akt- und eNOS-Phosphorylierung. Nach Vorbehandlung der HPAECs mit dem Calciumchelator BAPTA-AM (25 µM) für 30 min erfolgte die Stimulation mit LPA. Die Phospho-Akt (A) und Phospho-eNOS (B) wurden mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Der Versuch wurde drei Mal wiederholt, wobei vergleichbare Ergebnisse erhalten wurden.

3.3.3.7 Beteiligung von Ca²⁺/CaMKII an der eNOS-Aktivierung

Durch die intrazelluläre Ca²⁺-Erhöhung und Bildung des Ca²⁺/CaMKII kann die eNOS aktiviert werden. Daher wurde der Einfluss der Hemmung des Ca²⁺/CaMKII auf die Aktivierung der eNOS untersucht. Nach der Vorbehandlung der Zellen mit dem CaMK-Inhibitor KN-93 in der Konzentration von 25 µM für 30 min erfolgte die Stimulation mit LPA. Der Inhibitor KN-93 führte zu einer

signifikanten Verminderung der eNOS-Phosphorylierung (Abb. 3.3.3.7). Die CaMKII scheint am Signaltransduktionsweg der eNOS durch LPA beteiligt zu sein.

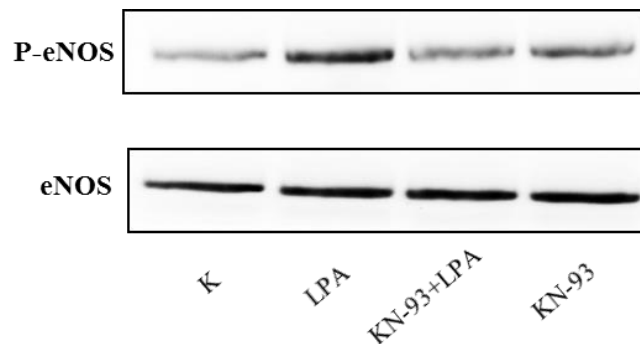


Abbildung 3.3.3.7: Einfluss von KN-93 auf die LPA-induzierte eNOS-Aktivierung. HPAECs wurden mit dem Inhibitor KN-93 der CaMKII (10 μ M) für 30 min vorbehandelt und anschließend mit LPA für 15 min stimuliert. Die eNOS-Phosphorylierung an (Ser1177) wurde durch Western Blot untersucht. Die Blots sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente mit vergleichbaren Resultaten.

4 Diskussion

4.1 Beteiligung von LPA an der Insulinresistenz in pankreatischen β -Zellen

Beim T2D sind die β -Zellen des Pankreas erhöhten Konzentrationen von FFA und Glucose ausgesetzt, was bei chronischem Verlauf zu Apoptose führt. Hohe Plasmakonzentrationen von LPA wurden bei der Adipositas festgestellt. Diese können die Insulinsensitivität beeinträchtigen, so dass eine Insulinresistenz entsteht. Ein Zusammenhang zwischen LPA und der Entstehung einer Insulinresistenz in pankreatischen β -Zellen wurde bisher nicht beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welche Auswirkung eine chronische Behandlung mit LPA auf die β -Zellhomöostase hat, indem die Proliferationsrate und das Überleben der β -Zellen ermittelt wurden. Gegenstand der weiteren Untersuchung war der Einfluss von LPA auf den Insulin-Signalweg in pankreatischen β -Zellen und zugrunde liegende molekulare Mechanismus.

4.1.1 Bedeutung von Palmitat auf den intrazellulären LPA-Spiegel in MIN-6 Zellen

FFA ist ein wesentlicher Faktor für die Entwicklung der Insulinresistenz und die Entstehung eines T2D. Studien mit Insulinresistenten und Adipösen/ Typ-2-Diabetikern zeigten, dass ein erhöhter FFA-Spiegel im Blut auf die Ernährung oder auf die Lipolyse in Fettgeweben zurückzuführen ist. Die toxische Wirkung von FFA trat vor allem bei der Exposition von gesättigten Fettsäuren (Palmitat und Stearat), nicht aber nach Behandlung mit ungesättigten Fettsäuren (Palmitoleat und Oleat) auf (Eitel et al., 2002). Dieser Unterschied ist wahrscheinlich auf die Fähigkeit von gesättigten Fettsäuren zur Bildung intrazellulärer TG zurückzuführen. In der Tat kann Palmitat die Insulinsekretion und die Insulingenexpression inhibierend beeinflussen und das β -Zellüberleben hemmen, wenn diese über einen längeren Zeitraum erhöhten Konzentrationen ausgesetzt sind. Verschiedene Untersuchungen mit isolierten pankreatischen Inseln und β -Zelllinien konnten zeigen, dass eine erhöhte Konzentration von Palmitat nur bei gleichzeitig hohen Glucosekonzentrationen eine Beeinträchtigung der β -Zellen zur Folge hat (Glucolipotoxizität) (El-Assaad et al., 2003; Prentki et al., 2002). Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen der Pathogenese der Glucolipotoxizität in den β -Zellen sind nicht vollständig geklärt. Eine erhöhte Konzentration von Palmitat in Kombination mit einer erhöhten Glucosekonzentration führt zur Akkumulation von TG und verschiedenen intrazellulären Lipidmetaboliten wie Ceramiden und DAG mit mehreren nachgeschalteten Signalwegen und verursacht somit eine β -Zelldysfunktion und Apoptose.

LPA ist ein anderer Lipidmediator, der in der *de-novo* Synthese von TG und aus G3P und Acyl-CoA mittels GPAT in den Mitochondrien und im ER entstehen kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der

LPA-Gehalt in einer pankreatischen β -Zelllinie MIN-6 mittels HPLC-ESI-MS/MS gemessen. Ein erhöhter intrazellulärer Gehalt von 16:0-LPA wurde in MIN-6 Zellen nach vermehrter Zugabe von Palmitat in 15 mM Glucose enthaltendem Medium nachgewiesen. Diese Ergebnisse wurden in einer Studie bestätigt. So wurde eine erhöhte Konzentration von LPA 16:0 in INS-1 Zellen nach der Behandlung mit 500 μ M Palmitat und 16,6 mM Glucose beobachtet (El-Azzouny et al., 2014). Mit *in vivo*-Untersuchungen bei Zucker-diabetic-fatty (*fa/fa*)-Ratten konnte nachgewiesen werden, dass eine erhöhte Expression von GPAT1 in Langerhans-Inseln mit einer Insulinresistenz, bedingt durch eine Akkumulation der TG, assoziiert ist (Lee et al., 1997). Die Unterdrückung der Expression von GPAT1 führt zu einem verminderten LPA-Gehalt in Hepatozyten und zum Schutz vor der hepatischen Insulinresistenz sowie zu einer verbesserten Glucosetoleranz (Neschen et al., 2005). Eine Überexpression des Enzyms GPAT1 ist mit einer erhöhten LPA-Synthese in den Hepatozyten verbunden und geht mit Entstehung einer Insulinresistenz einher (Zhang et al., 2012). Bei diabetischen Mäusen *db/db* konnte ein erhöhter LPC-Spiegel in der Leber und im Muskel gemessen werden, was durch Bromoenol-Lacton (BEL), einen Inhibitor der calciumunabhängigen Phospholipase A2 (iPLA2), die die Umwandlung von Palmitinsäure zu LPC vermittelt, unterdrückt wird. Zusätzlich wurde nachgewiesen, dass die Behandlung der *db/db*-Mäuse mit BEL zu einer Verbesserung der Insulinresistenz und des Diabetes führt. Andererseits wurde ebenfalls durch Exposition einer erhöhten Palmitatkonzentration eine Steigerung des LPC-Spiegels in L-6 Muskelzellen nachgewiesen. LPC übte eine Hemmung der Insulin-Signalkaskade in L-6 Muskelzellen aus und war so an der Entstehung der Insulinresistenz beteiligt (Han et al., 2011). Jedoch könnte auch eine Erhöhung der endogenen LPA-Biosynthese aus LPC durch ATX induziert werden und so an der Insulinresistenz beteiligt sein.

Eine Erhöhung der extrazellulären LPA-Konzentrationen in HFD-Mäusen wurde durch die Freisetzung von LPA aus den Adipozyten festgestellt (Dusaulcy et al., 2011; Gesta et al., 2002). Eine vermehrte Lipoprotein (LDL)-Produktion wurde durch einen Anstieg der hepatischen Lipogenese bei adipositasassoziierten Typ-2-Diabetikern beobachtet (M. Li et al., 2012). Aus dem im Blut freigesetzten LDL wird durch Lecithin-Cholesterol-Acyltransferase (LCTA) LPC produziert. Aus dem entstehenden LPC wird dann wiederum LPA durch ATX generiert. Die erhöhte Konzentration von ATX wird von Adipozyten in adipösen und diabetischen Mäusen freigesetzt (Boucher et al., 2005). Dies könnte möglicherweise einen zusätzlich erhöhten extrazellulären LPA-Spiegel induzieren.

4.1.2 Regulation der Zellproliferation durch LPA

Die Proliferation der β -Zellen besitzt eine maßgebliche Bedeutung bei der Steigerung der β -Zellmasse bei adulten Nagetieren und vermutlich beim Menschen während der späteren Embryonalentwicklung. Eine physiologische Expansion der β -Zellen könnte in der Schwangerschaft aufgrund einer erhöhten

Proliferationsrate der β -Zellen auftreten (Rieck Kaestner, 2010). Ebenfalls kommt es bei Adipositas und bei der Insulinresistenz zu einer gesteigerten β -Zellproliferation, die eine Kompensierung des erhöhten Insulinbedarfs ermöglicht (Karasawa et al., 2009; Saisho et al., 2013). Die Regulation der β -Zellproliferation ist ein sehr komplexer Prozess.

Verschiedene Hormone und Faktoren wie Insulin, IGF-1, GIP, GLP-1 sowie Glucose führen sowohl in Tiermodellen als auch beim Menschen über verschiedene Signalwege und die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zu einer gesteigerten Proliferation der β -Zellen (Bernal-Mizrachi et al., 2014; Friedrichsen et al., 2006). Cyclin D1 und D2 werden in β -Zellen exprimiert. Bei einer *in-vivo*-Untersuchung wurde herausgefunden, dass die Überexpression von Cyclin D1 zu einer gesteigerten β -Zellproliferation und -masse führt (Tarabra et al., 2012). Cyclin D2-Knockout-Mäuse zeigen eine Reduktion der β -Zellmasse und einen verminderten Insulinspiegel (Chang-Chen et al., 2008). Auch in β -Zellen fungiert die CDK4 als Regulator des β -Zellzyklus (Tarabra et al., 2012). So führt die Überexpression von CDK4 zu einer Steigerung der β -Zellproliferation. Darüber hinaus wurde in transgenen Mäuse mit Überexpression von P27 eine Beeinträchtigung der β -Zellproliferation beobachtet, was zu einer verminderten β -Zellmasse und Diabetes führt (Uchida et al., 2005). Daher wäre es eine therapeutische Strategie, über die Steigerung der β -Zellmasse durch eine erhöhte β -Zellproliferation den T2D zu verhindern oder zu behandeln. In verschiedenen Untersuchungen mit Primär- und β -Zelllinien wurde gezeigt, dass Insulin-Signalweg eine entscheidende Rolle bei der Proliferation der β -Zellen und der Regulation ihrer Masse spielt (Beith et al., 2008; Ohsugi et al., 2005). In MIN-6 Zellen konnte auch eine gesteigerte Proliferationsrate durch Insulin beobachtet werden (Müller et al., 2006). Dies konnte auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Insulin induziert auch die Proliferation der Myoblasten C2C12 (Conejo Lorenzo, 2001). Eine Störung der Insulin-Signalwege auf verschiedenen Ebenen führt zu einer Reduktion der β -Zellproliferation und anschließend zu einer Reduktion der β -Zellmasse und damit Progression des T2D.

LPA-Konzentrationen werden im Rahmen der Adipositas erhöht, und es wurde ein Zusammenhang mit der Entstehung der Insulinresistenz beschrieben. Im Hinblick auf die proliferative Wirkung von LPA konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass LPA die Insulin-induzierte Proliferation der MIN-6 Zellen hemmt. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen wurde in murinen Fibroblasten 3T3-Zellen ein anti-proliferativer Effekt von LPA beschrieben (Dong et al., 2014). Bei Patientinnen mit Präeklampsie konnte ein erhöhter LPA-Spiegel im Plasma nachgewiesen werden. So führte die Inkubation von HUVECs mit diesem Plasma zu einer erhöhten Expression von LPA_{1/2/3}-Rezeptoren und so zu einer Hemmung der Zellproliferation (L. X. Li et al., 2013). Außerdem konnte LPA durch die Inhibierung der Cycline D1 und D2 und durch die erhöhte Expression von P21 und P27 die Proliferation von Melanozyten hemmen (D. S. Kim et al., 2003). Zudem konnte bei alleiniger

Inkubation der MIN-6 Zellen mit LPA in der vorliegenden Arbeit keinen mitogenen Effekt beobachtet werden. Hingegen wurde in einer Studie nachgewiesen, dass LPA einen mitogenen Effekt die neonatale β -Zellen der Ratten wirkt (Dunlop et al., 1996). Darüber hinaus stimuliert LPA die Proliferation verschiedener Zelltypen. In Bezug auf die tumorprogressive Wirkung von LPA wurde eine erhöhte Proliferationsrate der Ovarialkrebszelllinie (SKOV3) durch LPA beschrieben (Goldsmith et al., 2011). In Fibroblasten (Rate-2) führte die Stimulation mit LPA zu einer Förderung der Zellproliferation (Kwon et al., 2009). Über verschiedene Mechanismen induziert LPA die Proliferation der glatten Muskelzellen (Xu et al., 2005). Eine Erklärung für diesen gegenteiligen Effekt von LPA könnte wahrscheinlich auf den Zelltyp oder/ und unterschiedliche Expression der LPA-Rezeptor-vermittelten Signalwege zurückzuführen sein.

4.1.3 Regulation der Zellapoptose durch LPA

Das β -Zellüberleben ist ein weiterer wichtiger Faktor, der an der Regulation der β -Zellmasse beteiligt ist. Der β -Zellverlust beruht auf einer gesteigerten Apoptoserate, die durch die Replikation nicht kompensiert werden kann. Bei der fortgeschrittenen Adipositas und Insulinresistenz wird durch eine erhöhte Apoptoserate die β -Zellmasse vermindert und trägt daher zu T2D bei. Der Insulin-Signalweg kontrolliert die Apoptose durch die Regulation verschiedener anti- und pro-apoptotischer Proteine. Die anti-apoptotische Wirkung von Insulin wurde in primären humanen und in Maus-Inseln beschrieben (Johnson et al., 2006). Auch vermag Insulin in anderen Zelltypen, wie z.B. in Kardiomyozyten und Makrophagen anti-apoptotisch zu wirken (Leffler et al., 2007; Morisco et al., 2007). Verschiedene Faktoren können die Insulinkaskade hemmen und so den β -Zelltod begünstigen. Unter erhöhten Konzentrationen von FFA und Glucose werden verschiedene Mediatoren aktiviert, welche den Insulin-Signalweg unterbrechen und die anti-apoptotische Wirkung verhindern können. Bei Adipositas können vermehrte pro-inflammatorische Zytokine von Adipozyten sezerniert werden und zu einer Apoptose der β -Zellen führen. Außerdem spielt eine erhöhte Ceramidproduktion mittels Ceramidase im FFA-induzierten β -Zelltod eine wesentliche Rolle durch die Hemmung des Insulin-Signalweges (Boslem et al., 2012).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass LPA die anti-apoptotische Wirkung des Insulins unterbrechen kann. Dabei konnte in MIN-6 Zellen eine anti-apoptotische Wirkung von Insulin beobachtet werden, wohingegen bei der Vorinkubation der Zellen mit LPA die anti-apoptotische Wirkung von Insulin vermindert war. In der Tat wurde bereits gezeigt, dass LPA in der Lage ist, eine Apoptose in verschiedenen Zelltypen auszulösen. In primären hippocampalen Neuronen und in durch den Nervenwachstumsfaktor (NGF) differenzierten PC12-Zellen kann LPA eine Apoptose durch die Produktion von ROS und NO und durch eine Mitochondrien-Dysfunktion induzieren (Steiner et al.,

2000). Bei der sauerstoff-induzierten Retinopathie (OIR) konnte eine Apoptose der retinalen Ganglionzellen (RGC) durch LPA-aktivierte ROCK vermittelt werden (Yang et al., 2009). Interessanterweise konnte auch in der vorliegenden Arbeit eine leichte anti-apoptotische Wirkung von LPA in MIN-6 Zellen beobachtet werden, wenn die Zellen nur mit LPA und ohne Insulin stimuliert wurden. Die anti-apoptotische Wirkung von LPA ist in verschiedenen Zelltypen beschrieben worden. So wurde eine Zytoprotektion von Schwannzellen (SCs), Osteoklasten, und hippocampalen Progenitorzellen gezeigt (Lapierre et al., 2010; Sun et al., 2010; Weiner Chun, 1999). LPA wirkt durch eine Schädigung-induzierten Lungenfibrose über den LPA₁-Rezeptor Signalweg einerseits anti-apoptotisch auf Fibroblasten und andererseits pro-apoptotisch auf Epithelzellen (Funke et al., 2012). Der genaue Mechanismus dieses gegensätzlichen Effekts von LPA ist allerdings noch nicht vollständig aufgeklärt.

4.1.4 Einfluss von LPA auf Insulin-Signalkaskade

Der Insulin-Signalweg hat eine wesentliche Bedeutung für die Funktion sowie auch das Wachstum und das Überleben der β -Zellen. Eine Störung dieses Signalweges kann eine Insulinresistenz und Entwicklung des T2D hervorrufen. Verschiedene Faktoren wie Lipotoxizität, Glucotoxizität und inflammatorische Zytokine können eine Störung des Insulin-Signalweges hervorrufen. In der Tat wurde in der vorliegenden Arbeit ein gesteigerter intrazellulärer LPA-Spiegel in MIN-6 Zellen nach der Behandlung mit Palmitat nachgewiesen. Der Effekt von endogenem LPA auf die Akt-Phosphorylierung und Insulinresistenz in den β -Zellen wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Wie bereits erwähnt, wurden gesteigerte LPA-Konzentrationen im Plasma von HFD-Mäusen mit daraus resultierender Hemmung der GSIS und eine Reduktion der β -Zellmasse nachgewiesen. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit der Effekt des exogenen LPA auf verschiedenen Ebenen des Insulin-Signalweges in pankreatischen β -Zellen betrachtet.

4.1.4.1 Die Regulation der Akt-Kinase durch LPA

Die Akt, auch als PKB bezeichnet, ist ein wichtiges Substrat der Insulinkaskade, welches an der Regulation des Glucosemetabolismus, der Insulinsekretion und der β -Zellmasse beteiligt ist. Drei Isoformen von PKB (PKB α , PKB β , PKB γ) wurden identifiziert, wobei die Isoform PKB α in den β -Zellen am stärksten exprimiert ist. Akt1 Knockdown-Mäuse zeigen sowohl fetale als auch postnatale Wachstumsdefizite. Akt2-Knockdown-Mäuse zeigen eine starke Insulin- und Glucoseintoleranz und entwickeln einen T2D (Elghazi et al., 2007). Die Akt-Kinase wird durch die Phosphorylierung an Threonin308 und Serin473 vollständig aktiviert. In der vorliegenden Arbeit wurde die Aktivierung der Akt-Kinase durch die Detektion der Phosphorylierung an Ser473 gemessen. Eine alleinige Phosphorylierung an Thr308 kann Akt zwar aktivieren, allerdings führt eine Phosphorylierung an

Ser473 zu einer stärkeren Aktivierung (Dickson et al., 2001). Anhand von *in Vivo*- und *in Vito*-Untersuchungen wurde gezeigt, dass die phosphorylierte Akt demnach einerseits die β -Zellproliferation fördert, andererseits die Apoptose in den β -Zellen verhindert. Die physiologische Aktivierung der Akt erfolgt durch Insulin über RTK in verschiedenen Zelltypen. In der vorliegenden Arbeit kann Insulin, wie erwartet, eine Phosphorylierung von Akt in MIN-6 Zellen auslösen, was auch in anderen Studien mit MIN-6 Zellen und weiteren β -Zellen gezeigt wurden (Johnson et al., 2006; Trumper et al., 2000).

Bei einer Insulinresistenz und T2D wird durch eine Akkumulation verschiedener Lipidmetaboliten eine Störung des Insulin-Signalweges in β -Zellen durch eine Dephosphorylierung von Akt beobachtet, was zu einer Hemmung der Zellproliferation und einer gesteigerten Apoptoserate mit nachfolgender Reduktion der β -Zellmasse führt. Es wurde beschrieben, dass bei Fütterung von NZO-Mäusen mit HFD der S1P-Spiegel im Blut im Vergleich zu den mit Standarddiät (SD) gefütterten NZO-Mäusen erhöht ist. Ebenso ergaben sich erhöhte S1P-Konzentrationen in MIN-6 Zellen nach einer Stimulation mit Palmitat. In diesem Zusammenhang konnte durch S1P eine Proliferationshemmung und Apoptoseinduktion in den MIN-6 Zellen und folglich eine Reduktion der β -Zellmasse durch eine Hemmung der Akt-Phosphorylierung dargestellt werden (Japtok et al., 2015).

Die Aktivierung der Akt Kinase durch LPA konnte bereits bei verschiedenen Zelltypen wie Endothelzellen, Lymphozyten und Schwanzzellen gezeigt werden (X. Hu et al., 2005; Ye et al., 2002), wodurch unterschiedliche Wirkungen vermittelt werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte LPA keine Aktivierung von Akt in MIN-6 Zellen auslösen, sondern führt zu einer Hemmung der Insulin-induzierten Akt-Aktivierung, was als einer der Hauptmechanismen der anti-proliferativen und pro-apoptotischen Wirkung von LPA angesehen werden kann. So zeigt die Vorbehandlung mit LPA für 5 min eine signifikante Hemmung der Insulin-induzierten Akt-Phosphorylierung. Interessanterweise verstärkte die Vorbehandlung mit LPA für 60 min die Insulin-vermittelte Akt-Phosphorylierung, wohingegen die alleinige Stimulation der Zellen mit LPA für 60 min keine Phosphorylierung der Akt induzierte. Untersuchungen an verschiedenen Zelltypen konnten zeigen, dass Cadmium über die Akt-Aktivierung den Zelltod induzieren kann (Coticchia et al., 2009; Jiang et al., 2015). Andererseits zeigt die Akt-Kinase sowohl stimulierende als auch inhibitorische Effekte auf die Proliferation. Eine negative Interaktion zwischen Ras/Raf-1/ERK- und PI3K/Akt-Signalweg wurde in mehreren Studien beschrieben, wobei die Akt durch Inhibition von Raf-1 einen hemmenden Effekt auf die Proliferation hat, dadurch die Weiterleitung der MEK/ERK-Signalkaskade unterbrochen wird (Aksamitiene et al., 2012; Moelling et al., 2002). Sowohl die konstitutive Phosphorylierung von Akt als auch die durch hohe Konzentrationen von IGF-1 mit langfristiger Inkubation induzieren schnelle und starke Phosphorylierung der Akt, was eine Phosphorylierung der Raf-1 an Ser259 und damit deren Inaktivierung auslöst und dadurch zu einer Inhibierung der vom Raf/ERK Signalweg-vermittelten

Proliferation führt (X. Chen Ruiz-Echevarria, 2013; Dickson et al., 2001; Rommel et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit führte die Vorbehandlung mit LPA für 60 min neben einer Verstärkung der Akt-Phosphorylierung auch zu einer Hemmung der ERK1/2-Phosphorylierung. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass LPA über unterschiedliche intrazelluläre Signalwege den Insulin-Signalweg proximal der Akt-Kinase modulieren kann, um die proliferative und anti-apoptotische Wirkung von Insulin zu hemmen. Während die kurzfristige Vorbehandlung mit LPA eine Hemmung der Insulin-induzierten Akt-Phosphorylierung ausübte, verstärkte die chronische Vorbehandlung mit LPA die Insulin-vermittelte Akt-Phosphorylierung, die mit einer Hemmung der ERK-Phosphorylierung verbunden ist. Somit wäre denkbar, dass die anti-proliferative und pro-apoptotische Wirkung von LPA sowohl mit einer Hemmung der Akt-Aktivität als auch mit einer Hyperaktivität von Akt einhergeht.

In der Literatur sind bisher wenige Daten über die Interaktion von LPA mit dem Insulin-vermittelten Signalweg beschrieben worden. In Ovarialkarzinomazellen (CHO) wurde nachgewiesen, dass LPA eine hemmende Wirkung auf die IGF-1-aktivierte Akt-Kinase hat, die in die Zellmigration involviert ist (Sugimoto et al., 2006). Es wurde sowohl über negative als auch positive Wechselwirkungen zwischen LPA und dem Insulin-Signalweg berichtet. LPA könnte möglicherweise ein positiver Regulator der Glucosehomöostase sein, ohne die Insulinsekretion zu beeinflussen. Dabei stimuliert LPA die Translokation des Glut4 an die Zellmembran über eine Aktivierung des PI3K-Akt Signalweges in Adipozyten und in Muskelzellen, was zu einer Stimulation der Glucoseaufnahme führt. Außerdem beeinflusst LPA synergistisch mit Insulin die Glucoseaufnahme in Muskel und Fettgewebe (Yea et al., 2008). Neue Untersuchungen mit der murinen Makrophagen-Zelllinie J-774 lieferten den Beweis, dass LPA die Akt-Aktivität im Rahmen einer Entzündungsreaktion modulieren kann. Hierzu aktiviert das Lipopolysaccharid (LPS) unterschiedliche intrazelluläre Kaskaden wie MAPK, Akt und NF κ B, die zur Initiation der Produktion von Entzündungsmediatoren wie COX-2 und iNOS führen. In diesem Zusammenhang zeigte LPA eine signifikante Hemmung der LPS-induzierten Akt-Phosphorylierung, was eine Reduktion der iNOS sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf der Protein-Ebene zur Folge hat (Chien et al., 2015). Dies kann als einer der Mechanismen der anti-inflammatorischen Wirkung von LPA angesehen werden.

Zusammengefasst stellt die Akt Kinase wegen ihrer proliferationsfördernden und anti-apoptotischen Wirkung ein therapeutisches Potential in der Behandlung des Diabetes bei einer Erhöhung der Akt-Aktivität in β -Zellen und peripheren Geweben dar, indem die β -Zellmasse erhöht wird und die Insulinsekretion und Glucoseaufnahme verbessert werden.

4.1.4.2 Bedeutung von LPA bei weiteren Komponenten des Insulin-Signalweges

Wie bereits nachgewiesen wurde, übte LPA eine signifikante Hemmung der Insulin-induzierten Akt-Aktivierung aus. Nun wurde im Rahmen dieser Arbeit der Effekt von LPA auf weiteren Ebenen des Insulin-Signalweges untersucht.

IR ist kritisch für die Entwicklung und das Wachstum der β -Zellen. In einer Untersuchung mit MIN-6 Zellen wurde gezeigt, dass IR-Knockdown mittels siRNA zu einer Inhibierung des Insulin-Signalweges führt, was mit einer Hemmung der Zellproliferation und Zellzyklusprogression einhergeht (Ohsugi et al., 2005). Im Rahmen dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass LPA in MIN-6 Zellen eine hemmende Wirkung auf der Ebene des IR besitzt. So tritt durch LPA eine Reduktion der Insulin-induzierten IR Aktivierung auf. Im Gegensatz dazu wurde in aktuellen Untersuchungen mit CHO-K1 Fibroblasten eine positive Wirkung von LPA auf den IGF-1R beschrieben (Olianas et al., 2015). Über einen PTX-sensitiven LPA₁-Rezeptor induziert LPA eine Transaktivierung des IGF-1R, was zu einer Aktivierung der ERK1/2-Signalkaskade und folglich zur Stimulation der Zellproliferation führt.

IRS-2 ist ein essentieller Bestandteil des Insulin-Signalweges und agiert in der Regulation der β -Zellmasse. Untersuchungen an IRS-2^{-/-}-Mäusen zeigten, dass es zu einer Reduktion der β -Zellmasse durch eine gesteigerte Apoptoserate kommt, was mit einer Entwicklung eines T2D verbunden ist (Dickson Rhodes, 2004). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass LPA eine Reduktion der IRS-2-Aktivität verursacht. Durch eine Überexpression von IRS-2 konnte eine große Bedeutung in der proliferationsfördernden Wirkung von IGF-1 und Glucose detektiert werden, die eine Expansion der β -Zellmasse zur Folge hat (Lingohr, Dickson, et al., 2002; Lingohr et al., 2003). Jedoch zeigt die gesteigerte Expression von IRS-2 in β -Zellen eine anti-apoptotische Wirkung, die Schutz vor der durch Streptozotocin und der durch FFA-induzierten Apoptose darstellt (Hennige et al., 2003). Des Weiteren wurde eine Modulation der PI3K-Aktivität durch LPA untersucht. LPA führte zu einer Erniedrigung der aktivierten PI3K, was mit einer Abnahme der Akt-Phosphorylierung begleitet ist. Das Ausschalten der GPAT1-Expression bei Mäusen mit HFD-induzierter hepatischer Insulinresistenz führt zu einer Erniedrigung des hepatischen Gehalt an LPA und DAG, was mit einer Verbesserung der hepatischen Insulinsensitivität durch eine Steigerung der IRS-2-Expression und PI3K/Akt Aktivität verknüpft ist (Neschen et al., 2005). Daraus konnte somit eine mögliche Beteiligung von LPA an der Insulinresistenz durch eine Störung der Insulin-Signalkaskade abgeleitet werden. Daher wurden neue Strategien zur Therapie des T2D durch eine Erhöhung des IRS-2/PI3K-Signalweges entwickelt.

GSK3 β stellt eine wichtige Komponente des Insulinsignalweges dar. Akt inaktiviert die GSK-3 durch Phosphorylierung am N-Terminus und beeinflusst als wichtiger Regulator die β -Zellmasse und Glucosetoleranz. Mäusen, bei denen die GSK3 β überexprimiert wird, zeigen eine Reduktion der β -

Zellproliferation und -masse sowie zur Störung der Glucosetoleranz (Z. Liu et al., 2008). Bei genetisch modifizierten Mäusen, bei denen die Expression der GSK3 β spezifisch in pankreatischen β -Zellen unterdrückt wird, ist die β -Zellmasse erhöht und die Glucosetoleranz verbessert. Diese Mäuse sind vor einem HFD-induzierten Diabetes geschützt (Y. Liu et al., 2010). Dieser Anstieg der β -Zellmasse könnte eine Folge der Inhibierung der GSK3 β -vermittelten negativen Rückkopplung des Insulin-Signalwegs sein, welcher für die β -Zellproliferation essentiell ist.

Als Folge des inhibitorischen Effekts von LPA auf Akt wurde eine Dephosphorylierung und Aktivierung von GSK3 β gezeigt. Eine Aktivierung der GSK3 β hemmt verschiedene Substrate wie Cyclin D1, P27, c-Myc, die an der Zellproliferation maßgeblich beteiligt sind. Somit wird die Aktivierung der GSK3 β durch LPA als Ursache für seine proliferationshemmende Wirkung in den β -Zellen angesehen. In der Tat kann LPA eine GSK3 β -Dephosphorylierung über G_{12/13} in Neuro2A-Zellen mit nachfolgender Neuritenretraktion auslösen (Sayas et al., 2002). Im Gegensatz zu einer Aktivierung der GSK3 β durch LPA wurde auch eine Phosphorylierung und Inaktivierung durch LPA bei anderen Zelltypen beobachtet. Dabei konnte LPA in hippocampalen Progenitorzellen eine Phosphorylierung und Inaktivierung von GSK3 β über G_{i/o} und folglich Zellüberleben induzieren (Sun et al., 2010).

Des Weiteren wurde der Effekt von LPA auf FOXO als wichtiges Substrat von Akt untersucht. Der hemmende Effekt von Insulin auf FOXO1 wird durch LPA abgeschwächt. Dabei scheint LPA FOXO zu dephosphorylieren und zu aktivieren. In der Tat kontrolliert FOXO den Zellzyklus, die Apoptose, die Proliferation und die Differenzierung der Zellen. FOXO induziert die Expression einer Vielzahl pro-apoptotischer Proteine und stellt einen positiven Regulator des Zellzyklus durch die Induktion von Cyclin D1, D2 und CDKIs (Cycline-dependent kinase inhibitor) wie p21^{Cip1}, p27^{Kip1} dar (H. Huang Tindall, 2007; Kops et al., 2002). Durch die Zunahme der FOXO-Aktivität durch LPA könnte das Gleichgewicht zwischen Wachstum und programmiertem Zelltod gestört werden. Dies bewirkt eine Inhibition der Zellzyklusprogression und eine Induktion der Apoptose. In murinen β -Zellen MIN-6 scheint FOXO ein wichtiger Mediator für den durch Palmitat- und ER-Stress-induzierten β -Zelltod zu sein (Martinez et al., 2008). Hierbei wird FOXO in den Zellkern transloziert, wodurch pro-apoptotische Gene aktiviert werden. FOXO ist an der Proliferation der β -Zellen durch die Induktion der Transkription von PDX-1 beteiligt, der eine entscheidende Rolle in der Funktion und Proliferation der β -Zellen spielt. Aktives FOXO vermindert die Expression von PDX-1 und es findet eine Relokalisation von PDX-1 vom Zellkern ins Cytoplasma statt. So führt der Verlust von PDX-1 zu einer Hemmung der β -Zellproliferation und zur Entwicklung des T2D (Kawamori et al., 2006; Kitamura et al., 2002). Außerdem führt der Verlust von PDX-1 zu einer Verminderung der anti-apoptotischen Proteine BCL-XL und BCL-2 und zu einer Steigerung der Caspase 3-Aktivität, worauf die Apoptose aktiviert wird (Johnson et al., 2003). Eine Reduktion der Expression von PDX-1 wurde im Rahmen dieser Arbeit in Anwesenheit von LPA detektiert. Die Stimulation durch Insulin führte zu

einer verstärkten PDX-1-Expression, was mit einem Anstieg der Zellproliferation und dem Überleben der Pankreasinseln einhergeht. Es wäre daher denkbar, dass die proliferationshemmende und proapoptotische Wirkung von LPA in β -Zellen durch eine Reduktion der Expression von PDX-1 zu erklären ist.

Ein wichtiges Substrat von Akt ist mTOR, das durch die Nährstoffe und Wachstumsfaktoren sowie durch Hormone aktiviert wird und als ein zentraler Regulator von Zellwachstum, Proliferation und Überleben sowie vom Metabolismus agiert. In transgenen Mausmodellen wurde gezeigt, dass mTORC1 durch die Förderung der β -Zellproliferation und -größe ein positiver Regulator der β -Zellmasse ist. Dies wurde durch Phosphorylierung seiner Downstream-Targets eIF4E und S6K vermittelt. eIF4E trägt zur einer β -Zellproliferation durch Induktion der Expression von p21^{Cip1}, p27^{Kip1} und Cyclin D1, D2, D3, E und A bei, was den Übergang von Zellen aus der G1-Phase des Zellzyklus in die S-Phase fördert (X. Wang Proud, 2009). S6K reguliert die Proteinsynthese und erhöht die β -Zellgröße. Bei S6K-Knockout Mäusen zeigten sich eine Reduktion der Zellmasse durch eine Verringerung der β -Zellgröße um 24 % im Vergleich mit S6K-Wildtyp-Mäusen, was mit einem verringerten Insulingehalt in den Inseln dieser Mäuse verbunden ist (Xie Herbert, 2012). Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Effekt von LPA auf mTOR und S6K untersucht. Während in Anwesenheit von LPA die mTOR-Phosphorylierung nur leicht reduziert war, konnte dagegen eine deutliche Hemmung der Insulin-induzierten S6K-Phosphorylierung nachgewiesen werden. Untersuchungen haben hingegen gezeigt, dass die chronische Aktivierung von mTORC1 durch die Überernährung bei Adipositas über einen negativen Rückkopplungsmechanismus durch S6K zu einer Reduktion des IRS-2/Akt Signalweges in β -Zellen führt und eine Reduktion der β -Zellmasse zur Folge hat (Elghazi et al., 2010). Eine indirekte Aktivierung von mTOR durch LPA wird diskutiert. Dabei wird gezeigt, dass PA aus Phosphatidylcholin durch PLD1 generiert wird, wodurch mTOR aktiviert wird und die Progression des Zellzyklus und Überlebens vermittelt wird (Foster, 2007; Jaafar et al., 2013). In diesem Zusammenhang wird postuliert, dass LPA die PLD1-generierte PA aktiviert, wodurch die Aktivierung von mTOR und seiner Effektoren S6K und 4E-BP1 vermittelt wird, was zu einer Proliferation der Fibroblasten (Rat-2) führt (Kam Exton, 2004; Samadi et al., 2011).

Nachdem durch LPA eine Hemmung des Insulin-aktivierten PI3K/Akt-Signalweges induziert wird, wurde auch in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob LPA ebenfalls zur Hemmung der Insulin-aktivierten Ras/Raf/ERK in MIN-6 Zellen beitragen kann.

ERK1/2 sind Mitglieder der MAPK-Familie und werden durch Wachstumsfaktoren, Zytokine, Hormone und oxidativen Stress über GPCR und RTK aktiviert. Für Zellwachstum und Differenzierung sind ERK1/2 von großer Bedeutung. Sowohl in MIN-6 Zellen als auch in isolierten Inseln der Maus stellt der Insulin-aktivierte Raf-1/ERK1/2 Signalweg eine maßgebliche Bedeutung für die Induktion der β -Zellproliferation und des Überlebens dar (Alejandro Johnson, 2008; Beith et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit konnte der Nachweis erbracht werden, dass ERK1/2 durch Insulin

aktiviert wird, während die Vorbehandlung mit LPA zu einer Hemmung der ERK1/2-Phosphorylierung beiträgt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass LPA eine zusätzliche Wirkung hinsichtlich der Hemmung der Insulin-stimulierten Zellproliferation und das Überlebens über Inhibierung der ERK1/2 vermittelt. Jedoch wird auch über die negative Wirkung von ERK1/2 auf den Insulin-Signalweg berichtet. So führt im Rahmen eines negativen Feedback-Mechanismus die chronische Aktivierung der ERK1/2 durch Insulin zur Phosphorylierung von Serin-Resten des IRS-2 und vermindert so den Insulin-Signalweg (Fritsche et al., 2011). Außerdem konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die alleinige Stimulation mit LPA zu einer deutlichen Aktivierung der ERK1/2 führt. LPA konnte in verschiedenen Zellen die ERK1/2 sowohl direkt als auch durch Transaktivierung des EGF-Rezeptors aktivieren und dadurch die Proliferation und das Überleben bewirken (Cunnick et al., 1998; M. K. Kim et al., 2005; Rusovici et al., 2007). Da LPA eine leichte Anti-apoptose in MIN-6 Zellen induzieren kann, wäre es möglich, dass die anti-apoptotische Wirkung des LPA in MIN-6 Zellen über eine Aktivierung der ERK1/2 vermittelt wird.

Demnach lassen die Ergebnisse dieser Arbeit darauf schließen, dass erhöhte LPA-Konzentrationen im Plasma einen hemmenden Einfluss auf den Insulin-Signalweg haben und zur Insulinresistenz in den β -Zellen beitragen.

4.1.5 Beteiligung von PKC δ an der hemmenden Wirkung von LPA

Insgesamt lässt sich aus den erhaltenen Daten ableiten, dass LPA eine Dephosphorylierung von Akt auslöst, was mit der Hemmung der Proliferation sowie Induktion der Apoptose einhergeht. In dieser Hinsicht wurde untersucht, welche intrazellulären Signalkaskaden dieser Reaktion zu Grunde liegen. Schon länger ist bekannt, dass PKC-Isoformen die Insulin-Signalkaskade hemmen können und bei der Entstehung einer Insulinresistenz maßgeblich beteiligt sind. Dabei wurde im Vorversuch gezeigt, dass die Aktivierung von PKC durch den PKC-Aktivator (PMA) zu einer dosis-abhängigen Hemmung der Insulin-induzierten Akt-Phosphorylierung führt. Dies stimmt mit anderen Studien überein, in denen die hemmende Wirkung von PMA in β -Zellen nachgewiesen wurde (Wrede et al., 2002). Im Vergleich zu PMA könnte die LPA-induzierte Akt-Hemmung durch einen PKC-abhängigen Signalweg vermittelt werden. Im Folgenden wurde das Expressionsmuster der PKC-Isoformen in MIN-6 Zellen mittels RT-PCR untersucht. Die stärkste Expression wurde von PKC δ in MIN-6 Zellen detektiert. Eine niedrige Expression wurde von PKC α , β , γ gefunden. Am geringsten wurde in MIN6-Zellen die PKC θ exprimiert und die Expression von PKC ζ unterblieb hier gänzlich. In der früheren Literatur sind unterschiedliche Expressionsmuster der PKC-Isoformen in MIN-6 Zellen beschrieben worden. So wurde zwar die mRNA-Expression von PKC α , λ , δ , ζ und ϵ in MIN-6 Zellen detektiert, aber es wurde nur eine geringe Expression von PKC δ gezeigt (Tian et al., 1996). Als Ursache für diesen Unterschied

werden in den früheren Literaturen nicht hinreichend spezifische Primer angegeben, die eine genaue Differenzierung der Expressionen der einzelnen Isoformen nicht zuließen. In der β -Zelllinie RIN1046-38 der Ratte konnte eine starke Expression der PKC δ und eine niedrige Expression von PKC ζ gezeigt werden (Hennige et al., 2002). Um festzustellen, ob die Inhibition der PKC einen modulierenden Effekt auf die durch LPA induzierte Akt-Hemmung hat, wurde GF109203X als ein genereller Inhibitor der PKC eingesetzt. Die hemmende Wirkung von LPA auf die Akt-Aktivierung wurde durch GF109203X aufgehoben. Diese Hemmung weist darauf hin, dass LPA über eine Aktivierung der PKC zu einer signifikanten Reduktion des Insulin-Signalweges führt. Des Weiteren wurde untersucht, welche PKC-Isoform an der hemmenden Wirkung von LPA beteiligt ist. So zeigte die Anwesenheit von GÖ 6976, einen Inhibitor der konventionellen PKC, keinen Einfluss auf die hemmende Wirkung von LPA. Damit ist eine Beteiligung der konventionellen PKC-Isoformen an der hemmenden Wirkung von LPA auf die Akt-Aktivität unwahrscheinlich. Zunächst wurde Rottlerin eingesetzt, ein PKC-Inhibitor, welcher die Aktivität von PKC δ blockiert. Obwohl Rottlerin als unspezifischer Inhibitor der PKC δ beschrieben ist, kann es in Konzentrationen zwischen 3 und 6 μ M als PKC δ -Inhibitor eingesetzt werden (Gschwendt et al., 1994). Bei einer Inkubation der Zellen mit 5 μ M Rottlerin zeigte sich eine Schwächung der LPA-induzierten Akt-Hemmung. Darüber hinaus wurde eine dosis-abhängige Aktivierung der PKC δ durch LPA beobachtet. Dabei konnte LPA bei 10 μ M eine maximale Aktivierung von PKC δ erreichen. Daher ist es möglich, dass einer der Mechanismen für die durch LPA-ausgelöste Hemmung der Akt-Aktivität über eine Aktivierung der PKC δ vermittelt wird. Eine Aktivierung der PKC δ durch LPA wurde in dieser Arbeit erstmals in β -Zellen gezeigt. LPA aktiviert die PKC δ in verschiedenen Zellen und vermittelt dadurch mehrere Prozesse. In glatten Muskelzellen induziert LPA die Transkription der Early Growth Response-1 (Egr-1) durch die Aktivierung der PKC δ , was zur Zellproliferation führt (Iyoda et al., 2012). Auch ist LPA in der Lage, die Differenzierung der Schwanzzellen durch PKC δ auszulösen (Y. Li et al., 2003).

Der negative Effekt von PKC δ auf den Insulin-Signalweg ist bereits in verschiedenen Studien beschrieben worden. In INS-1 Zellen induziert FFA eine PKC δ -vermittelte Dephosphorylierung der Akt Kinase und somit eine Insulinresistenz in β -Zellen (Wrede et al., 2003). Außerdem wurde auch in Keratinozyten eine durch die PKC δ -vermittelte Dephosphorylierung der Akt-Kinase durch S1P beschrieben (Schüppel et al., 2008). PKC δ kann nicht nur mit der Akt, sondern auch auf weiteren Ebenen des Insulin-Signalweges interferieren. PKC δ führt zur Serin-Phosphorylierung des IRS und verhindert damit die Insulin-vermittelte Tyrosin-Phosphorylierung von IRS. Dies führt zu Störungen des Insulin-aktivierten PI3K/PKB-Signalweges (Waraich et al., 2008). In diesem Zusammenhang könnte die Reduktion der Tyrosin-Phosphorylierung von IRS-2 durch die LPA-vermittelte PKC δ -Aktivierung angesehen werden. Neben der negativen Wirkung wird auch eine positive Wirkung von PKC δ auf den Insulin-Signalweg beschrieben. Hierbei konnte in einer Studie gezeigt werden, dass PKC δ ein positiver Regulator in Skelettmuskelzellen ist und den IR beeinflusst. So führt die

Überexpression der PKC δ zu einer Erhöhung der Tyrosin-Phosphorylierung des IR und des IRS-1 und aktiviert damit die IR-Signalkaskade (Jacob et al., 2010). Neben der PKC δ zeigen andere PKC-Isoformen auch eine negative Beeinflussung der Akt-Kinase. Dabei wird diskutiert, dass eine Aktivierung von PKC ζ durch Ceramide eine Dephosphorylierung von Akt auslösen kann (Fox et al., 2007). Darüber hinaus hemmt LPC die Insulin-induzierte Akt-Aktivierung durch PKC α in vaskulären glatten Muskelzellen (Motley et al., 2002). Außerdem führt die Aktivierung der PKC θ und PKC ϵ durch DAG im Sinn einer Insulinresistenz zu einer Verminderung der Tyrosin-Phosphorylierung des IRS-1 und zu einer vermehrten der Serin-Phosphorylierung von IRS-1, was die Weiterleitung des Insulin-Signalweges verhindert (Samuel et al., 2010).

Eine proliferationshemmende Wirkung der PKC δ konnte in Keratinozyten und INS-1 Zellen durch die Interaktion mit dem Insulin-Signalweg gezeigt werden (Schüppel et al., 2008; Wrede et al., 2003). Hingegen führte die Überexpression der PKC δ in INS-1 Zellen unter stressfreien Bedingungen zu einem verstärkten Zellwachstum und Überleben (Ranta et al., 2011). Es wurde berichtet, dass PKC δ in verschiedenen Zelltypen wie Hepatozyten, Keratinozyten und Skelettmuskelzellen durch Insulin aktiviert wird und somit den mitogenen Effekt des Insulins und die Glucoseaufnahme vermittelt (Brutman-Barazani et al., 2012; Gartsbein et al., 2006; Horovitz-Fried et al., 2006).

PKC δ scheint eine wichtige Bedeutung bei der Induktion einer Apoptose zu besitzen. Verschiedene pro-apoptotische Signale werden durch PKC δ eingeschaltet und damit wird die Apoptose in den Zellen induziert. Die Aktivierung und Translokation der PKC δ in den Zellkern wird durch die Palmitat-induzierte β -Zellapoptose vermittelt (Eitel et al., 2003). Transgene Mäuse, bei denen eine Kinase-inaktive PKC δ spezifisch in pankreatischen β -Zellen (PKC δ KN) überexprimiert, sind vor einer HFD-induzierten Apoptose geschützt. Diese Untersuchung liefert einen weiteren Beweis dafür, dass die durch Palmitat-induzierte Akkumulation von FOXO im Zellkern bei (PKC δ KN)-Mäusen gehemmt und dadurch die Apoptose verhindert wird (Hennige et al., 2010).

So konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die LPA-aktivierte PKC δ eine Suppression der Akt-Aktivierung bewirkte und die Anwesenheit der Hemmstoffen GF109203X und Rottlerin zu einer Verstärkung der Phosphorylierung der Akt-Kinase führten. Allerdings wurden der Einfluss der PKC δ auf die Proliferationshemmung und die Apoptoseinduktion durch LPA in dieser Arbeit nicht überprüft. Es kann jedoch angenommen werden, dass die PKC δ -Aktivierung an diesen Prozessen beteiligt ist (Abb. 4.1.5).

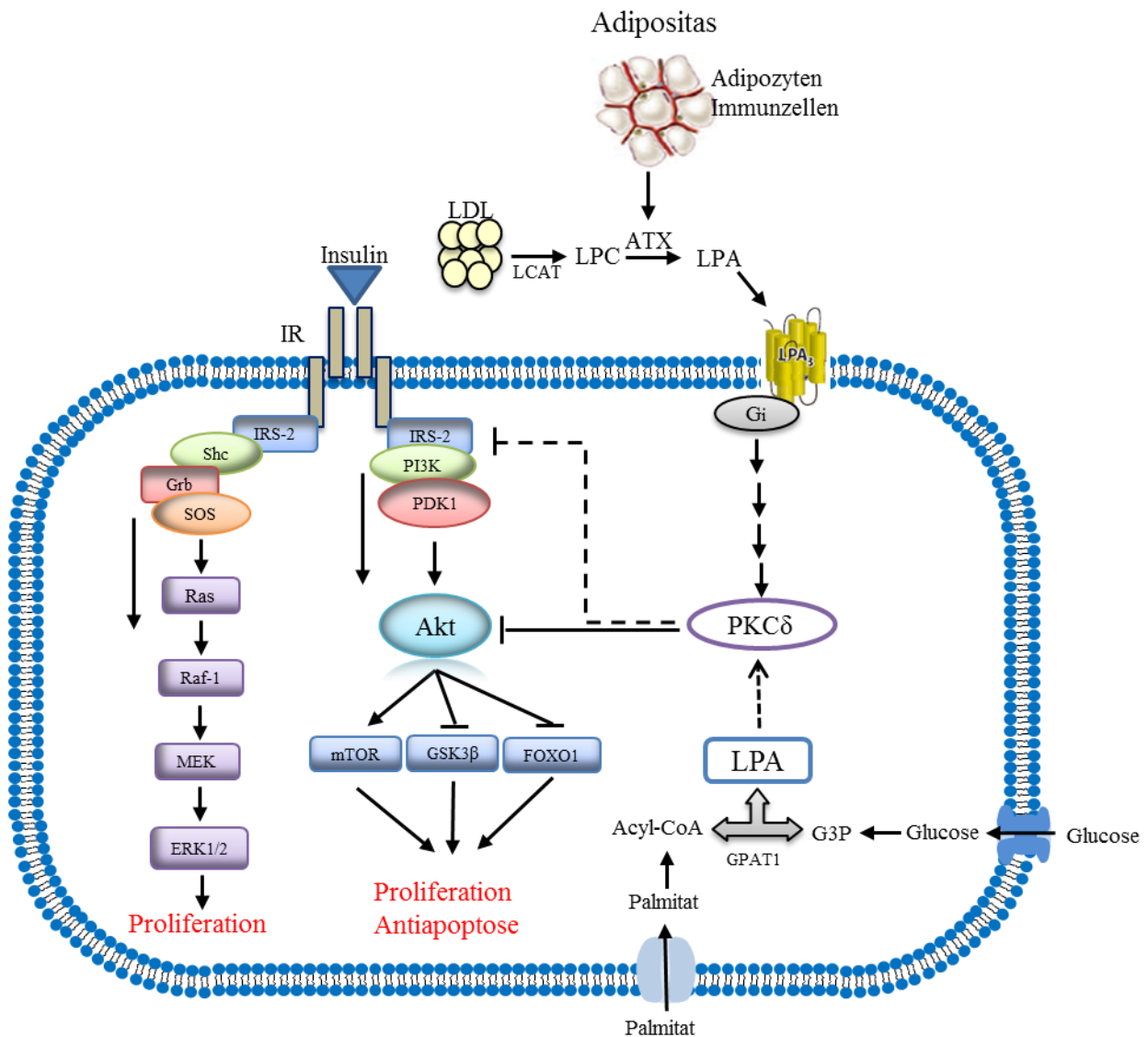


Abbildung 4.1.5: Möglicher Mechanismus der Insulin-Signalweg-Modulation durch LPA in pankreatischen β -Zellen. Unter Adipositas wird die ATX-Freisetzung von Adipozyten erhöht, was mit einer Steigerung der LPA-Konzentration im Plasma verbunden ist. LPA hemmt durch den Gi-Protein-gekoppelten LPA_3 -Rezeptor-vermittelte Aktivierung der PKC δ die Akt-Kinase. Auch könnte LPA über PKC δ den IRS-2 inhibieren und so die Weiterleitung den Insulin-Signalwegen PI3K/Akt und Raf1/ERK1/2 verhindern. Dadurch werden die Proliferation und das Überleben der β -Zellen verhindert und so resultiert eine Reduktion der β -Zellmasse, was in der Pathogenese des T2D involviert ist. LPA kann in der de novo Synthese von TG aus Acyl-CoA und G3P durch die GPAT entstehen. Somit könnte der erhöhte intrazelluläre LPA-Spiegel bei Adipositas an der Hemmung des Insulin-Signalweges beteiligt sein.

4.1.6 Weitere mögliche Mechanismen der LPA-vermittelten Hemmung der Insulin-Signalkaskade

Bisher konnte vor allem im Tiermodell gezeigt werden, dass ein erhöhter FFA-Spiegel eine wesentliche Rolle bei der Entstehung der adipositasassoziierten Insulinresistenz in β -Zellen spielt. Unter dem Einfluss der Oxidation der akkumulierten Fettsäuren kommt es zur Aktivierung verschiedener Serinkinasen, wie JNK, PKC, GSK3 β und mTOR. Diese Kinasen führen zur Hemmung des Insulin-Signalweges auf mehreren Ebenen. Im Plasma adipöser Menschen und Mäuse werden häufig erhöhte Konzentrationen an LPA gefunden, die zur Insulinresistenz führen können. In Rahmen dieser Arbeit wurde LPA als Ursache für die Insulinresistenz in β -Zellen identifiziert sowie auch Signalwege aufgeklärt, die an der LPA-induzierten Insulinresistenz beteiligt sind.

In genetischen und diätetischen Mausmodellen der Adipositas wurde eine Zunahme der JNK-Aktivität in peripheren Insulin-Zielgeweben wie Skelettmuskel, Fettgewebe und Leber beobachtet, welche die Insulinresistenz fördert (Hirosumi et al., 2002). Außerdem löst die JNK-Aktivierung eine Insulinresistenz in pankreatischen β -Zellen aus, indem eine Hemmung der Insulinsekretion sowie der Verlust der β -Zellen vermittelt werden. JNK führt zu einer Serin/Threonin-Phosphorylierung des IRS1/2 und verhindert damit die Insulin-vermittelte Signalkaskade (Solinas et al., 2006). Darüber hinaus führt die Aktivierung von JNK zu einer Verminderung der PDX-1 Aktivität und folglich zu einer Hemmung der Insulinexpression und antiapoptischen Proteine (Kaneto et al., 2005; Kawamori et al., 2006). Eine Zeitabhängigkeit der JNK-Phosphorylierung wurde in der vorliegenden Arbeit nach der Behandlung der MIN-6 Zellen mit 10 μ M LPA nachgewiesen. In einer weiteren Untersuchung wurde eine kombinierte Stimulation mit LPA und Insulin durchgeführt und die JNK Phosphorylierung detektiert. In der Tat wurde JNK als ein Stressfaktor beschrieben und in mehreren Zelltypen durch Insulin herunterreguliert, jedoch löste Insulin in MIN-6 Zellen erstaunlicherweise eine Phosphorylierung der JNK und in Anwesenheit von LPA nach 5 min eine Reduktion der aktivierten JNK aus. Eine signifikante Hemmung der Akt-Phosphorylierung durch LPA wurde in MIN-6 Zellen hervorgerufen, während eine signifikante Zunahme der JNK-Phosphorylierung durch LPA bereits nach 30 min beobachtet wurde. Daraus lässt sich folgern, dass eine Beteiligung der JNK-Aktivierung an der LPA-abhängigen Hemmung der Insulin-induzierten Akt-Phosphorylierung unwahrscheinlich ist. Die Aktivierung der JNK kann nicht nur durch Stress-Stimuli hervorgerufen werden, sondern auch durch Wachstumsfaktoren wie z. B. TGF- β (transforming growth factor β), EGF und PDGF (Auf et al., 2013; Seki et al., 2012). Außerdem wird diskutiert, dass die Aktivierung der JNK in der Lage ist, die Proliferation der Zellen zu stimulieren. Ebenfalls kann LPA die Proliferation verschiedener Zelltypen wie Swiss 3T3 Fibroblasten und 1321N1 Astrozytomzellen über eine Aktivierung der JNK fördern (S. Liu et al., 2004; Radhakrishnan et al., 2010). In einer Studie mit neuronalen

Progenitorzellen ergab sich ein Beweis, dass die JNK-Aktivierung an der durch GH-induzierten Zellproliferation beteiligt ist (Devesa et al., 2014; El-Haibi et al., 2011). In der Tat konnte auch gezeigt werden, dass Insulin die Proliferation der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7 über eine Aktivierung von JNK und ERK fördert (H. Chen et al., 2012). So lässt sich aufgrund der vorliegenden Ergebnisse vermuten, dass Insulin in pankreatischen β -Zellen neben Akt und ERK die JNK aktivieren kann und somit möglicherweise eine Zellproliferation vermitteln könnte. Aus der Literatur ist bekannt, dass die JNK-Aktivierung die Bindungsaktivität des PDX-1 mit daraus resultierender Proliferationshemmung der β -Zellen vermindert. In diesem Zusammenhang lässt sich ansehen, dass die zeitabhängige Aktivierung von JNK durch LPA mit der Hemmung der Insulin-stimulierten PDX-1-Expression durch LPA korreliert ist.

Eine weitere Möglichkeit ist, dass die Phosphorylierung von Akt durch eine Phosphatase gehemmt sein könnte. PP2A ist eine Serin-Threonin-Phosphatase, die eine Dephosphorylierung von Akt bewirkt. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass eine Überaktivierung von PP2A durch hohe Konzentrationen von Glucose und die damit entstehende Glucolipotoxizität an der Pathogenese der Insulinresistenz beteiligt ist (Kowluru Matti, 2012). Außerdem induziert Ceramid eine PP2A-Aktivierung, wodurch die Phosphorylierung von Akt katalysiert und anschließend eine Hemmung der Akt-Aktivierung ausgelöst wird, was eine Apoptose und Dysfunktion der β -Zellen zur Folge hat (Lang et al., 2011). Eine Methylierung der PP2A wurde nach der Behandlung mit 10 μ M LPA mittels Western Blot untersucht. Es wurde in der vorliegenden Arbeit kein Einfluss von LPA auf die Aktivität der PP2A in MIN-6 Zellen beobachtet.

Ein weiterer Mechanismus für die Entwicklung der β -Zelldysfunktion und T2D wurde durch erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen dargestellt. Die Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen reguliert verschiedene zelluläre Prozesse wie Proliferation, Apoptose, Differenzierung und Migration. Eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen führt zum β -Zelltod durch Aktivierung mehrerer pro-apoptotischer Signalwege wie ER-Stress, ROS, JNK und Caspasen. Ein zusätzlicher Mechanismus für die Induktion der Apoptose durch Ca^{2+} ist die Dephosphorylierung der Akt-Kinase. In einer Untersuchung mit MIN-6 Zellen wurde gezeigt, dass FFA zu einem Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels führen und so eine Dephosphorylierung der Akt mit β -Zellapoptose ausüben kann (S. E. Choi et al., 2007). LPA kann über G_q oder G_i die PLC aktivieren. In der Folge kommt es zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, wodurch verschiedene zelluläre Prozesse wie Apoptose, Proliferation und Migration vermittelt werden (Nilsson Svensson, 2003; Xu et al., 2005). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch, dass in MIN-6 Zellen die LPA-induzierte Akt-Hemmung nicht von Ca^{2+} abhängig ist. Die Hemmung der Insulin-induzierten Akt-Phosphorylierung durch LPA wurde durch Einsatz des Ca^{2+} -Chelators BAPTA/AM verstärkt. Außerdem konnte durch BAPTA/AM die Insulin-induzierte Akt-Phosphorylierung reduziert werden. Diese Resultate deuten darauf hin, dass das intrazelluläre Ca^{2+} für die Insulin-induzierte Akt-

Phosphorylierung notwendig ist. In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass ein erhöhter intrazellulärer Ca^{2+} -Spiegel mit einer Akt-Phosphorylierung assoziiert ist (Nicholson-Fish et al., 2015; Secondo et al., 2015). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass Ca^{2+} in dem Insulin-Signalweg involviert ist und somit in der Induktion der Zellproliferation. In Fibroblasten führt Insulin zu einer Aktivierung der Ca^{2+} /CaMKII, die wiederum zu einer ERK-Aktivierung und somit zur Induktion der Proliferation beiträgt (Monaco et al., 2009). In diesem Zusammenhang könnte man vermuten, dass die Steigerung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen für die Insulin-induzierte Akt-Phosphorylierung von entscheidender Bedeutung ist.

4.1.7 Beteiligung des LPA3-Rezeptors an der hemmenden Wirkung von LPA

Nachdem die MIN-6 Zellen eine LPA-induzierte Hemmung der Akt-Aktivierung zeigten, stellte sich die Frage, welche LPA-Rezeptoren für diese Wirkung verantwortlich sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die LPA-Rezeptoren auf mRNA-Ebene durch Anwendung der quantitativen Real-Time PCR bestimmt. So konnte die Expression aller LPA-Rezeptoren mit dem am stärksten exprimierten LPA₂-Rezeptorsubtyp in MIN-6 Zellen nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den durchgeführten Versuchen zeigte sich auch in primären Inseln aus Ratten ebenfalls eine verstärkte Expression des LPA₂ (Laychock et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von PTX auf die LPA induzierte Akt-Hemmung untersucht. In der Tat führte die Vorbehandlung mit PTX zu einer kompletten Inhibierung der LPA-induzierten Akt-Hemmung. Dies Resultat deutet darauf hin, dass die LPA-induzierte Hemmung der Insulin-abhängigen Akt-Phosphorylierung über G_i vermittelt wird. Obwohl der LPA₂-Rezeptor die stärkste Expression in MIN-6 Zellen zeigt, weisen die Untersuchungen durch den Einsatz von Agonisten und Antagonisten darauf hin, dass der LPA₃-Rezeptor an der Dephosphorylierung der Akt-Kinase beteiligt ist. So führt die Vorinkubation der MIN-6 Zellen mit den spezifischen LPA₃-Rezeptor-Agonisten OMPT zu einer Hemmung der Insulin-induzierten Akt-Phosphorylierung. Außerdem heben die LPA_{1/3}-Rezeptor-Antagonisten die LPA-vermittelte Hemmung der Akt- Dephosphorylierung auf. Insgesamt gibt es aktuell noch zu wenige Daten über die Beteiligung der LPA-Rezeptoren an der Hemmung der Akt-Aktivität. Die demonstrierte LPA-abhängige Reduktion der Akt-Aktivität kann bereits über andere LPA-Rezeptoren nachgewiesen werden. In Ovarialkarzinomazellen (CHO) konnte eine über den LPA₂-Rezeptor vermittelte Beeinflussung der G_{12/13}-Rho-Signalkaskade und eine damit verbundene Hemmung der Akt-Phosphorylierung beobachtet werden (Sugimoto et al., 2006).

Die Beteiligung des-Rezeptors an der LPA-induzierten Akt-Hemmung wurde auch in dieser Arbeit durch OMPT in Proliferationsversuchen bestätigt. Allerdings ist der LPA₃-Rezeptor für die Hemmung der Insulin-induzierten Proliferation der MIN-6 Zellen verantwortlich. Die proliferativen und anti-

proliferativen Wirkungen des LPA sind vom Zelltyp und den jeweils exprimierten LPA-Rezeptoren abhängig. In murinen Astrozyten kann die Aktivierung des LPA₁-Rezeptors zu einer Induktion der Proliferation führen (Shano et al., 2008). Die Aktivierung von LPA₁- und LPA₃-Rezeptoren in einer Zelle zeigt auf die Zellproliferation eine gegensätzliche Wirkung. Während der LPA₁-Rezeptor proliferationshemmend auf humane Mesangialzellen bewirkt, führt der LPA₃-Rezeptor in denselben Zellen zu einer Proliferation (Xing et al., 2004). Hingegen konnte in weiteren Untersuchungen nachgewiesen werden, dass der LPA₁-Rezeptor in Endothelzellen F-2 die Proliferation induziert, jedoch LPA₃-Rezeptoren die Proliferation der Endothelzellen F-2 hemmen (Kitayoshi et al., 2012). Diese Studie steht im Einklang mit unseren Untersuchungen für eine Beteiligung vom LPA₃-Rezeptor an der hemmenden Wirkung der Proliferation. Des Weiteren wurde der LPA₃-Rezeptor als negativer Regulator weiterer zellulärer Prozesse beschrieben. In Darmkrebszellen (HCT116) trägt die Aktivierung des LPA₃-Rezeptors zu einer Hemmung der Zellmigration und -invasion bei (Fukui et al., 2012). Jedoch wird auch diskutiert, dass die anti-proliferative Wirkung von LPA über andere LPA-Rezeptoren vermittelt wird. In Maus-Fibroblasten 3T3 kann die Aktivierung des LPA₅-Rezeptors zu einer Hemmung der Proliferation führen (Dong et al., 2014). Darüber hinaus vermittelt der LPA₃-Rezeptor die Proliferation kardialer Fibroblasten bei Neugeborenen und bei hohen Konzentrationen von LPA wurde die Proliferation über LPA₂ gehemmt (J. Chen et al., 2006).

Außerdem konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass durch OMPT der anti-apoptotische Effekt des Insulins unterdrückt wurde. Dies lieferte einen zusätzlichen Hinweis für eine Beteiligung des LPA₃-Rezeptors an der hemmenden Wirkung von LPA. Außerdem konnten OMPT wie auch LPA alleine eine leichte anti-apoptotische Wirkung in MIN-6 Zellen induzieren. Die selektive Hemmung des LPA₃-Rezeptor durch LPA_{1/3}-Rezeptor-Antagonisten (VPC12249) führt zu einem zytoprotektiven Effekt in einem Modell zum renalen Ischämie-Reperfusionsschaden (I/R) (Okusa et al., 2003). Außerdem kann LPA über weitere LPA-Rezeptoren apoptotisch beeinflussen. Über den LPA₁-Rezeptor induziert LPA eine Apoptose in mehreren Zelltypen wie z. B. Epithelzellen, retinalen Ganglienzellen (RGC) und Endothelzellen (Brault et al., 2007; Funke et al., 2012; Yang et al., 2009). Auch wirkt LPA anti-apoptotisch über eine Aktivierung des LPA₃-Rezeptors. So konnte in mesenchymalen Knochenstammzellen (BMSCs) ein protektiver Effekt von LPA über den LPA₃-Rezeptor gegen eine durch H₂O₂-induzierte Apoptose gezeigt werden (X. Y. Wang et al., 2015).

4.2 Bedeutung von LPA in der vaskulären Homöostase

In zahlreichen epidemiologischen Studien wurde ein Zusammenhang zwischen den LPA-Spiegeln und dem Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen wie Thrombose, vaskuläres Remodeling und Atherosklerose beschrieben (Cui, 2011). Der erhöhte lokale LPA-Spiegel löst vaskuläres Remodeling durch die Stimulation der Neointima-Bildung und damit eine Progression der atherosklerotischen

Läsion aus (Panchatcharam et al., 2008). LPA wirkt als phänotypischer Modulator der glatten Gefäßmuskelzellen, die aus der Media in die Intima einwandern und dort proliferieren können, was für die Neointima-Bildung erforderlich ist (Yoshida et al., 2003). LPA moduliert den Blutdruck bei Ratten und anderen Säugetieren. Außerdem beeinflusst LPA als Regulator den Gefäßtonus, indem die lokale Applikation eine zerebrale Vasokonstriktion im Schwein verursacht (Tigyi et al., 1995).

Der Einfluss von LPA auf die endotheliale Funktion im Rahmen der Regulation des Gefäßtonus wurde in dieser Arbeit untersucht. LPA in physiologisch relevanten Konzentrationen (10 nM bis 5 μ M) führte im Versuch an isolierten Pulmonalarterien von Schweinen mit intaktem Endothel zu einer signifikanten dosisabhängigen Vasorelaxation an vorkontrahierten Gefäßringen. Die Endothelabhängigkeit der durch LPA vermittelten Vasodilatation wurde durch mechanische Endothelentfernung der Gefäßringpräparate oder durch chemische Hemmung der eNOS mittels des spezifischen und irreversiblen Inhibitors L-NAME untersucht, wobei die Vasodilatation völlig gehemmt wurde. Unterstützt wird dies durch neue Daten von Untersuchungen an isolierten thorakalen Aorten aus C57BL/6-Mäusen, bei denen LPA eine signifikante dosisabhängige Vasorelaxation in vorkontrahierten Aortenringen bewirkt. Diese Vasodilatation kann durch Endothelentfernung der Aortenringe völlig unterdrückt werden. Zusätzlich konnte in vorkontrahierten Aortenringen von eNOS-defizienten Mäusen durch LPA ebenfalls keine signifikante Vasodilatation ausgelöst werden (Ruisanchez et al., 2014). Alle Daten zeigen somit eindeutig, dass die durch LPA ausgelöste Vasodilatation ausschließlich vom Endothel abhängig ist und über eine eNOS-abhängige NO-Produktion gesteuert wird. Hinsichtlich der Wirkung von LPA auf die untersuchten Gefäße ergab sich bei den Untersuchungen durch Ruisanchez, Dancs et al. eine weitere wichtige Beobachtung (Ruisanchez et al., 2014). Unter basalen, nicht vorkontrahierten Bedingungen verursachte LPA eine geringe Kontraktion in Aortenringen von C57BL/6-Mäusen. Darüber hinaus löst LPA sowohl nach der Entfernung des Endothels als auch in isolierten Gefäßen von eNOS-defizienten Mäusen eine Vasokonstriktion aus. In dieser Arbeit zeigte LPA keine vasokonstriktorische Wirkung weder durch die Behandlung mit L-NAME noch auf den basalen Gefäßtonus.

In weiteren Untersuchungen wurde ebenfalls von vasokonstriktorischen Effekten des LPA berichtet. Unter Shear Stress beeinflusst LPA eine endothelabhängige Vasokonstriktion in isolierten mesenterialen Arterien der Ratten und in Maus-Aorten (Niioka et al., 2013; Shibata et al., 2011). Die in dieser Arbeit dargestellten Versuche wurden unter stressfreien-Bedingungen durchgeführt. In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass LPA durch verschiedene Mechanismen eine endotheliale Dysfunktion induzieren kann. Einer dieser Mechanismen ist die Beeinträchtigung der Vasodilatation der Koronararterien vom Schwein. Dabei führt LPA zu einer dosisabhängigen Reduktion der Bradykinin-induzierten Vasodilatation über eine Reduktion der eNOS-Expression (C. Chen et al., 2012). Die physiologische LPA-Konzentration liegt im Serum bei 5 - 10 μ M, aber unter

pathologischen Bedingungen kann sie um das Mehrfache höher sein. Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte LPA-Konzentration liegt im Bereich von 16 nM bis 5000 nM und ist äquivalent zu der physiologisch vorliegenden Konzentration im Serum und führt damit zu einer direkten Vasodilatation. Die in der Untersuchung von Chen, Ochoa et al. eingesetzten Konzentrationen von LPA lagen im Bereich von 10 - 50 μ M und führten nach 24-stündiger Inkubation mit LPA zu einer Vasokontraktion (C. Chen et al., 2012).

LPA vermittelt eine Vielzahl an physiologischen Prozessen durch Aktivierung verschiedener G-Protein-gekoppelter LPA-Rezeptoren. Die LPA-Rezeptorexpression auf isolierten Pulmonalendothelzellen von Schweinen wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. In der Untersuchung von Ruisanchez, Dancs et al. konnte nachgewiesen werden, dass die Expression von LPA₁-, LPA₂-, LPA₄- und LPA₅-Rezeptoren mit dem am stärksten vertretenen LPA₄-Rezeptorsubtyp in den isolierten murinen Endothelzellen aus Aorten stattfindet. Die LPA-induzierte Vasodilatation konnte in der vorliegenden Arbeit durch DGPP, einen LPA_{1/3}-Antagonisten, abgeschwächt werden. Dies deutet auf eine mögliche Beteiligung des LPA₁- und/oder LPA₃-Rezeptorsubtyps hin. In Bezug auf die Expressionsmuster der LPA-Rezeptoren wurde der LPA₃-Rezeptor bei Ruisanchez, Dancs et al. nicht gefunden (Ruisanchez et al., 2014). Dies deutet darauf hin, dass es keine Beteiligung des LPA₃-Rezeptor bei der LPA-vermittelten Wirkung gibt. Im Vergleich zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zeigte sich bei Ruisanchez, Dancs et al. 2014 mit Hilfe von verschiedenen LPA-Rezeptoren-Agonisten und -Antagonisten, dass der vasodilatierende Effekt der LPA vollständig über den LPA₁-Rezeptor vermittelt zu sein scheint. Ebenfalls konnten Untersuchungen an LPA₁-Rezeptor-defizienten Mäusen einen weiteren Hinweis liefern, dass der vasodilatierende Effekt von LPA über den LPA₁-Rezeptor vermittelt wird (Ruisanchez et al., 2014). Die Aktivierung der LPA_{1/3}-Rezeptoren ist an der Pathogenese der pulmonalen Hypertonie beteiligt (Shlyonsky et al., 2014). Eine Studie mit Widerstandsgefäßen der Rattenmodelle belegt, dass die myogene Vasokonstriktion durch den LPA₃-Rezeptor-induzierte Integrin-Aktivität vermittelt wird (Staiculescu et al., 2014).

4.3 Einfluss von LPA auf die eNOS-Aktivierung in HPAECs

Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse konnten zeigen, dass LPA an Pulmonalarterien mit intaktem Endothel eine dosisabhängige endothelvermittelte Vasodilatation auslöst, die durch pharmakologische eNOS-Hemmung durch L-NAME und Endothelentfernung vollständig aufgehoben werden kann. So liegt die Vermutung nahe, dass LPA eine Aktivierung der eNOS mit nachfolgender NO-Freisetzung induzieren kann. Dies wurde mit Hilfe von humanen pulmonalarteriellen Endothelzellen (HPAECs) festgestellt. LPA führt innerhalb von Minuten zu einer konzentrations- und zeitabhängigen Phosphorylierung an Ser1177 und somit Aktivierung der eNOS in den HPAECs. Die durch LPA induzierte NO-Produktion aus kultivierten HPAECs konnte mittels des NO-sensitiven

Fluorophors DAF-2DA in fluoreszenzmikroskopischen Versuchen reproduziert werden. Durch pharmakologische Hemmung der eNOS durch L-NAME konnte der NO-abhängige Fluoreszenzanstieg aufgehoben werden. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass LPA ebenfalls in BAECs (bovin aortic endothelial cell) einen konzentrations- und zeitabhängigen stimulierenden Effekt von LPA auf die eNOS-Aktivierung zeigt (Kou et al., 2002).

Es gibt jedoch Unterschiede in der zeitlichen Reihe der eNOS-Phosphorylierung in der Zellkultur im Vergleich zum Relaxationsverhalten der Schweinegefäßringe. Während eine Phosphorylierung der eNOS in den Zellkulturversuchen bereits nach 5 min auftrat, konnte die Relaxation der Gefäßringe direkt nach der Zugabe von LPA beobachtet werden. Außerdem wurde die maximale eNOS-Phosphorylierung in der Zellkultur bei 10 μM hervorgerufen, während die maximale Relaxation der Gefäßringe bei 1,6 μM nachgewiesen wurde. Mögliche Ursachen dieser Differenzen könnten unterschiedliche Versuchsbedingungen sein. In Gefäßringen funktioniert das Endothelium im Zusammenspiel mit den umgebenden Geweben, während in der Zellkultur die Endothelzellen nur eine isolierte Schicht bilden.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse könnten Hinweise dafür sein, dass LPA in der Lage ist, die eNOS zu aktivieren und auf diesem Wege die Bioverfügbarkeit von NO zu erhöhen, was mit einer Vasodilatation der Gefäße einhergeht und damit eine Verbesserung der Endothelfunktion bewirkt. Im Gegensatz dazu wurde gezeigt, dass LPA über eine Reduktion der eNOS-Expression zu einer endothelialen Dysfunktion führt (C. Chen et al., 2012). LPA induziert eine dosis- und zeitabhängige Reduktion der eNOS-mRNA-Ebene in isolierten Koronararterien von Schweinen sowie auch in humanen Koronararterien Endothelzellen (HCAECs). Außerdem konnte LPA in einer Konzentration von 10 μM eine Dephosphorylierung der eNOS in HCAECs auslösen, während die Stimulation mit 10 μM in HAPEC zu einer erhöhten Phosphorylierung der eNOS führt. Dieser gegensätzliche Effekt von LPA könnte möglicherweise auf den unterschiedlichen Zelltypen und/oder der Inkubationszeit der Endothelzellen mit LPA beruhen. Bei Chen, Ochoa et al. wurden die HCAECs über 24 h mit LPA inkubiert, was dann zur Reduktion der eNOS-Expression führte (C. Chen et al., 2012). In unseren Untersuchungen konnte LPA eine Phosphorylierung der eNOS erst ab Stimulationszeiten von 5 min ausüben. Ebenfalls konnte in den Versuchen von Kou, Igarashi et al. in BAECs eine schnelle Phosphorylierung der eNOS innerhalb einer Minute gezeigt werden. Diskutiert wird, dass andauerndes freigesetztes NO im Sinne eines negativen Rückkopplungsmechanismus eine Inaktivierung der eNOS beeinflusst (Vaziri Wang, 1999). So liegt der Gedanke nahe, dass die Behandlung mit LPA innerhalb von Minuten zu einer eNOS-Aktivierung und damit zur NO-Bildung mit nachfolgender Vasodilatation führt, jedoch mit dauerhaft erhöhter NO-Bildung durch LPA die eNOS-Expression reduziert wird und damit eine Verschlechterung der Vasodilatation aufweist. Untermuert wird diese Hypothese durch die Untersuchungen mit TNF α , indem die kurzfristige Behandlung der Endothelzellen mit TNF α eine

Aktivierung der eNOS induziert, während die langfristige Behandlung zur Reduktion der eNOS-Expression führt (Anderson et al., 2004; De Palma et al., 2006). Somit könnte geschlossen werden, dass der Einfluss von LPA auf die eNOS-Aktivierung zeitabhängig ist.

Die Untersuchung der konzentrations- und zeitabhängigen Wirkung von LPA hinsichtlich der eNOS-Aktivität in den HAPECs zeigt eine Zunahme der eNOS-Aktivität. Dies deutet auf eine Beteiligung der LPA-Rezeptoren an der Phosphorylierung der eNOS hin. Durch eine Real-Time PCR-Analyse der mRNA in den HAPECs wurde die Expression aller LPA-Rezeptoren mit dem am stärksten vertretenen LPA₂-Rezeptorsubtyp nachgewiesen. Untermauert wird dieses Ergebnis ebenfalls durch die Untersuchung von Re, Guo et al. 2013. In HPAECs wurde festgestellt, dass die Aktivierung von eNOS möglicherweise über den LPA₃-Rezeptor erfolgt. Dabei führt die Stimulation der HAPECs mit dem LPA₃-Rezeptor-Agonist OMPT zu einer signifikanten Phosphorylierung der eNOS. Außerdem konnten die LPA_{1/3}-Rezeptoren-Antagonisten VPC und DGPP die phosphorylierte eNOS durch LPA reduzieren. Der LPA₃-Rezeptor ist mit den G_i, G_q, G_{12/13} gekoppelt. Durch PTX konnte die aktivierte eNOS durch LPA gehemmt werden, was auf eine mögliche Beteiligung von G_i am eNOS-Signalweg hindeutet. Verschiedene Kinasen tragen zur Phosphorylierung und damit Aktivierung der eNOS bei. Seit längerer Zeit ist bekannt, dass die Aktivierung der Akt durch vermehrte Phosphorylierung eine entscheidende Rolle in der Aktivierung der eNOS darstellt (Dimmeler et al., 1999). So führt die Behandlung von HPAEC mit LPA zu einer PI3K-abhängigen Phosphorylierung der Akt, dosis- und zeitabhängig über die Bindung am LPA₃-Rezeptor, gekoppelt mit G_i. Diese Aktivierung von Akt durch LPA konnte bereits in anderen Endothelzellen wie z. B. HUVECs gezeigt werden (Ptaszynska et al., 2010). Die Aktivierung der eNOS durch LPA konnte nicht durch einen Einsatz des PI3K-Inhibitors LY294002 unterdrückt werden. Dies deutet darauf hin, dass LPA eine Aktivierung der Akt in HAPECs verursachen kann, diese Phosphorylierung aber nicht an der eNOS-Aktivierung mit einhergehender Vasodilatation beteiligt ist. Untermauert werden diese Ergebnisse durch *in vivo*-Versuche von Ruisanchez, Dancs et al. 2014, in denen eine Inhibierung der PI3K nicht zu einer Hemmung der LPA-induzierte Vasodilatation führte. Kou, Igarashi et al. 2002 kann hingegen zeigen, dass die Aktivierung der eNOS durch LPA über eine Aktivierung der PI3K mit einhergehender Aktivierung der Akt verläuft. Es ist bekannt, dass LPA in der Lage ist, durch Akt-Aktivierung verschiedene Zellprozesse zu vermitteln. Die anti-apoptotischen Wirkungen von LPA werden für die Aktivierung des PI3K/Akt Signalweges benötigt. LPA kann ebenfalls einen proliferativen Effekt über eine Aktivierung der Akt ausüben. Die LPA-induzierte Phosphorylierung der Akt könnte somit vielfältige Wirkungen, wie z. B. Überleben, Proliferation und Migration in Endothelzellen vermitteln. In einer Studie mit HUVECs wurde nachgewiesen, dass LPA die Migration der Endothelzellen über Akt induziert (Ptaszynska et al., 2010). Im ersten Teil dieser Arbeit konnte LPA keine Aktivierung der Akt-Kinase in den pankreatischen β -Zellen fördern, sondern führte zu einer Hemmung der Insulin-

induzierten Akt-Aktivierung, was zu einer Hemmung der durch Insulin ausgelösten Proliferation und des Überlebens der β -Zellen beiträgt.

Alternativ zum PI3K/Akt-Signalweg stellte diese Arbeit einen weiteren Mechanismus zur Aktivierung der eNOS durch LPA vor. Die erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration stellt einen kritischen Regulator der eNOS-Aktivität dar (Fleming Busse, 1999). Die Aktivierung der Gi- und Gq-Proteine bewirkt durch die Aktivierung von Phospholipase C, welche IP3 bildet, eine Ca^{2+} -Freisetzung aus dem intrazellulären Ca^{2+} -Speicher und damit einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, was zur Aktivierung der eNOS führt. Es konnte gezeigt werden, dass die HDL-induzierte eNOS-Phosphorylierung und -Aktivierung teilweise durch die Erhöhung der Ca^{2+} -Mobilisierung über PLC vermittelt werden (Nofer et al., 2004). Daher wurde die Möglichkeit eine Beteiligung der PLC bei der LPA-abhängigen eNOS-Phosphorylierung untersucht. Durch spezifische Hemmung der PLC mit U73122 konnte die LPA-induzierte eNOS-Phosphorylierung teilweise verhindert werden. Die durch LPA-induzierte eNOS-Phosphorylierung erfolgt nur in Anwesenheit von intrazellulärem Calcium, so dass durch Einsatz des intrazellulären Calciumchelators BAPTA-AM eine vollständige Hemmung der eNOS erreicht werden konnte. Dadurch wurde nachgewiesen, dass LPA zu einer Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels führt und damit zu einer eNOS-Aktivierung. Die teilweise hemmende Wirkung des PLC-Inhibitors deutet auf einen weiteren Weg für die Ca^{2+} -Mobilisierung und damit eNOS-Aktivierung hin. In VSMC-Zellen kann LPA die Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration durch Freisetzung aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern oder durch Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} über verschiedene Kanäle in der Zellmembran fördern (Xu et al., 2005). Somit könnte vermutet werden, dass LPA die Konzentration des intrazellulären Ca^{2+} in Endothelzellen sowohl durch PLC als auch durch die Förderung des Ca^{2+} -Einstroms erhöht und damit eNOS aktiviert. In der Untersuchung von Ruisanchez, Dancs et al. 2014 zeigt sich, dass die vasodilatierende Wirkung von LPA in isolierten Aorten der Maus durch den PLC-Inhibitor aufgehoben wird (Ruisanchez et al., 2014). Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen in Übereinstimmung mit Kou, Igarashi et al. 2002, dass die LPA-induzierte eNOS-Phosphorylierung in BAEC ebenfalls auf Ca^{2+} angewiesen ist (Kou et al., 2002). Erstaunlicherweise wurde in dieser Arbeit auch beobachtet, dass die Inhibierung des Ca^{2+} zu einer deutlichen Reduktion der LPA-induzierten Akt-Phosphorylierung führt. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde erwähnt, dass Ca^{2+} für die Akt-Aktivierung essentiell ist. Daher wurde vermutet, dass Ca^{2+} an der Aktivierung der Akt durch LPA beteiligt ist. Des Weiteren wurde eine weitere am Signalweg der eNOS-Aktivierung durch LPA beteiligte Kinase untersucht: CaMKII (calmodulin-dependent protein kinase II) ist eine Ser/Thr-spezifische Proteinkinase, die durch den Ca^{2+} /Calmodulin-Komplex aktiviert wird. Verschiedene Stimuli wie Bradykinin ermöglichen eine direkte Phosphorylierung der eNOS an Ser1177 durch Ca^{2+} /CaMKII (Fleming et al., 2001). Durch die Anwendung des CaMKII-Inhibitors KN93 wurde die LPA-abhängige eNOS-Aktivierung gehemmt. Dadurch wurde nachgewiesen, dass CaMKII am LPA-aktivierten eNOS-Signalweg beteiligt ist. Es ist bekannt, dass der

Ca²⁺/CaMKII-Signalweg auch andere zelluläre Prozesse beeinflussen kann. Eine mögliche Beteiligung der Ca²⁺/CaMKII an der LPA-induzierten Proliferation der Muskelzellen wurde beschrieben. In der Anwesenheit des selektiven Ca²⁺/CaM-Inhibitors KN62 wurde die LPA-induzierte Proliferation der Muskelzellen vollständig gehemmt. Die Phosphorylierung von eNOS nach einer Stimulation mit LPA scheint auf einem von der Akt-Kinase unabhängigen Weg, aber über einen PLC/Ca²⁺/CaMKII-Signalweg zu erfolgen (Abb.4.3).

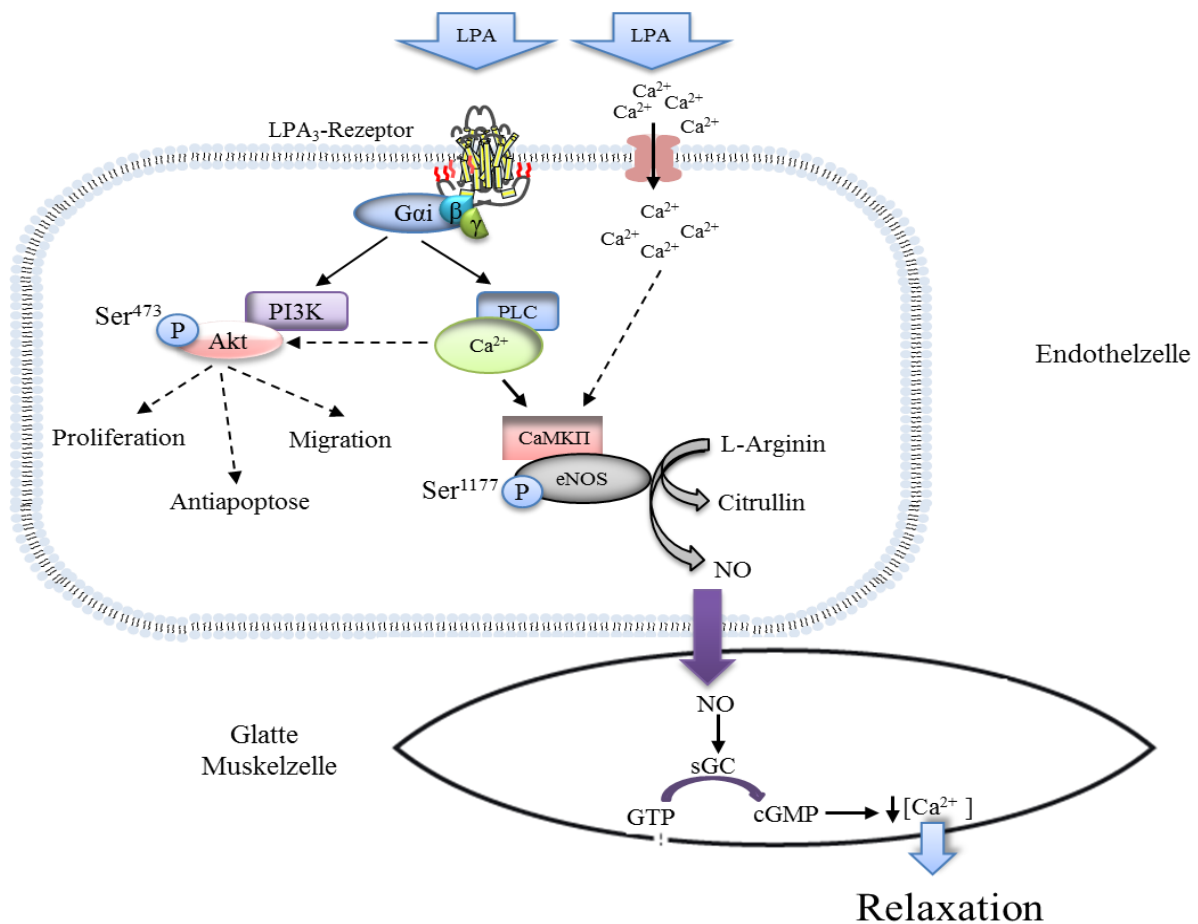


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung des möglichen Signalweges von LPA-induzierter eNOS-Phosphorylierung in Endothelzellen. Über den LPA₃-Rezeptor aktiviert LPA die PLC und PI3K, was zu einer Ca²⁺-Mobilisierung und Akt Aktivierung führt. Die erhöhte intrazelluläre Ca²⁺ aktiviert die CaMKII und daraus resultierten Aktivierung der eNOS mit nachfolgender NO-Produktion. Das gebildete NO diffundiert aus den Endothelzellen der Gefäße in die glatten Muskelzellen. Dort aktiviert es die sGC und führt dadurch zur Bildung von cGMP aus GTP und somit zu Senkung der intrazellulären Calciumkonzentration und daraus resultiert eine Relaxation der glatten Gefäßmuskelzelle mit nachfolgender Vasodilatation. Die LPA induzierte Akt Phosphorylierung könnte in Endothelzellen vielfältige Wirkungen, wie z.B. Anti-apoptose, Proliferation und Migration hervorrufen.

Hyperlipidämie, Adipositas und Diabetes mellitus sind Risikofaktoren für Funktionsveränderungen des Endothels. Die Veränderungen betreffen zum einen die Gefäßfunktion bezüglich der Regulation des Gefäßtonus. Bei adipösen und diabetischen Tiermodellen sowie bei übergewichtigen und diabetischen Menschen kann die verminderte Bioverfügbarkeit von NO (durch reduzierte eNOS-Expression und reduzierte eNOS-Aktivität) zu einer Verschlechterung der endothelvermittelten Vasodilatation führen, so dass die endotheliale Dysfunktion eine zentrale pathogenetische Rolle für die diabetesassoziierten vaskulären Komplikationen darstellt. Grund dafür könnte sein, dass eine langfristig erhöhte LPA-Konzentration bei Adipositas/Insulinresistenz sowie bei Diabetes auf das Endothel einwirkt. Chen, Ochoa et al. bestätigen diesen Verdacht und zeigen, dass die chronisch hohe Konzentration von LPA in der Lage ist, eine Reduktion der Expression von eNOS mit daraus resultierender Beeinträchtigung der endothelabhängigen Vasorelaxation zu induzieren, was zur Pathogenese der endothelialen Dysfunktion gehört (Chen, Ochoa et al. 2012). Somit könnte vermutet werden, dass LPA sowohl an der Insulinresistenz (und damit an T2D) als auch an der Entstehung von vaskulären Komplikationen des T2D beteiligt ist.

In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass Insulin verschiedene physiologische Funktionen im vaskulären Gewebe besitzt. Über den PI3K/Akt-Signalweg aktiviert Insulin eNOS und somit wird die NO-Produktion in Endothelzellen mit nachfolgender endothelabhängiger Vasorelaxation erhöht. Bei Vorliegen einer Insulinresistenz führen mehrere pathophysiologische Faktoren, wie ein erhöhter Spiegel an freien Fettsäuren, Hyperglykämie oder Inflammation, zu einer Hemmung der Insulin-Signalkaskade in Endothelzellen.

Bei Insulinresistenz könnte die erhöhte LPA-Konzentration einerseits die Hemmung des Insulin-Signalweges in β -Zellen und somit β -Zellverlust verursachen, andererseits ebenfalls durch die Hemmung der Insulin-Signalkaskade in Endothelzellen und daraus resultierend eine verminderte NO-Freisetzung mit nachfolgender endothelialer Dysfunktion auslösen.

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Ergebnisse ergaben, dass LPA die Endothelfunktion im Sinne einer Stimulation der NO-Produktion verbessert, wenn es für einen kurzen Zeitraum physiologischen Konzentrationen ausgesetzt ist. So beeinflusst LPA durch die Phosphorylierung der eNOS mit anschließender Steigerung der NO-Produktion über Aktivierung des Ca^{2+} /CaMII-Signalweges eine effektive Reduktion des Blutflusses infolge von Scherkräften. Außerdem könnte LPA durch NO-Produktion eine endothelprotektive Wirkung entfalten. Die LPA-abhängige Akt-Aktivierung könnte eine zusätzliche protektive Wirkung des Endothels sein.

Im Hinblick auf diese Ergebnisse könnte LPA eine mögliche therapeutische Strategie zur Prävention und Therapie darstellen, der Hypertonie sowie endothelialen Dysfunktion und der daraus resultierenden Entwicklung atherosklerotischer Läsionen entgegenzuwirken.

5 Zusammenfassung

5.1 Zusammenfassung

Die dem Typ-2-Diabetes mellitus zugrunde liegenden Pathogenesen beruhen auf einer Kombination aus peripherer Insulinresistenz, β -Zelldysfunktion und Reduktion der β -Zellmasse. Adipositas, arterielle Hypertonie und Dyslipidämie im Rahmen des Metabolischen Syndroms sind Faktoren, die mit dem Auftreten einer Insulinresistenz mit anschließender Progression eines T2DM einhergehen. FFA, vor allem Palmitat und seine Metaboliten wie Ceramide, DAG und S1P, spielen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese des T2D. Ein erhöhter Spiegel an FFA oder deren Metaboliten führen zu einer Hemmung der Insulin-Signalkaskade. Dadurch wird die Fähigkeit des Insulins reduziert, was zu einer Insulinresistenz beiträgt.

LPA stellt einen Lipidmediator dar, der mit einer Progression eines T2D verbunden ist. Ein Zusammenhang zwischen LPA und der Entwicklung von Adipositas wurde nachgewiesen. Erhöhte Plasmaspiegel von LPA sind mit Adipositas und einer reduzierten Insulin-Sensitivität assoziiert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte bewiesen werden, dass Palmitat in β -Zellen zu LPA umgewandelt wird. Des Weiteren konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass LPA eine Insulinresistenz in pankreatischen β -Zellen induzieren kann. LPA kann mit der Insulin-abhängigen Regulation der β -Zellhomöostase interferieren. Im Rahmen einer Reduktion der β -Zellmasse übt LPA eine proliferationshemmende Wirkung sowie auch eine Induktion der Apoptose in der pankreatischen Betazelllinie MIN-6 aus. Als verantwortlicher Signalweg dafür wurde eine Hemmung der Insulin-induzierten Akt-Aktivierung durch eine Aktivierung der PKC δ identifiziert. Über den LPA₃-Rezeptor unterbricht LPA den Insulin-Signalweg durch eine Verminderung der Tyrosin-Phosphorylierung des IRS-2 und so die Weiterleitung des PI3K/Akt-Signalweg. Daraus resultiert eine anti-proliferative und pro-apoptische Wirkung von LPA in den β -Zellen.

Das Endothel stellt einen wesentlichen Regulator des Gefäßtonus dar, indem es relaxierende oder kontrahierende Faktoren freisetzt. Das vom Endothel freigesetzte NO spielt eine bedeutsame Rolle in der Regulation der vaskulären Homöostase durch die Vermittlung der Vasodilatation. Neben der Vasodilatation besitzt NO eine protektive Wirkung für das Gefäß gegen die Entstehung der Atherosklerose.

In dieser Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass LPA eine endothelabhängige Vasodilatation der vorkontrahierten Pulmonalarterien der Schweine über die Aktivierung der eNOS durch die Phosphorylierung an Ser 1177 mit nachfolgender NO-Produktion induziert. Ferner konnte gezeigt werden, dass die LPA-induzierte Vasodilatation der Pulmonalarterien der Schweine durch die LPA_{1/3}-Rezeptor-Antagonisten signifikant reduziert wird. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass LPA eine dosisabhängige Aktivierung der eNOS in primären humanen pulmonalarteriellen Endothelzellen HPAECs ausübt. Die Aktivierung von eNOS erfolgt über den Pertussistoxin-sensitiven LPA₃-Rezeptor-vermittelten Ca²⁺/CaMII-Weg, was wiederum zu einer Phosphorylierung an Ser1177 führt.

Außerdem konnte LPA eine Aktivierung der Akt induzieren, wodurch möglicherweise eine anti-apoptische Wirkung in den Endothelzellen eintreten kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde einerseits ein Zusammenhang zwischen LPA und der Entwicklung einer Insulinresistenz in pankreatischen β -Zellen nachgewiesen. Deshalb könnte hier ein mögliches pharmakologisches Ziel für die Behandlung einer durch Adipositas-induzierten Insulinresistenz vorliegen. Daneben führten die physiologisch relevanten LPA-Konzentrationen zu einer endothelabhängigen Vasodilatation. Somit könnte sich LPA zusätzlich als ein neuer therapeutischer Ansatzpunkt für die Verbesserung der Endothelfunktion hinsichtlich der Regulation des Blutdrucks und der Verhinderung der Progression atherosklerotischer Läsionen herausstellen.

5.2 Abstract

The pathogenesis of the type-2-diabetes mellitus underlying is characterized by a combination of peripheral insulin resistance, β -cell dysfunction and reduction in the β cell mass. Obesity, hypertension and dyslipidemia termed as metabolic, which is associated with the onset of insulin resistance and subsequent progression of T2DM. It has been proposed that increased plasma FFA levels, primarily palmitate and its metabolites such as ceramides, DAG and S1P, play a crucial role in the pathogenesis of T2D. The increasing of FFA level or their metabolites lead to inhibition of insulin signaling. Consequent, the ability of insulin is reduced and therefore lead to insulin resistance .

LPA is a lipid mediator that is associated with a progression of T2D. It has been suggested that LPA and the development of obesity are strongly related. Elevation of LPA plasma was associated with obesity and reduction of insulin sensitivity. In the present study it could be demonstrated that palmitate is converted to LPA in β -cells. Indeed, this study clearly indicates for the first time that LPA induced the insulin resistance in pancreatic beta cells. LPA could interfere with insulin signaling mediated regulation of β -cell homeostasis. LPA inhibits the insulin-mediated proliferation und cytoprotection of the pancreatic beta cell line MIN-6 with subsequent reduction of the β -cell mass. As a responsible pathway for LPA-mediated inhibition of insulin-elicited Akt phosphorylation by activation of PKC was identified. It has also been demonstrated that LPA is able to interrupt insulin signaling via stimulation of the LPA₃ receptor subtype, which is capable of inhibiting insulin receptor tyrosine kinase activity as inhibits insulin-mediated Akt phosphorylation and downstream signalling pathways. Consequently, proliferative and antiapoptotic effects of LPA in the β -cells could be observed.

The endothelium plays a crucial role in the regulation of the vascular tone through the release of relaxing or contracting factors. The release of endothelium-derived nitric oxide (NO) is recognized as a major regulator of vascular homeostasis through the mediation of endothelium-dependent vasodilation. In addition, NO has been shown to mediate a protective effect of the vasculature against the development of atherosclerosis.

In this work has also been shown that a LPA induced endothelium-dependent vasodilation of precontracted porcine pulmonary arteries via activation of eNOS mediated by Ser1177 eNOS phosphorylation and subsequent production of NO. In addition, it has been showed that LPA-induced vasodilatation of the porcine pulmonary arteries is significantly reduced by LPA_{1/3} receptor antagonist DGPP. Furthermore, it was demonstrated that LPA exerts a dose-dependent activation of eNOS in primary human pulmonary endothelial cells HPAECs. Moreover, the results this work indicate that LPA activates eNOS by LPA receptor-mediated by pertussis toxin-sensitive G protein pathway that involves activation of the Ca²⁺ /CaMII, leading in turn to eNOS phosphorylation at Ser1177. In addition, LPA could induce activation of Akt that could mediate the anti-apoptotic effect in the endothelial cells.

In the present work, we first showed that a relation between LPA and the development of insulin resistance in pancreatic β -cells was detected. Thus, LPA might be a pharmacological target for treatment of obesity-induced insulin resistance in β -cells. On the other hand, lead LPA at concentrations within the physiological range to endothelium-dependent vasodilation. Thus, LPA could prove to be a new therapeutic target for improving endothelial function that involving in the regulation of blood pressure as well as prevention of the progression of atherosclerotic lesions.

6 Abkürzungsverzeichnis

ACC	Acetyl-CoA-Carboxylase
AMPK	AMP-activated protein kinase
Ask 1	apoptosis-signal regulating kinase 1
ATF	activating transcription factor
ATP	Adenosintriphosphat
ATX	Autotaxin
Bcl2	B-Cell Lymphoma 2
Bcl-XL	B-Cell Lymphoma extra large
BSA	bovines Serumalbumin
BSN- Puffer	Bjerrum- Schafer- Nielsen Puffer
Ca ²⁺ /CaMKII	Ca ²⁺ /Calmodulin- abhängige Protein Kinase II
CDK	Cyclinabhängige Kinasen
CDKI	CDK- Inhibitoren
CHOP	C/EBP homologous protein
CPT-1	Carnitin-Palmitoyltransferase-1
CREB	cAMP response element-binding protein
DAF-2DA	4,5-Diaminofluoresceindiacetat
DAG	Diacylglycerol
db/db Mäuse	diabetische Mäuse
DDG	Deutschen Diabetesgesellschaft
DGK	Diacylglycerol-Kinase
DGPP	Diocylglycerolpyrophosphat
DMEM	Dulbecco's modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
eIF-4EBP	eukaryotischen Initiationsfaktor 4E bindende Protein
eIF-2 α	eukaryotic translation initiation factor-2 α
eNOS	endotheliale NO- Synthase
ENPP2	Ectonukleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 2

ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
ESI	Elektronensprayionisation
ET-1	Endothelin-1
FFA	Freie Fettsäure
FKS	Fötales Kälberserum
FoxO1	Forkhead-Box-Protein O1
G3P	Glycerol-3-Phosphat
G6pase	Glucose-6-Phosphatase
GH	Wachstumshormon
GIP	glucose-dependet insulintropic polypeptide
GLP-1	Glucagon-like-peptide 1
GPAT	Glycerophosphat-Acetyltransferase
GPCR	G- Proteingekoppelter Rezeptor
Grb-2	growth factor receptor-bound protein
GRB78	glucose-regulated-protein 78
GS	Glykogensynthese
GSIS	Glucose stimulierten Insulinsekretion
GSK-3	Glykogen-Synthase-Kinase 3
h	Stunden
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HFD	Hochfettdiät
hIAPP	human islet amyloid polypeptide
HRP	Meerrettichperoxidase
IAPs	inhibitor of apoptosis protein
IDF	International Diabetes Federation
IGF-1	Insulin-like Growth Factor-1
IKK	I κ B-Kinase
IL-1 β	Interleukin 1 β
iNOS	induzierbare NO Synthase
IR	Insulinrezeptor
IRE1	inositol requiring enzyme 1
IRS-1	Insulinrezeptorsubstrat 1
IRS-2	Insulinrezeptorsubstrat 2
JNK	C-Jun N-terminale Kinasen
LC-CoA	langkettiger Acyl-CoA

Abkürzungsverzeichnis

LDL	low density lipoprotein
L-NAME	N ω -Nitro-L-argininmethylesterhydrochlorid
LPA	Lysophosphatidsäure
LPAAT	LPA-Acyltransferase
LPC	Lysophosphatidylcholin
LPL	Lysophospholipide
LPP	Lipid-Phosphat-Phosphatase
MAG	Monoacylglycerol
MAPK	mitogen-activated protein kinase
Mcl-1	Induced myeloid leukemia cell differentiation protein
Mdm2	Mouse double minute 2 homolog
MEK	MAPK-Effektor-Kinase
MGK	Monoacylglycerolkinase
min	Minuten
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
MPP-2	Matrix-Metalloproteasen
mSOS	mammalian son of sevenless
Myc	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NFAT	nuclear factor of activated T-cell
NF κ -B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NZO-Maus	New Zealand Obese Maus
P70S6K	P70 ribosomale S6 Kinase
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PDGF	Platelet-derived growth factor
PBS	Phosphatpufferte Kochsalzlösung
PDK	PIP3- abhängige Kinase
PDX-1	Pancreatic duodenal homeobox 1
PEPCK	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
PERK	pancreatic ER-kinase
PH- Domäne	Pleckstrin Homologie Domäne
PHLPP	PH domain leucine- richrepeatphosphatase
PI3K	Phosphoinositid-3 Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate

PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PL	Phospholipid
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PP2A	Protein Phosphatase 2A
PPAR γ	peroxisome proliferator-activated receptor γ
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome 1
PTX	Pertussis
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RIPA- Puffer	Radioimmunoprecipitation assay buffer
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
S1P	Sphingosin-1 phosphat
SD	Standarddiät
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHIP	SH2-domain containing inositol-5'-phosphatase
SOCS	suppressor of cytokine signaling
SOD	Superoxiddismutase
SREBP-1c	Sterol regulatory element-binding protein 1c
T1DM	Typ 1 Diabetes Mellitus
T2DM	Typ 2 Diabetes Mellitus
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TdT	Terminale desoxynucleotidyltransferase
TEMED	Tetramethylenethyldiamin
TG	Triglycerid
TGF- β	Transforming growth factor β
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TRADD	Tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain
TRAF2	TNF-receptor associated factor 2
TRAIL	TNF-related apoptosis-including ligand

Abkürzungsverzeichnis

TRB3	Tribbles homolog 3
TSC	tuberous sclerosis complex
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
XBP-1	X-box binding protein-1
ZDF- Ratte	Zucker diabetic fatty Ratte

7 Literaturverzeichnis

- Aksamitiene, E., Kiyatkin, A., & Kholodenko, B. N. (2012). Cross-talk between mitogenic Ras/MAPK and survival PI3K/Akt pathways: a fine balance. *Biochem Soc Trans*, *40*(1), 139-146. doi: 10.1042/bst20110609
- Alejandro, E. U., & Johnson, J. D. (2008). Inhibition of Raf-1 alters multiple downstream pathways to induce pancreatic beta-cell apoptosis. *J Biol Chem*, *283*(4), 2407-2417. doi: 10.1074/jbc.M703612200
- Alejandro, E. U., Kalynyak, T. B., Taghizadeh, F., Gwiazda, K. S., Rawstron, E. K., Jacob, K. J., & Johnson, J. D. (2010). Acute insulin signaling in pancreatic beta-cells is mediated by multiple Raf-1 dependent pathways. *Endocrinology*, *151*(2), 502-512. doi: 10.1210/en.2009-0678
- Allagnat, F., Christulia, F., Ortis, F., Piro, P., Lortz, S., Lenzen, S., . . . Cardozo, A. K. (2010). Sustained production of spliced X-box binding protein 1 (XBP1) induces pancreatic beta cell dysfunction and apoptosis. *Diabetologia*, *53*(6), 1120-1130. doi: 10.1007/s00125-010-1699-7
- Amaral, M. E., Cunha, D. A., Anhe, G. F., Ueno, M., Carneiro, E. M., Velloso, L. A., . . . Boschero, A. C. (2004). Participation of prolactin receptors and phosphatidylinositol 3-kinase and MAP kinase pathways in the increase in pancreatic islet mass and sensitivity to glucose during pregnancy. *J Endocrinol*, *183*(3), 469-476. doi: 10.1677/joe.1.05547
- Anderson, H. D., Rahmutula, D., & Gardner, D. G. (2004). Tumor necrosis factor-alpha inhibits endothelial nitric-oxide synthase gene promoter activity in bovine aortic endothelial cells. *J Biol Chem*, *279*(2), 963-969. doi: 10.1074/jbc.M309552200
- Andrali, S. S., Sampley, M. L., Vanderford, N. L., & Ozcan, S. (2008). Glucose regulation of insulin gene expression in pancreatic beta-cells. *Biochem J*, *415*(1), 1-10. doi: 10.1042/bj20081029
- Aoki, J. (2004). Mechanisms of lysophosphatidic acid production. *Semin Cell Dev Biol*, *15*(5), 477-489. doi: 10.1016/j.semcdb.2004.05.001
- Araujo, T. G., Oliveira, A. G., & Saad, M. J. (2013). Insulin-resistance-associated compensatory mechanisms of pancreatic Beta cells: a current opinion. *Front Endocrinol (Lausanne)*, *4*, 146. doi: 10.3389/fendo.2013.00146
- Arriazu, R., Duran, E., Pozuelo, J. M., & Santamaria, L. (2013). Expression of lysophosphatidic acid receptor 1 and relation with cell proliferation, apoptosis, and angiogenesis on preneoplastic changes induced by cadmium chloride in the rat ventral prostate. *PLoS One*, *8*(2), e57742. doi: 10.1371/journal.pone.0057742
- Aspinwall, C. A., Qian, W. J., Roper, M. G., Kulkarni, R. N., Kahn, C. R., & Kennedy, R. T. (2000). Roles of insulin receptor substrate-1, phosphatidylinositol 3-kinase, and release of intracellular Ca²⁺ stores in insulin-stimulated insulin secretion in beta -cells. *J Biol Chem*, *275*(29), 22331-22338. doi: 10.1074/jbc.M909647199
- Assmann, A., Ueki, K., Winnay, J. N., Kadowaki, T., & Kulkarni, R. N. (2009). Glucose effects on beta-cell growth and survival require activation of insulin receptors and insulin receptor substrate 2. *Mol Cell Biol*, *29*(11), 3219-3228. doi: 10.1128/mcb.01489-08
- Auf, G., Jabouille, A., Delugin, M., Guerit, S., Pineau, R., North, S., . . . Moenner, M. (2013). High epiregulin expression in human U87 glioma cells relies on IRE1alpha and promotes autocrine growth through EGF receptor. *BMC Cancer*, *13*, 597. doi: 10.1186/1471-2407-13-597
- Baker, D. L., Desiderio, D. M., Miller, D. D., Tolley, B., & Tigyi, G. J. (2001). Direct quantitative analysis of lysophosphatidic acid molecular species by stable isotope dilution electrospray ionization liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem*, *292*(2), 287-295. doi: 10.1006/abio.2001.5063
- Balcazar, N., Sathyamurthy, A., Elghazi, L., Gould, A., Weiss, A., Shiojima, I., . . . Bernal-Mizrachi, E. (2009). mTORC1 activation regulates beta-cell mass and proliferation by modulation of cyclin D2 synthesis and stability. *J Biol Chem*, *284*(12), 7832-7842. doi: 10.1074/jbc.M807458200

- Balligand, J. L., Feron, O., & Dessy, C. (2009). eNOS activation by physical forces: from short-term regulation of contraction to chronic remodeling of cardiovascular tissues. *Physiol Rev*, *89*(2), 481-534. doi: 10.1152/physrev.00042.2007
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, *116*(2), 281-297.
- Basu, A., & Pal, D. (2010). Two faces of protein kinase Cdelta: the contrasting roles of PKCdelta in cell survival and cell death. *ScientificWorldJournal*, *10*, 2272-2284. doi: 10.1100/tsw.2010.214
- Beith, J. L., Alejandro, E. U., & Johnson, J. D. (2008). Insulin stimulates primary beta-cell proliferation via Raf-1 kinase. *Endocrinology*, *149*(5), 2251-2260. doi: 10.1210/en.2007-1557
- Bensellam, M., Laybutt, D. R., & Jonas, J. C. (2012). The molecular mechanisms of pancreatic beta-cell glucotoxicity: recent findings and future research directions. *Mol Cell Endocrinol*, *364*(1-2), 1-27. doi: 10.1016/j.mce.2012.08.003
- Bernal-Mizrachi, E., Kulkarni, R. N., Scott, D. K., Mauvais-Jarvis, F., Stewart, A. F., & Garcia-Ocana, A. (2014). Human beta-Cell Proliferation and Intracellular Signaling Part 2: Still Driving in the Dark Without a Road Map. *Diabetes*, *63*(3), 819-831. doi: 10.2337/db13-1146
- Bjerve, K. S., Daae, L. N., & Bremer, J. (1974). The selective loss of lysophospholipids in some commonly used lipid-extraction procedures. *Anal Biochem*, *58*(1), 238-245.
- Blandino-Rosano, M., Chen, A. Y., Scheys, J. O., Alejandro, E. U., Gould, A. P., Taranukha, T., . . . Bernal-Mizrachi, E. (2012). mTORC1 signaling and regulation of pancreatic beta-cell mass. *Cell Cycle*, *11*(10), 1892-1902. doi: 10.4161/cc.20036
- Blyth, N. J. (2012). Mechanisms and techniques of reprogramming: using PDX-1 homeobox protein as a novel treatment of insulin dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab Syndr*, *6*(2), 113-119. doi: 10.1016/j.dsx.2012.05.018
- Boden, G., & Shulman, G. I. (2002). Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. *Eur J Clin Invest*, *32 Suppl 3*, 14-23.
- Boslem, E., Meikle, P. J., & Biden, T. J. (2012). Roles of ceramide and sphingolipids in pancreatic beta-cell function and dysfunction. *Islets*, *4*(3), 177-187. doi: 10.4161/isl.20102
- Boucher, J., Quilliot, D., Praderes, J. P., Simon, M. F., Gres, S., Guigne, C., . . . Saulnier-Blache, J. S. (2005). Potential involvement of adipocyte insulin resistance in obesity-associated up-regulation of adipocyte lysophospholipase D/autotaxin expression. *Diabetologia*, *48*(3), 569-577. doi: 10.1007/s00125-004-1660-8
- Braut, S., Gobeil, F., Jr., Fortier, A., Honore, J. C., Joyal, J. S., Sapienza, P. S., . . . Chemtob, S. (2007). Lysophosphatidic acid induces endothelial cell death by modulating the redox environment. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, *292*(3), R1174-1183. doi: 10.1152/ajpregu.00619.2006
- Brazil, D. P., Yang, Z. Z., & Hemmings, B. A. (2004). Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends Biochem Sci*, *29*(5), 233-242. doi: 10.1016/j.tibs.2004.03.006
- Brelje, T. C., Stout, L. E., Bhagroo, N. V., & Sorenson, R. L. (2004). Distinctive roles for prolactin and growth hormone in the activation of signal transducer and activator of transcription 5 in pancreatic islets of langerhans. *Endocrinology*, *145*(9), 4162-4175. doi: 10.1210/en.2004-0201
- Brutman-Barazani, T., Horovitz-Fried, M., Aga-Mizrachi, S., Brand, C., Brodie, C., Rosa, J., & Sampson, S. R. (2012). Protein kinase Cdelta but not PKCalpha is involved in insulin-induced glucose metabolism in hepatocytes. *J Cell Biochem*, *113*(6), 2064-2076. doi: 10.1002/jcb.24078
- Buteau, J., Foisy, S., Joly, E., & Prentki, M. (2003). Glucagon-like peptide 1 induces pancreatic beta-cell proliferation via transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Diabetes*, *52*(1), 124-132.
- Buteau, J., Spatz, M. L., & Accili, D. (2006). Transcription factor FoxO1 mediates glucagon-like peptide-1 effects on pancreatic beta-cell mass. *Diabetes*, *55*(5), 1190-1196.

- Butler, A. E., Cao-Minh, L., Galasso, R., Rizza, R. A., Corradin, A., Cobelli, C., & Butler, P. C. (2010). Adaptive changes in pancreatic beta cell fractional area and beta cell turnover in human pregnancy. *Diabetologia*, *53*(10), 2167-2176. doi: 10.1007/s00125-010-1809-6
- Cao, Z. H., Yin, W. D., Zheng, Q. Y., Feng, S. L., Xu, G. L., & Zhang, K. Q. (2013). Caspase-3 is Involved in IFN-gamma- and TNF-alpha-Mediated MIN6 Cells Apoptosis via NF-kappaB/Bcl-2 Pathway. *Cell Biochem Biophys*. doi: 10.1007/s12013-013-9642-4
- Cardozo, A. K., Ortis, F., Storling, J., Feng, Y. M., Rasschaert, J., Tonnesen, M., . . . Eizirik, D. L. (2005). Cytokines downregulate the sarcoendoplasmic reticulum pump Ca²⁺ ATPase 2b and deplete endoplasmic reticulum Ca²⁺, leading to induction of endoplasmic reticulum stress in pancreatic beta-cells. *Diabetes*, *54*(2), 452-461.
- Chang-Chen, K. J., Mullur, R., & Bernal-Mizrachi, E. (2008). Beta-cell failure as a complication of diabetes. *Rev Endocr Metab Disord*, *9*(4), 329-343. doi: 10.1007/s11154-008-9101-5
- Chang, L., Chiang, S. H., & Saltiel, A. R. (2004). Insulin signaling and the regulation of glucose transport. *Mol Med*, *10*(7-12), 65-71. doi: 10.2119/2005-00029.Saltiel
- Chen, C., Ochoa, L. N., Kagan, A., Chai, H., Liang, Z., Lin, P. H., & Yao, Q. (2012). Lysophosphatidic acid causes endothelial dysfunction in porcine coronary arteries and human coronary artery endothelial cells. *Atherosclerosis*, *222*(1), 74-83. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2012.02.010
- Chen, H., Zhang, Z. W., Guo, Y., Wang, Y., Liu, Y., Luo, N., & Zhu, Y. (2012). The proliferative role of insulin and the mechanism underlying this action in human breast cancer cell line MCF-7. *J BUON*, *17*(4), 658-662.
- Chen, J., Han, Y., Zhu, W., Ma, R., Han, B., Cong, X., . . . Chen, X. (2006). Specific receptor subtype mediation of LPA-induced dual effects in cardiac fibroblasts. *FEBS Lett*, *580*(19), 4737-4745. doi: 10.1016/j.febslet.2006.07.061
- Chen, X., & Ruiz-Echevarria, M. J. (2013). TMEFF2 modulates the AKT and ERK signaling pathways. *Int J Biochem Mol Biol*, *4*(2), 83-94.
- Chen, Y., Ramakrishnan, D. P., & Ren, B. (2013). Regulation of angiogenesis by phospholipid lysophosphatidic acid. *Front Biosci (Landmark Ed)*, *18*, 852-861.
- Chien, H. Y., Lu, C. S., Chuang, K. H., Kao, P. H., & Wu, Y. L. (2015). Attenuation of LPS-induced cyclooxygenase-2 and inducible NO synthase expression by lysophosphatidic acid in macrophages. *Innate Immun*, *21*(6), 635-646. doi: 10.1177/1753425915576345
- Choe, S. S., Choi, A. H., Lee, J. W., Kim, K. H., Chung, J. J., Park, J., . . . Kim, J. B. (2007). Chronic activation of liver X receptor induces beta-cell apoptosis through hyperactivation of lipogenesis: liver X receptor-mediated lipotoxicity in pancreatic beta-cells. *Diabetes*, *56*(6), 1534-1543. doi: 10.2337/db06-1059
- Choi, J. W., & Chun, J. (2013). Lysophospholipids and their receptors in the central nervous system. *Biochim Biophys Acta*, *1831*(1), 20-32. doi: 10.1016/j.bbalip.2012.07.015
- Choi, J. W., Herr, D. R., Noguchi, K., Yung, Y. C., Lee, C. W., Mutoh, T., . . . Chun, J. (2010). LPA receptors: subtypes and biological actions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, *50*, 157-186. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.010909.105753
- Choi, J. W., Lee, C. W., & Chun, J. (2008). Biological roles of lysophospholipid receptors revealed by genetic null mice: an update. *Biochim Biophys Acta*, *1781*(9), 531-539. doi: 10.1016/j.bbalip.2008.03.004
- Choi, S. E., Kim, H. E., Shin, H. C., Jang, H. J., Lee, K. W., Kim, Y., . . . Kang, Y. (2007). Involvement of Ca²⁺-mediated apoptotic signals in palmitate-induced MIN6N8a beta cell death. *Mol Cell Endocrinol*, *272*(1-2), 50-62. doi: 10.1016/j.mce.2007.04.004
- Chua, C. C., Hamdy, R. C., & Chua, B. H. (1998). Upregulation of endothelin-1 production by lysophosphatidic acid in rat aortic endothelial cells. *Biochim Biophys Acta*, *1405*(1-3), 29-34.
- Conejo, R., & Lorenzo, M. (2001). Insulin signaling leading to proliferation, survival, and membrane ruffling in C2C12 myoblasts. *J Cell Physiol*, *187*(1), 96-108. doi: 10.1002/1097-4652(2001)9999:9999<:aid-jcp1058>3.0.co;2-v
- Coticchia, C. M., Revankar, C. M., Deb, T. B., Dickson, R. B., & Johnson, M. D. (2009). Calmodulin modulates Akt activity in human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat*, *115*(3), 545-560. doi: 10.1007/s10549-008-0097-z

- Cui, M. Z. (2011). Lysophosphatidic acid effects on atherosclerosis and thrombosis. *Clin Lipidol*, 6(4), 413-426. doi: 10.2217/clp.11.38
- Cunha, D. A., Hekerman, P., Ladriere, L., Bazarra-Castro, A., Ortis, F., Wakeham, M. C., . . . Cnop, M. (2008). Initiation and execution of lipotoxic ER stress in pancreatic beta-cells. *J Cell Sci*, 121(Pt 14), 2308-2318. doi: 10.1242/jcs.026062
- Cunnick, J. M., Dorsey, J. F., Standley, T., Turkson, J., Kraker, A. J., Fry, D. W., . . . Wu, J. (1998). Role of tyrosine kinase activity of epidermal growth factor receptor in the lysophosphatidic acid-stimulated mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem*, 273(23), 14468-14475.
- Cusi, K. (2010). The role of adipose tissue and lipotoxicity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Curr Diab Rep*, 10(4), 306-315. doi: 10.1007/s11892-010-0122-6
- De Palma, C., Meacci, E., Perrotta, C., Bruni, P., & Clementi, E. (2006). Endothelial nitric oxide synthase activation by tumor necrosis factor alpha through neutral sphingomyelinase 2, sphingosine kinase 1, and sphingosine 1 phosphate receptors: a novel pathway relevant to the pathophysiology of endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26(1), 99-105. doi: 10.1161/01.atv.0000194074.59584.42
- Deanfield, J. E., Halcox, J. P., & Rabelink, T. J. (2007). Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation*, 115(10), 1285-1295. doi: 10.1161/circulationaha.106.652859
- Derewenda, U., Derewenda, Z., Dodson, G. G., Hubbard, R. E., & Korber, F. (1989). Molecular structure of insulin: the insulin monomer and its assembly. *Br Med Bull*, 45(1), 4-18.
- Devesa, P., Agasse, F., Xapelli, S., Almenglo, C., Devesa, J., Malva, J. O., & Arce, V. M. (2014). Growth hormone pathways signaling for cell proliferation and survival in hippocampal neural precursors from postnatal mice. *BMC Neurosci*, 15(1), 100. doi: 10.1186/1471-2202-15-100
- Dickson, L. M., Lingohr, M. K., McCuaig, J., Hugl, S. R., Snow, L., Kahn, B. B., . . . Rhodes, C. J. (2001). Differential activation of protein kinase B and p70(S6)K by glucose and insulin-like growth factor 1 in pancreatic beta-cells (INS-1). *J Biol Chem*, 276(24), 21110-21120. doi: 10.1074/jbc.M101257200
- Dickson, L. M., & Rhodes, C. J. (2004). Pancreatic beta-cell growth and survival in the onset of type 2 diabetes: a role for protein kinase B in the Akt? *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 287(2), E192-198. doi: 10.1152/ajpendo.00031.2004
- Diehl, J. A., Cheng, M., Roussel, M. F., & Sherr, C. J. (1998). Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev*, 12(22), 3499-3511.
- Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R., & Zeiher, A. M. (1999). Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*, 399(6736), 601-605. doi: 10.1038/21224
- Dong, Y., Hirane, M., Araki, M., Fukushima, N., & Tsujiuchi, T. (2014). Lysophosphatidic acid receptor-5 negatively regulates cellular responses in mouse fibroblast 3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.03.016
- Dudzinski, D. M., & Michel, T. (2007). Life history of eNOS: partners and pathways. *Cardiovasc Res*, 75(2), 247-260. doi: 10.1016/j.cardiores.2007.03.023
- Dunlop, M., Muggli, E., & Clark, S. (1996). Association of cyclin-dependent kinase-4 and cyclin D1 in neonatal beta cells after mitogenic stimulation by lysophosphatidic acid. *Biochem Biophys Res Commun*, 218(1), 132-136. doi: 10.1006/bbrc.1996.0023
- Dusaulcy, R., Rancoule, C., Gres, S., Wanecq, E., Colom, A., Guigne, C., . . . Saulnier-Blache, J. S. (2011). Adipose-specific disruption of autotaxin enhances nutritional fattening and reduces plasma lysophosphatidic acid. *J Lipid Res*, 52(6), 1247-1255. doi: 10.1194/jlr.M014985
- Eitel, K., Staiger, H., Brendel, M. D., Brandhorst, D., Bretzel, R. G., Haring, H. U., & Kellerer, M. (2002). Different role of saturated and unsaturated fatty acids in beta-cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 299(5), 853-856.
- Eitel, K., Staiger, H., Rieger, J., Mischak, H., Brandhorst, H., Brendel, M. D., . . . Kellerer, M. (2003). Protein kinase C delta activation and translocation to the nucleus are required for fatty acid-induced apoptosis of insulin-secreting cells. *Diabetes*, 52(4), 991-997.

- Eizirik, D. L., Cardozo, A. K., & Cnop, M. (2008). The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Endocr Rev*, 29(1), 42-61. doi: 10.1210/er.2007-0015
- El-Assaad, W., Buteau, J., Peyot, M. L., Nolan, C., Roduit, R., Hardy, S., . . . Prentki, M. (2003). Saturated fatty acids synergize with elevated glucose to cause pancreatic beta-cell death. *Endocrinology*, 144(9), 4154-4163. doi: 10.1210/en.2003-0410
- El-Assaad, W., Joly, E., Barbeau, A., Sladek, R., Buteau, J., Maestre, I., . . . Prentki, M. (2010). Glucolipotoxicity alters lipid partitioning and causes mitochondrial dysfunction, cholesterol, and ceramide deposition and reactive oxygen species production in INS832/13 ss-cells. *Endocrinology*, 151(7), 3061-3073. doi: 10.1210/en.2009-1238
- El-Azzouny, M., Evans, C. R., Treutelaar, M. K., Kennedy, R. T., & Burant, C. F. (2014). Increased glucose metabolism and glycerolipid formation by fatty acids and GPR40 receptor signaling underlies the fatty acid potentiation of insulin secretion. *J Biol Chem*, 289(19), 13575-13588. doi: 10.1074/jbc.M113.531970
- El-Haibi, C. P., Singh, R., Sharma, P. K., Singh, S., & Lillard, J. W., Jr. (2011). CXCL13 mediates prostate cancer cell proliferation through JNK signalling and invasion through ERK activation. *Cell Prolif*, 44(4), 311-319. doi: 10.1111/j.1365-2184.2011.00757.x
- Elghazi, L., Balcazar, N., & Bernal-Mizrachi, E. (2006). Emerging role of protein kinase B/Akt signaling in pancreatic beta-cell mass and function. *Int J Biochem Cell Biol*, 38(2), 157-163. doi: 10.1016/j.biocel.2005.08.017
- Elghazi, L., Balcazar, N., Blandino-Rosano, M., Cras-Meneur, C., Fatrai, S., Gould, A. P., . . . Bernal-Mizrachi, E. (2010). Decreased IRS signaling impairs beta-cell cycle progression and survival in transgenic mice overexpressing S6K in beta-cells. *Diabetes*, 59(10), 2390-2399. doi: 10.2337/db09-0851
- Elghazi, L., Rachdi, L., Weiss, A. J., Cras-Meneur, C., & Bernal-Mizrachi, E. (2007). Regulation of beta-cell mass and function by the Akt/protein kinase B signalling pathway. *Diabetes Obes Metab*, 9 Suppl 2, 147-157. doi: 10.1111/j.1463-1326.2007.00783.x
- Feletou, M., & Vanhoutte, P. M. (2006). Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 291(3), H985-1002. doi: 10.1152/ajpheart.00292.2006
- Feron, O., Saldana, F., Michel, J. B., & Michel, T. (1998). The endothelial nitric-oxide synthase-caveolin regulatory cycle. *J Biol Chem*, 273(6), 3125-3128.
- Ferry, G., Tellier, E., Try, A., Gres, S., Naime, I., Simon, M. F., . . . Saulnier-Blache, J. S. (2003). Autotaxin is released from adipocytes, catalyzes lysophosphatidic acid synthesis, and activates preadipocyte proliferation. Up-regulated expression with adipocyte differentiation and obesity. *J Biol Chem*, 278(20), 18162-18169. doi: 10.1074/jbc.M301158200
- Fleming, I., & Busse, R. (1999). Signal transduction of eNOS activation. *Cardiovasc Res*, 43(3), 532-541.
- Fleming, I., & Busse, R. (2003). Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 284(1), R1-12. doi: 10.1152/ajpregu.00323.2002
- Fleming, I., Fisslthaler, B., Dimmeler, S., Kemp, B. E., & Busse, R. (2001). Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circ Res*, 88(11), E68-75.
- Förstermann, U. (2010). Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflugers Arch*, 459(6), 923-939. doi: 10.1007/s00424-010-0808-2
- Förstermann, U., Closs, E. I., Pollock, J. S., Nakane, M., Schwarz, P., Gath, I., & Kleinert, H. (1994). Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension*, 23(6 Pt 2), 1121-1131.
- Förstermann, U., & Sessa, W. C. (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*, 33(7), 829-837, 837a-837d. doi: 10.1093/eurheartj/ehr304
- Foster, D. A. (2007). Regulation of mTOR by phosphatidic acid? *Cancer Res*, 67(1), 1-4. doi: 10.1158/0008-5472.can-06-3016

- Foufelle, F., & Ferre, P. (2002). New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c. *Biochem J*, 366(Pt 2), 377-391. doi: 10.1042/bj20020430
- Fox, T. E., Houck, K. L., O'Neill, S. M., Nagarajan, M., Stover, T. C., Pomianowski, P. T., . . . Kester, M. (2007). Ceramide recruits and activates protein kinase C zeta (PKC zeta) within structured membrane microdomains. *J Biol Chem*, 282(17), 12450-12457. doi: 10.1074/jbc.M700082200
- Fransson, L., Rosengren, V., Saha, T. K., Grankvist, N., Islam, T., Honkanen, R. E., . . . Orsater, H. (2014). Mitogen-activated protein kinases and protein phosphatase 5 mediate glucocorticoid-induced cytotoxicity in pancreatic islets and beta-cells. *Mol Cell Endocrinol*, 383(1-2), 126-136. doi: 10.1016/j.mce.2013.12.010
- Friedrichsen, B. N., Neubauer, N., Lee, Y. C., Gram, V. K., Blume, N., Petersen, J. S., . . . Moldrup, A. (2006). Stimulation of pancreatic beta-cell replication by incretins involves transcriptional induction of cyclin D1 via multiple signalling pathways. *J Endocrinol*, 188(3), 481-492. doi: 10.1677/joe.1.06160
- Fritsche, L., Neukamm, S. S., Lehmann, R., Kremmer, E., Hennige, A. M., Hunder-Gugel, A., . . . Weigert, C. (2011). Insulin-induced serine phosphorylation of IRS-2 via ERK1/2 and mTOR: studies on the function of Ser675 and Ser907. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 300(5), E824-836. doi: 10.1152/ajpendo.00409.2010
- Fukui, R., Tanabe, E., Kitayoshi, M., Yoshikawa, K., Fukushima, N., & Tsujiuchi, T. (2012). Negative regulation of cell motile and invasive activities by lysophosphatidic acid receptor-3 in colon cancer HCT116 cells. *Tumour Biol*, 33(6), 1899-1905. doi: 10.1007/s13277-012-0450-z
- Funke, M., Zhao, Z., Xu, Y., Chun, J., & Tager, A. M. (2012). The lysophosphatidic acid receptor LPA1 promotes epithelial cell apoptosis after lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 46(3), 355-364. doi: 10.1165/rcmb.2010-0155OC
- Furchgott, R. F., & Zawadzki, J. V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288(5789), 373-376.
- Galbo, T., Olsen, G. S., Quistorff, B., & Nishimura, E. (2011). Free fatty acid-induced PP2A hyperactivity selectively impairs hepatic insulin action on glucose metabolism. *PLoS One*, 6(11), e27424. doi: 10.1371/journal.pone.0027424
- Gartsbein, M., Alt, A., Hashimoto, K., Nakajima, K., Kuroki, T., & Tennenbaum, T. (2006). The role of protein kinase C delta activation and STAT3 Ser727 phosphorylation in insulin-induced keratinocyte proliferation. *J Cell Sci*, 119(Pt 3), 470-481. doi: 10.1242/jcs.02744
- Gesta, S., Simon, M. F., Rey, A., Sibrac, D., Girard, A., Lafontan, M., . . . Saulnier-Blache, J. S. (2002). Secretion of a lysophospholipase D activity by adipocytes: involvement in lysophosphatidic acid synthesis. *J Lipid Res*, 43(6), 904-910.
- Glauser, D. A., & Schlegel, W. (2007). The emerging role of FOXO transcription factors in pancreatic beta cells. *J Endocrinol*, 193(2), 195-207. doi: 10.1677/joe-06-0191
- Goldsmith, Z. G., Ha, J. H., Jayaraman, M., & Dhanasekaran, D. N. (2011). Lysophosphatidic Acid Stimulates the Proliferation of Ovarian Cancer Cells via the gep Proto-Oncogene Galpha(12). *Genes Cancer*, 2(5), 563-575. doi: 10.1177/1947601911419362
- Gomel, R., Xiang, C., Finniss, S., Lee, H. K., Lu, W., Okhrimenko, H., & Brodie, C. (2007). The localization of protein kinase Cdelta in different subcellular sites affects its proapoptotic and antiapoptotic functions and the activation of distinct downstream signaling pathways. *Mol Cancer Res*, 5(6), 627-639. doi: 10.1158/1541-7786.mcr-06-0255
- Grover-Paez, F., & Zavalza-Gomez, A. B. (2009). Endothelial dysfunction and cardiovascular risk factors. *Diabetes Res Clin Pract*, 84(1), 1-10. doi: 10.1016/j.diabres.2008.12.013
- Gschwendt, M., Muller, H. J., Kielbassa, K., Zang, R., Kittstein, W., Rincke, G., & Marks, F. (1994). Rottlerin, a novel protein kinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun*, 199(1), 93-98. doi: 10.1006/bbrc.1994.1199
- Hagiwara, A., Cornu, M., Cybulski, N., Polak, P., Betz, C., Trapani, F., . . . Hall, M. N. (2012). Hepatic mTORC2 activates glycolysis and lipogenesis through Akt, glucokinase, and SREBP1c. *Cell Metab*, 15(5), 725-738. doi: 10.1016/j.cmet.2012.03.015
- Hama, K., & Aoki, J. (2010). LPA(3), a unique G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid. *Prog Lipid Res*, 49(4), 335-342. doi: 10.1016/j.plipres.2010.03.001

- Han, M. S., Lim, Y. M., Quan, W., Kim, J. R., Chung, K. W., Kang, M., . . . Lee, M. S. (2011). Lysophosphatidylcholine as an effector of fatty acid-induced insulin resistance. *J Lipid Res*, 52(6), 1234-1246. doi: 10.1194/jlr.M014787
- Harris, T. E., Persaud, S. J., & Jones, P. M. (1996). Atypical isoforms of pKc and insulin secretion from pancreatic beta-cells: evidence using Go 6976 and Ro 31-8220 as Pkc inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun*, 227(3), 672-676. doi: 10.1006/bbrc.1996.1567
- Heit, J. J., Apelqvist, A. A., Gu, X., Winslow, M. M., Neilson, J. R., Crabtree, G. R., & Kim, S. K. (2006). Calcineurin/NFAT signalling regulates pancreatic beta-cell growth and function. *Nature*, 443(7109), 345-349. doi: 10.1038/nature05097
- Hennige, A. M., Burks, D. J., Ozcan, U., Kulkarni, R. N., Ye, J., Park, S., . . . White, M. F. (2003). Upregulation of insulin receptor substrate-2 in pancreatic beta cells prevents diabetes. *J Clin Invest*, 112(10), 1521-1532. doi: 10.1172/jci18581
- Hennige, A. M., Fritsche, A., Strack, V., Weigert, C., Mischak, H., Borboni, P., . . . Kellerer, M. (2002). PKC zeta enhances insulin-like growth factor 1-dependent mitogenic activity in the rat clonal beta cell line RIN 1046-38. *Biochem Biophys Res Commun*, 290(1), 85-90. doi: 10.1006/bbrc.2001.6144
- Hennige, A. M., Ranta, F., Heinzelmann, I., Dufer, M., Michael, D., Braumuller, H., . . . Ullrich, S. (2010). Overexpression of kinase-negative protein kinase Cdelta in pancreatic beta-cells protects mice from diet-induced glucose intolerance and beta-cell dysfunction. *Diabetes*, 59(1), 119-127. doi: 10.2337/db09-0512
- Herrera, M. D., Mingorance, C., Rodriguez-Rodriguez, R., & Alvarez de Sotomayor, M. (2010). Endothelial dysfunction and aging: an update. *Ageing Res Rev*, 9(2), 142-152. doi: 10.1016/j.arr.2009.07.002
- Hirosumi, J., Tuncman, G., Chang, L., Gorgun, C. Z., Uysal, K. T., Maeda, K., . . . Hotamisligil, G. S. (2002). A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*, 420(6913), 333-336. doi: 10.1038/nature01137
- Holmstrom, T. E., Mattsson, C. L., Wang, Y., Iakovleva, I., Petrovic, N., & Nedergaard, J. (2010). Non-transactivational, dual pathways for LPA-induced Erk1/2 activation in primary cultures of brown pre-adipocytes. *Exp Cell Res*, 316(16), 2664-2675. doi: 10.1016/j.yexcr.2010.05.029
- Horovitz-Fried, M., Cooper, D. R., Patel, N. A., Cipok, M., Brand, C., Bak, A., . . . Sampson, S. R. (2006). Insulin rapidly upregulates protein kinase Cdelta gene expression in skeletal muscle. *Cell Signal*, 18(2), 183-193. doi: 10.1016/j.cellsig.2005.04.004
- Hou, N., Torii, S., Saito, N., Hosaka, M., & Takeuchi, T. (2008). Reactive oxygen species-mediated pancreatic beta-cell death is regulated by interactions between stress-activated protein kinases, p38 and c-Jun N-terminal kinase, and mitogen-activated protein kinase phosphatases. *Endocrinology*, 149(4), 1654-1665. doi: 10.1210/en.2007-0988
- Hu, X., Haney, N., Kropp, D., Kabore, A. F., Johnston, J. B., & Gibson, S. B. (2005). Lysophosphatidic acid (LPA) protects primary chronic lymphocytic leukemia cells from apoptosis through LPA receptor activation of the anti-apoptotic protein AKT/PKB. *J Biol Chem*, 280(10), 9498-9508. doi: 10.1074/jbc.M410455200
- Hu, Y. L., Tee, M. K., Goetzl, E. J., Auersperg, N., Mills, G. B., Ferrara, N., & Jaffe, R. B. (2001). Lysophosphatidic acid induction of vascular endothelial growth factor expression in human ovarian cancer cells. *J Natl Cancer Inst*, 93(10), 762-768.
- Huang, C. J., Lin, C. Y., Haataja, L., Gurlo, T., Butler, A. E., Rizza, R. A., & Butler, P. C. (2007). High expression rates of human islet amyloid polypeptide induce endoplasmic reticulum stress mediated beta-cell apoptosis, a characteristic of humans with type 2 but not type 1 diabetes. *Diabetes*, 56(8), 2016-2027. doi: 10.2337/db07-0197
- Huang, H., & Tindall, D. J. (2007). Dynamic FoxO transcription factors. *J Cell Sci*, 120(Pt 15), 2479-2487. doi: 10.1242/jcs.001222
- Ikeda, H., Yatomi, Y., Yanase, M., Satoh, H., Nishihara, A., Kawabata, M., & Fujiwara, K. (1998). Effects of lysophosphatidic acid on proliferation of stellate cells and hepatocytes in culture. *Biochem Biophys Res Commun*, 248(2), 436-440. doi: 10.1006/bbrc.1998.8983
- Iyoda, T., Zhang, F., Sun, L., Hao, F., Schmitz-Peiffer, C., Xu, X., & Cui, M. Z. (2012). Lysophosphatidic acid induces early growth response-1 (Egr-1) protein expression via protein

- kinase Cdelta-regulated extracellular signal-regulated kinase (ERK) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) activation in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 287(27), 22635-22642. doi: 10.1074/jbc.M111.335695
- Jaafar, R., De Larichaudy, J., Chanon, S., Euthine, V., Durand, C., Naro, F., . . . Nemoz, G. (2013). Phospholipase D regulates the size of skeletal muscle cells through the activation of mTOR signaling. *Cell Commun Signal*, 11, 55. doi: 10.1186/1478-811x-11-55
- Jacob, A. I., Horovitz-Fried, M., Aga-Mizrachi, S., Brutman-Barazani, T., Okhrimenko, H., Zick, Y., . . . Sampson, S. R. (2010). The regulatory domain of protein kinase C delta positively regulates insulin receptor signaling. *J Mol Endocrinol*, 44(3), 155-169. doi: 10.1677/jme-09-0119
- Japtok, L., Schmitz, E. I., Fayyaz, S., Kramer, S., Hsu, L. J., & Kleuser, B. (2015). Sphingosine 1-phosphate counteracts insulin signaling in pancreatic beta-cells via the sphingosine 1-phosphate receptor subtype 2. *FASEB J*, 29(8), 3357-3369. doi: 10.1096/fj.14-263194
- Jeong, K. J., Park, S. Y., Cho, K. H., Sohn, J. S., Lee, J., Kim, Y. K., . . . Lee, H. Y. (2012). The Rho/ROCK pathway for lysophosphatidic acid-induced proteolytic enzyme expression and ovarian cancer cell invasion. *Oncogene*, 31(39), 4279-4289. doi: 10.1038/onc.2011.595
- Jhala, U. S., Canettieri, G., Screaton, R. A., Kulkarni, R. N., Krajewski, S., Reed, J., . . . Montminy, M. (2003). cAMP promotes pancreatic beta-cell survival via CREB-mediated induction of IRS2. *Genes Dev*, 17(13), 1575-1580. doi: 10.1101/gad.1097103
- Jiang, J. H., Ge, G., Gao, K., Pang, Y., Chai, R. C., Jia, X. H., . . . Yu, A. C. (2015). Calcium Signaling Involvement in Cadmium-Induced Astrocyte Cytotoxicity and Cell Death Through Activation of MAPK and PI3K/Akt Signaling Pathways. *Neurochem Res*, 40(9), 1929-1944. doi: 10.1007/s11064-015-1686-y
- Johnson, J. D., Ahmed, N. T., Luciani, D. S., Han, Z., Tran, H., Fujita, J., . . . Polonsky, K. S. (2003). Increased islet apoptosis in Pdx1^{+/-} mice. *J Clin Invest*, 111(8), 1147-1160. doi: 10.1172/jci16537
- Johnson, J. D., Bernal-Mizrachi, E., Alejandro, E. U., Han, Z., Kalynyak, T. B., Li, H., . . . Polonsky, K. S. (2006). Insulin protects islets from apoptosis via Pdx1 and specific changes in the human islet proteome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(51), 19575-19580. doi: 10.1073/pnas.0604208103
- Jones, P. M., Persaud, S. J., & Howell, S. L. (1991). Protein kinase C and the regulation of insulin secretion from pancreatic B cells. *J Mol Endocrinol*, 6(2), 121-127.
- Kahn, S. E. (2003). The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia*, 46(1), 3-19. doi: 10.1007/s00125-002-1009-0
- Kam, Y., & Exton, J. H. (2004). Role of phospholipase D1 in the regulation of mTOR activity by lysophosphatidic acid. *FASEB J*, 18(2), 311-319. doi: 10.1096/fj.03-0731com
- Kaneto, H., Matsuoka, T. A., Nakatani, Y., Kawamori, D., Miyatsuka, T., Matsuhisa, M., & Yamasaki, Y. (2005). Oxidative stress, ER stress, and the JNK pathway in type 2 diabetes. *J Mol Med (Berl)*, 83(6), 429-439. doi: 10.1007/s00109-005-0640-x
- Karasawa, H., Nagata-Goto, S., Takaishi, K., & Kumagae, Y. (2009). A novel model of type 2 diabetes mellitus based on obesity induced by high-fat diet in BDF1 mice. *Metabolism*, 58(3), 296-303. doi: 10.1016/j.metabol.2008.09.028
- Kasuga, M. (2006). Insulin resistance and pancreatic beta cell failure. *J Clin Invest*, 116(7), 1756-1760. doi: 10.1172/jci29189
- Kawamori, D., Kaneto, H., Nakatani, Y., Matsuoka, T. A., Matsuhisa, M., Hori, M., & Yamasaki, Y. (2006). The forkhead transcription factor Foxo1 bridges the JNK pathway and the transcription factor PDX-1 through its intracellular translocation. *J Biol Chem*, 281(2), 1091-1098. doi: 10.1074/jbc.M508510200
- Keller, S. R., & Lienhard, G. E. (1994). Insulin signalling: the role of insulin receptor substrate 1. *Trends Cell Biol*, 4(4), 115-119.
- Kido, Y., Nakae, J., & Accili, D. (2001). Clinical review 125: The insulin receptor and its cellular targets. *J Clin Endocrinol Metab*, 86(3), 972-979. doi: 10.1210/jcem.86.3.7306

- Kim, D. S., Park, S. H., Kim, S. E., Kwon, S. B., Park, E. S., Youn, S. W., & Park, K. C. (2003). Lysophosphatidic acid inhibits melanocyte proliferation via cell cycle arrest. *Arch Pharm Res*, 26(12), 1055-1060.
- Kim, M. J., Lee, Y. S., Lee, K. H., Min, D. S., Yoon, S. H., Hahn, S. J., . . . Jo, Y. H. (2001). Site-specific localization of protein kinase C isoforms in rat pancreas. *Pancreatology*, 1(1), 36-42. doi: 10.1159/000055790
- Kim, M. K., Lee, H. Y., Park, K. S., Shin, E. H., Jo, S. H., Yun, J., . . . Bae, Y. S. (2005). Lysophosphatidic acid stimulates cell proliferation in rat chondrocytes. *Biochem Pharmacol*, 70(12), 1764-1771. doi: 10.1016/j.bcp.2005.09.015
- Kitamura, T., Nakae, J., Kitamura, Y., Kido, Y., Biggs, W. H., 3rd, Wright, C. V., . . . Accili, D. (2002). The forkhead transcription factor Foxo1 links insulin signaling to Pdx1 regulation of pancreatic beta cell growth. *J Clin Invest*, 110(12), 1839-1847. doi: 10.1172/jci16857
- Kitayoshi, M., Fukui, R., Tanabe, E., Kato, K., Yoshikawa, K., Fukushima, N., & Tsujiuchi, T. (2012). Different effects on cell proliferation and migration abilities of endothelial cells by LPA(1) and LPA(3) in mammary tumor FM3A cells. *J Recept Signal Transduct Res*, 32(4), 209-213. doi: 10.3109/10799893.2012.692121
- Kojima, H., Nakatsubo, N., Kikuchi, K., Kawahara, S., Kirino, Y., Nagoshi, H., . . . Nagano, T. (1998). Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Anal Chem*, 70(13), 2446-2453.
- Kops, G. J., Medema, R. H., Glassford, J., Essers, M. A., Dijkers, P. F., Coffey, P. J., . . . Burgering, B. M. (2002). Control of cell cycle exit and entry by protein kinase B-regulated forkhead transcription factors. *Mol Cell Biol*, 22(7), 2025-2036.
- Kou, R., Igarashi, J., & Michel, T. (2002). Lysophosphatidic acid and receptor-mediated activation of endothelial nitric-oxide synthase. *Biochemistry*, 41(15), 4982-4988.
- Kowluru, A., & Matti, A. (2012). Hyperactivation of protein phosphatase 2A in models of glucolipotoxicity and diabetes: potential mechanisms and functional consequences. *Biochem Pharmacol*, 84(5), 591-597. doi: 10.1016/j.bcp.2012.05.003
- Kwon, Y. J., Sun, Y., Kim, N. H., & Huh, S. O. (2009). Phosphorylation of CREB, a cyclic AMP responsive element binding protein, contributes partially to lysophosphatidic acid-induced fibroblast cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun*, 380(3), 655-659. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.01.159
- Lam, E. W., Francis, R. E., & Petkovic, M. (2006). FOXO transcription factors: key regulators of cell fate. *Biochem Soc Trans*, 34(Pt 5), 722-726. doi: 10.1042/bst0340722
- Lang, F., Ullrich, S., & Gulbins, E. (2011). Ceramide formation as a target in beta-cell survival and function. *Expert Opin Ther Targets*, 15(9), 1061-1071. doi: 10.1517/14728222.2011.588209
- Langeveld, M., & Aerts, J. M. (2009). Glycosphingolipids and insulin resistance. *Prog Lipid Res*, 48(3-4), 196-205. doi: 10.1016/j.plipres.2009.03.002
- Lapierre, D. M., Tanabe, N., Pereverzev, A., Spencer, M., Shugg, R. P., Dixon, S. J., & Sims, S. M. (2010). Lysophosphatidic acid signals through multiple receptors in osteoclasts to elevate cytosolic calcium concentration, evoke retraction, and promote cell survival. *J Biol Chem*, 285(33), 25792-25801. doi: 10.1074/jbc.M110.109322
- Lawlor, M. A., & Alessi, D. R. (2001). PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J Cell Sci*, 114(Pt 16), 2903-2910.
- Laybutt, D. R., Preston, A. M., Akerfeldt, M. C., Kench, J. G., Busch, A. K., Biankin, A. V., & Biden, T. J. (2007). Endoplasmic reticulum stress contributes to beta cell apoptosis in type 2 diabetes. *Diabetologia*, 50(4), 752-763. doi: 10.1007/s00125-006-0590-z
- Laychock, S. G., Tian, Y., & Sessanna, S. M. (2003). Endothelial differentiation gene receptors in pancreatic islets and INS-1 cells. *Diabetes*, 52(8), 1986-1993.
- Leahy, J. L. (2005). Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Arch Med Res*, 36(3), 197-209. doi: 10.1016/j.arcmed.2005.01.003
- Lee, Y., Hirose, H., Zhou, Y. T., Esser, V., McGarry, J. D., & Unger, R. H. (1997). Increased lipogenic capacity of the islets of obese rats: a role in the pathogenesis of NIDDM. *Diabetes*, 46(3), 408-413.

- Leffler, M., Hrach, T., Stuerzl, M., Horch, R. E., Herndon, D. N., & Jeschke, M. G. (2007). Insulin attenuates apoptosis and exerts anti-inflammatory effects in endotoxemic human macrophages. *J Surg Res*, *143*(2), 398-406. doi: 10.1016/j.jss.2007.01.030
- Leibiger, I. B., Leibiger, B., & Berggren, P. O. (2008). Insulin signaling in the pancreatic beta-cell. *Annu Rev Nutr*, *28*, 233-251. doi: 10.1146/annurev.nutr.28.061807.155530
- Leibiger, I. B., Leibiger, B., Moede, T., & Berggren, P. O. (1998). Exocytosis of insulin promotes insulin gene transcription via the insulin receptor/PI-3 kinase/p70 s6 kinase and CaM kinase pathways. *Mol Cell*, *1*(6), 933-938.
- Li, H., Wang, D., Zhang, H., Kirmani, K., Zhao, Z., Steinmetz, R., & Xu, Y. (2009). Lysophosphatidic acid stimulates cell migration, invasion, and colony formation as well as tumorigenesis/metastasis of mouse ovarian cancer in immunocompetent mice. *Mol Cancer Ther*, *8*(6), 1692-1701. doi: 10.1158/1535-7163.mct-08-1106
- Li, J., Lee, B., & Lee, A. S. (2006). Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) and NOXA by p53. *J Biol Chem*, *281*(11), 7260-7270. doi: 10.1074/jbc.M509868200
- Li, L. O., Klett, E. L., & Coleman, R. A. (2010). Acyl-CoA synthesis, lipid metabolism and lipotoxicity. *Biochim Biophys Acta*, *1801*(3), 246-251. doi: 10.1016/j.bbailip.2009.09.024
- Li, L., Tam, L., Liu, L., Jin, T., & Ng, D. S. (2011). Wnt-signaling mediates the anti-adipogenic action of lysophosphatidic acid through cross talking with the Rho/Rho associated kinase (ROCK) pathway. *Biochem Cell Biol*, *89*(6), 515-521. doi: 10.1139/o11-048
- Li, L. X., Li, X. F., Zhang, L. L., Zhang, Y., Guo, R. X., Zhang, X. Y., . . . Su, K. (2013). [Effects of plasma from patients with preeclampsia on the proliferation and apoptosis of human umbilical vein endothelial cells and its relationship with lysophosphatidic acid receptors]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*, *48*(2), 102-106.
- Li, M., Dou, L., Jiao, J., Lu, Y., Guo, H. B., Man, Y., . . . Li, J. (2012). NADPH oxidase 2-derived reactive oxygen species are involved in dysfunction and apoptosis of pancreatic beta-cells induced by low density lipoprotein. *Cell Physiol Biochem*, *30*(2), 439-449. doi: 10.1159/000339037
- Li, Y., Gonzalez, M. I., Meinkoth, J. L., Field, J., Kazanietz, M. G., & Tennekoon, G. I. (2003). Lysophosphatidic acid promotes survival and differentiation of rat Schwann cells. *J Biol Chem*, *278*(11), 9585-9591. doi: 10.1074/jbc.M213244200
- Liao, Y., & Hung, M. C. (2010). Physiological regulation of Akt activity and stability. *Am J Transl Res*, *2*(1), 19-42.
- Liao, Y., Mu, G., Zhang, L., Zhou, W., Zhang, J., & Yu, H. (2013). Lysophosphatidic acid stimulates activation of focal adhesion kinase and paxillin and promotes cell motility, via LPA1-3, in human pancreatic cancer. *Dig Dis Sci*, *58*(12), 3524-3533. doi: 10.1007/s10620-013-2878-4
- Lin, C. I., Chen, C. N., Lin, P. W., Chang, K. J., Hsieh, F. J., & Lee, H. (2007). Lysophosphatidic acid regulates inflammation-related genes in human endothelial cells through LPA1 and LPA3. *Biochem Biophys Res Commun*, *363*(4), 1001-1008. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.09.081
- Lin, M. E., Herr, D. R., & Chun, J. (2010). Lysophosphatidic acid (LPA) receptors: signaling properties and disease relevance. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, *91*(3-4), 130-138. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2009.02.002
- Lingohr, M. K., Buettner, R., & Rhodes, C. J. (2002). Pancreatic beta-cell growth and survival--a role in obesity-linked type 2 diabetes? *Trends Mol Med*, *8*(8), 375-384.
- Lingohr, M. K., Dickson, L. M., McCuaig, J. F., Hugl, S. R., Twardzik, D. R., & Rhodes, C. J. (2002). Activation of IRS-2-mediated signal transduction by IGF-1, but not TGF-alpha or EGF, augments pancreatic beta-cell proliferation. *Diabetes*, *51*(4), 966-976.
- Lingohr, M. K., Dickson, L. M., Wrede, C. E., Briaud, I., McCuaig, J. F., Myers, M. G., Jr., & Rhodes, C. J. (2003). Decreasing IRS-2 expression in pancreatic beta-cells (INS-1) promotes apoptosis, which can be compensated for by introduction of IRS-4 expression. *Mol Cell Endocrinol*, *209*(1-2), 17-31.
- Liu, S., Yu, S., Hasegawa, Y., Lapushin, R., Xu, H. J., Woodgett, J. R., . . . Fang, X. (2004). Glycogen synthase kinase 3beta is a negative regulator of growth factor-induced activation of the c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem*, *279*(49), 51075-51081. doi: 10.1074/jbc.M408607200

- Liu, Y., Tanabe, K., Baronnier, D., Patel, S., Woodgett, J., Cras-Meneur, C., & Permutt, M. A. (2010). Conditional ablation of Gsk-3beta in islet beta cells results in expanded mass and resistance to fat feeding-induced diabetes in mice. *Diabetologia*, *53*(12), 2600-2610. doi: 10.1007/s00125-010-1882-x
- Liu, Z., Tanabe, K., Bernal-Mizrachi, E., & Permutt, M. A. (2008). Mice with beta cell overexpression of glycogen synthase kinase-3beta have reduced beta cell mass and proliferation. *Diabetologia*, *51*(4), 623-631. doi: 10.1007/s00125-007-0914-7
- Lovis, P., Roggli, E., Laybutt, D. R., Gattesco, S., Yang, J. Y., Widmann, C., . . . Regazzi, R. (2008). Alterations in microRNA expression contribute to fatty acid-induced pancreatic beta-cell dysfunction. *Diabetes*, *57*(10), 2728-2736. doi: 10.2337/db07-1252
- Ma, F., Wei, Z., Shi, C., Gan, Y., Lu, J., Frank, S. J., . . . Huang, Y. (2011). Signaling cross talk between growth hormone (GH) and insulin-like growth factor-I (IGF-I) in pancreatic islet beta-cells. *Mol Endocrinol*, *25*(12), 2119-2133. doi: 10.1210/me.2011-1052
- Ma, X., Guan, Y., & Hua, X. (2014). Glucagon-like peptide 1-potentiated insulin secretion and proliferation of pancreatic beta-cells GLP-1beta. *J Diabetes*, *6*(5), 394-402. doi: 10.1111/1753-0407.12161
- Maedler, K., Sergeev, P., Ris, F., Oberholzer, J., Joller-Jemelka, H. I., Spinas, G. A., . . . Donath, M. Y. (2002). Glucose-induced beta cell production of IL-1beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J Clin Invest*, *110*(6), 851-860. doi: 10.1172/jci15318
- Marigliano, M., Tadiotto, E., Morandi, A., Sabbion, A., Contreas, G., Avossa, F., . . . Maffei, C. (2015). Epidemiology of type 1 diabetes mellitus in the pediatric population in Veneto Region, Italy. *Diabetes Res Clin Pract*, *107*(3), e19-21. doi: 10.1016/j.diabres.2014.12.009
- Martinez, S. C., Tanabe, K., Cras-Meneur, C., Abumrad, N. A., Bernal-Mizrachi, E., & Permutt, M. A. (2008). Inhibition of Foxo1 protects pancreatic islet beta-cells against fatty acid and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Diabetes*, *57*(4), 846-859. doi: 10.2337/db07-0595
- McCubrey, J. A., Steelman, L. S., Chappell, W. H., Abrams, S. L., Wong, E. W., Chang, F., . . . Franklin, R. A. (2007). Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta*, *1773*(8), 1263-1284. doi: 10.1016/j.bbamcr.2006.10.001
- McCullough, K. D., Martindale, J. L., Klotz, L. O., Aw, T. Y., & Holbrook, N. J. (2001). Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol*, *21*(4), 1249-1259. doi: 10.1128/mcb.21.4.1249-1259.2001
- McIntyre, T. M., Pontsler, A. V., Silva, A. R., St Hilaire, A., Xu, Y., Hinshaw, J. C., . . . Prestwich, G. D. (2003). Identification of an intracellular receptor for lysophosphatidic acid (LPA): LPA is a transcellular PPARgamma agonist. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(1), 131-136. doi: 10.1073/pnas.0135855100
- Miura, A., Ishizuka, T., Itaya, S., Ishizawa, M., Kanoh, Y., Kimura, M., . . . Yasuda, K. (1998). Glucose- and phorbol ester-induced insulin secretion in human insulinoma cells--association with protein kinase C activation. *Biochem Mol Biol Int*, *46*(4), 739-745.
- Moelling, K., Schad, K., Bosse, M., Zimmermann, S., & Schweneker, M. (2002). Regulation of Raf-Akt Cross-talk. *J Biol Chem*, *277*(34), 31099-31106. doi: 10.1074/jbc.M111974200
- Monaco, S., Illario, M., Rusciano, M. R., Gragnaniello, G., Di Spigna, G., Leggiero, E., . . . Vitale, M. (2009). Insulin stimulates fibroblast proliferation through calcium-calmodulin-dependent kinase II. *Cell Cycle*, *8*(13), 2024-2030.
- Moolenaar, W. H., van Meeteren, L. A., & Giepmans, B. N. (2004). The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling. *Bioessays*, *26*(8), 870-881. doi: 10.1002/bies.20081
- Morisco, C., Marrone, C., Trimarco, V., Crispo, S., Monti, M. G., Sadoshima, J., & Trimarco, B. (2007). Insulin resistance affects the cytoprotective effect of insulin in cardiomyocytes through an impairment of MAPK phosphatase-1 expression. *Cardiovasc Res*, *76*(3), 453-464. doi: 10.1016/j.cardiores.2007.07.012
- Motley, E. D., Kabir, S. M., Gardner, C. D., Eguchi, K., Frank, G. D., Kuroki, T., . . . Eguchi, S. (2002). Lysophosphatidylcholine inhibits insulin-induced Akt activation through protein kinase C-alpha in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, *39*(2 Pt 2), 508-512.

- Müller, D., Jones, P. M., & Persaud, S. J. (2006). Autocrine anti-apoptotic and proliferative effects of insulin in pancreatic beta-cells. *FEBS Lett*, 580(30), 6977-6980. doi: 10.1016/j.febslet.2006.11.066
- Muller, G., & Morawietz, H. (2009). NAD(P)H oxidase and endothelial dysfunction. *Horm Metab Res*, 41(2), 152-158. doi: 10.1055/s-0028-1086023
- Musicki, B., Ross, A. E., Champion, H. C., Burnett, A. L., & Bivalacqua, T. J. (2009). Posttranslational modification of constitutive nitric oxide synthase in the penis. *J Androl*, 30(4), 352-362. doi: 10.2164/jandrol.108.006999
- Nakanaga, K., Hama, K., & Aoki, J. (2010). Autotaxin--an LPA producing enzyme with diverse functions. *J Biochem*, 148(1), 13-24. doi: 10.1093/jb/mvq052
- Neidlinger, N. A., Larkin, S. K., Bhagat, A., Victorino, G. P., & Kuypers, F. A. (2006). Hydrolysis of phosphatidylserine-exposing red blood cells by secretory phospholipase A2 generates lysophosphatidic acid and results in vascular dysfunction. *J Biol Chem*, 281(2), 775-781. doi: 10.1074/jbc.M505790200
- Neschen, S., Morino, K., Hammond, L. E., Zhang, D., Liu, Z. X., Romanelli, A. J., . . . Shulman, G. I. (2005). Prevention of hepatic steatosis and hepatic insulin resistance in mitochondrial acyl-CoA:glycerol-sn-3-phosphate acyltransferase 1 knockout mice. *Cell Metab*, 2(1), 55-65. doi: 10.1016/j.cmet.2005.06.006
- Newsholme, P., Keane, D., Welters, H. J., & Morgan, N. G. (2007). Life and death decisions of the pancreatic beta-cell: the role of fatty acids. *Clin Sci (Lond)*, 112(1), 27-42. doi: 10.1042/cs20060115
- Nicholson-Fish, J. C., Cousin, M. A., & Smillie, K. J. (2015). Phosphatidylinositol 3-Kinase Couples Localised Calcium Influx to Activation of Akt in Central Nerve Terminals. *Neurochem Res*. doi: 10.1007/s11064-015-1663-5
- Niioka, T., Ohata, H., Momose, K., & Honda, K. (2013). Lysophosphatidic acid induces shear stress-dependent contraction in mouse aortic strip in situ. *J Cardiovasc Pharmacol*, 62(6), 530-538. doi: 10.1097/fjc.0000000000000013
- Nilsson, U. K., & Svensson, S. P. (2003). Inhibition of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase or epidermal growth factor receptor tyrosine kinase abolishes lysophosphatidic acid-mediated DNA-synthesis in human myometrial smooth muscle cells. *Cell Biol Int*, 27(4), 341-347.
- Nofer, J. R., van der Giet, M., Tolle, M., Wolinska, I., von Wnuck Lipinski, K., Baba, H. A., . . . Levkau, B. (2004). HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3. *J Clin Invest*, 113(4), 569-581. doi: 10.1172/jci18004
- Nolan, C. J., Damm, P., & Prentki, M. (2011). Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. *Lancet*, 378(9786), 169-181. doi: 10.1016/s0140-6736(11)60614-4
- Novotny, G. W., Lundh, M., Backe, M. B., Christensen, D. P., Hansen, J. B., Dahllof, M. S., . . . Mandrup-Poulsen, T. (2012). Transcriptional and translational regulation of cytokine signaling in inflammatory beta-cell dysfunction and apoptosis. *Arch Biochem Biophys*, 528(2), 171-184. doi: 10.1016/j.abb.2012.09.014
- Ohsugi, M., Cras-Meneur, C., Zhou, Y., Bernal-Mizrachi, E., Johnson, J. D., Luciani, D. S., . . . Permutt, M. A. (2005). Reduced expression of the insulin receptor in mouse insulinoma (MIN6) cells reveals multiple roles of insulin signaling in gene expression, proliferation, insulin content, and secretion. *J Biol Chem*, 280(6), 4992-5003. doi: 10.1074/jbc.M411727200
- Oikonomou, N., Mouratis, M. A., Tzouveleakis, A., Kaffe, E., Valavanis, C., Vilaras, G., . . . Aidinis, V. (2012). Pulmonary autotaxin expression contributes to the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 47(5), 566-574. doi: 10.1165/rcmb.2012-0004OC
- Okada, T., Liew, C. W., Hu, J., Hinault, C., Michael, M. D., Krtzfeldt, J., . . . Kulkarni, R. N. (2007). Insulin receptors in beta-cells are critical for islet compensatory growth response to insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(21), 8977-8982. doi: 10.1073/pnas.0608703104
- Okhrimenko, H., Lu, W., Xiang, C., Ju, D., Blumberg, P. M., Gomel, R., . . . Brodie, C. (2005). Roles of tyrosine phosphorylation and cleavage of protein kinase Cdelta in its protective effect against tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 280(25), 23643-23652. doi: 10.1074/jbc.M501374200

- Okudaira, S., Yukiura, H., & Aoki, J. (2010). Biological roles of lysophosphatidic acid signaling through its production by autotaxin. *Biochimie*, *92*(6), 698-706. doi: 10.1016/j.biochi.2010.04.015
- Okusa, M. D., Ye, H., Huang, L., Sigismund, L., Macdonald, T., & Lynch, K. R. (2003). Selective blockade of lysophosphatidic acid LPA3 receptors reduces murine renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol*, *285*(3), F565-574. doi: 10.1152/ajprenal.00023.2003
- Olianas, M. C., Dedoni, S., & Onali, P. (2015). Antidepressants activate the lysophosphatidic acid receptor LPA(1) to induce insulin-like growth factor-I receptor transactivation, stimulation of ERK1/2 signaling and cell proliferation in CHO-K1 fibroblasts. *Biochem Pharmacol*, *95*(4), 311-323. doi: 10.1016/j.bcp.2015.04.002
- Panchatcharam, M., Miriyala, S., Yang, F., Rojas, M., End, C., Vallant, C., . . . Smyth, S. S. (2008). Lysophosphatidic acid receptors 1 and 2 play roles in regulation of vascular injury responses but not blood pressure. *Circ Res*, *103*(6), 662-670. doi: 10.1161/circresaha.108.180778
- Paris, M., Bernard-Kargar, C., Berthault, M. F., Bouwens, L., & Ktorza, A. (2003). Specific and combined effects of insulin and glucose on functional pancreatic beta-cell mass in vivo in adult rats. *Endocrinology*, *144*(6), 2717-2727.
- Pebay, A., Bonder, C. S., & Pitson, S. M. (2007). Stem cell regulation by lysophospholipids. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, *84*(3-4), 83-97. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2007.08.004
- Persaud, S. J., Asare-Anane, H., & Jones, P. M. (2002). Insulin receptor activation inhibits insulin secretion from human islets of Langerhans. *FEBS Lett*, *510*(3), 225-228.
- Persaud, S. J., Muller, D., & Jones, P. M. (2008). Insulin signalling in islets. *Biochem Soc Trans*, *36*(Pt 3), 290-293. doi: 10.1042/bst0360290
- Pilkis, S. J., & Granner, D. K. (1992). Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu Rev Physiol*, *54*, 885-909. doi: 10.1146/annurev.ph.54.030192.004321
- Poitout, V., & Robertson, R. P. (2008). Glucolipototoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocr Rev*, *29*(3), 351-366. doi: 10.1210/er.2007-0023
- Poredos, P., & Jezovnik, M. K. (2013). Testing endothelial function and its clinical relevance. *J Atheroscler Thromb*, *20*(1), 1-8.
- Poy, M. N., Hausser, J., Trajkovski, M., Braun, M., Collins, S., Rorsman, P., . . . Stoffel, M. (2009). miR-375 maintains normal pancreatic alpha- and beta-cell mass. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(14), 5813-5818. doi: 10.1073/pnas.0810550106
- Pradere, J. P., Gonzalez, J., Klein, J., Valet, P., Gres, S., Salant, D., . . . Schanstra, J. P. (2008). Lysophosphatidic acid and renal fibrosis. *Biochim Biophys Acta*, *1781*(9), 582-587. doi: 10.1016/j.bbali.2008.04.001
- Prentki, M., Joly, E., El-Assaad, W., & Roduit, R. (2002). Malonyl-CoA signaling, lipid partitioning, and glucolipototoxicity: role in beta-cell adaptation and failure in the etiology of diabetes. *Diabetes*, *51* Suppl 3, S405-413.
- Prentki, M., & Nolan, C. J. (2006). Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest*, *116*(7), 1802-1812. doi: 10.1172/jci29103
- Ptaszynska, M. M., Pendrak, M. L., Stracke, M. L., & Roberts, D. D. (2010). Autotaxin signaling via lysophosphatidic acid receptors contributes to vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration. *Mol Cancer Res*, *8*(3), 309-321. doi: 10.1158/1541-7786.mcr-09-0288
- Qian, B., Wang, H., Men, X., Zhang, W., Cai, H., Xu, S., . . . Lou, J. (2008). TRIB3 [corrected] is implicated in glucotoxicity- and endoplasmic reticulum-stress-induced [corrected] beta-cell apoptosis. *J Endocrinol*, *199*(3), 407-416. doi: 10.1677/joe-08-0331
- Qian, J., & Fulton, D. (2013). Post-translational regulation of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelium. *Front Physiol*, *4*, 347. doi: 10.3389/fphys.2013.00347
- Qin, J., Fang, N., Lou, J., Zhang, W., Xu, S., Liu, H., . . . Chen, L. (2014). TRB3 is involved in free fatty acid-induced INS-1-derived cell apoptosis via the protein kinase C delta pathway. *PLoS One*, *9*(5), e96089. doi: 10.1371/journal.pone.0096089
- Quan, W., Jo, E. K., & Lee, M. S. (2013). Role of pancreatic beta-cell death and inflammation in diabetes. *Diabetes Obes Metab*, *15* Suppl 3, 141-151. doi: 10.1111/dom.12153

- Quintana-Lopez, L., Blandino-Rosano, M., Perez-Arana, G., Cebada-Aleu, A., Lechuga-Sancho, A., Aguilar-Diosdado, M., & Segundo, C. (2013). Nitric oxide is a mediator of antiproliferative effects induced by proinflammatory cytokines on pancreatic beta cells. *Mediators Inflamm*, 2013, 905175. doi: 10.1155/2013/905175
- Rachdi, L., Balcazar, N., Elghazi, L., Barker, D. J., Krits, I., Kiyokawa, H., & Bernal-Mizrachi, E. (2006). Differential effects of p27 in regulation of beta-cell mass during development, neonatal period, and adult life. *Diabetes*, 55(12), 3520-3528. doi: 10.2337/db06-0861
- Radhakrishnan, R., Ha, J. H., & Dhanasekaran, D. N. (2010). Mitogenic Signaling by the gep Oncogene Involves the Upregulation of S-Phase Kinase-Associated Protein 2. *Genes Cancer*, 1(10), 1033-1043. doi: 10.1177/1947601910390516
- Rancoule, C., Attane, C., Gres, S., Fournel, A., Dusaulcy, R., Bertrand, C., . . . Saulnier-Blache, J. S. (2013). Lysophosphatidic acid impairs glucose homeostasis and inhibits insulin secretion in high-fat diet obese mice. *Diabetologia*, 56(6), 1394-1402. doi: 10.1007/s00125-013-2891-3
- Rancoule, C., Dusaulcy, R., Treguer, K., Gres, S., Guigne, C., Quilliot, D., . . . Saulnier-Blache, J. S. (2012). Depot-specific regulation of autotaxin with obesity in human adipose tissue. *J Physiol Biochem*, 68(4), 635-644. doi: 10.1007/s13105-012-0181-z
- Ranta, F., Leveringhaus, J., Theilig, D., Schulz-Raffelt, G., Hennige, A. M., Hildebrand, D. G., . . . Ullrich, S. (2011). Protein kinase C delta (PKCdelta) affects proliferation of insulin-secreting cells by promoting nuclear extrusion of the cell cycle inhibitor p21Cip1/WAF1. *PLoS One*, 6(12), e28828. doi: 10.1371/journal.pone.0028828
- Rayasam, G. V., Tulasi, V. K., Sodhi, R., Davis, J. A., & Ray, A. (2009). Glycogen synthase kinase 3: more than a namesake. *Br J Pharmacol*, 156(6), 885-898. doi: 10.1111/j.1476-5381.2008.00085.x
- Reyland, M. E. (2007). Protein kinase Cdelta and apoptosis. *Biochem Soc Trans*, 35(Pt 5), 1001-1004. doi: 10.1042/bst0351001
- Rieck, S., & Kaestner, K. H. (2010). Expansion of beta-cell mass in response to pregnancy. *Trends Endocrinol Metab*, 21(3), 151-158. doi: 10.1016/j.tem.2009.11.001
- Rommel, C., Clarke, B. A., Zimmermann, S., Nunez, L., Rossman, R., Reid, K., . . . Glass, D. J. (1999). Differentiation stage-specific inhibition of the Raf-MEK-ERK pathway by Akt. *Science*, 286(5445), 1738-1741.
- Roper, M. G., Qian, W. J., Zhang, B. B., Kulkarni, R. N., Kahn, C. R., & Kennedy, R. T. (2002). Effect of the insulin mimetic L-783,281 on intracellular Ca²⁺ and insulin secretion from pancreatic beta-cells. *Diabetes*, 51 Suppl 1, S43-49.
- Ruisanchez, E., Dancs, P., Kerek, M., Nemeth, T., Farago, B., Balogh, A., . . . Benyo, Z. (2014). Lysophosphatidic acid induces vasodilation mediated by LPA1 receptors, phospholipase C, and endothelial nitric oxide synthase. *FASEB J*, 28(2), 880-890. doi: 10.1096/fj.13-234997
- Rusovici, R., Ghaleb, A., Shim, H., Yang, V. W., & Yun, C. C. (2007). Lysophosphatidic acid prevents apoptosis of Caco-2 colon cancer cells via activation of mitogen-activated protein kinase and phosphorylation of Bad. *Biochim Biophys Acta*, 1770(8), 1194-1203. doi: 10.1016/j.bbagen.2007.04.008
- Saisho, Y., Butler, A. E., Manesso, E., Elashoff, D., Rizza, R. A., & Butler, P. C. (2013). beta-cell mass and turnover in humans: effects of obesity and aging. *Diabetes Care*, 36(1), 111-117. doi: 10.2337/dc12-0421
- Sajan, M. P., Ivey, R. A., Lee, M. C., & Farese, R. V. (2015). Hepatic insulin resistance in ob/ob mice involves increases in ceramide, aPKC activity, and selective impairment of Akt-dependent FoxO1 phosphorylation. *J Lipid Res*, 56(1), 70-80. doi: 10.1194/jlr.M052977
- Samadi, N., Bekele, R., Capatos, D., Venkatraman, G., Sariahmetoglu, M., & Brindley, D. N. (2011). Regulation of lysophosphatidate signaling by autotaxin and lipid phosphate phosphatases with respect to tumor progression, angiogenesis, metastasis and chemo-resistance. *Biochimie*, 93(1), 61-70. doi: 10.1016/j.biochi.2010.08.002
- Samuel, V. T., Petersen, K. F., & Shulman, G. I. (2010). Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. *Lancet*, 375(9733), 2267-2277. doi: 10.1016/s0140-6736(10)60408-4

- Sayas, C. L., Avila, J., & Wandosell, F. (2002). Glycogen synthase kinase-3 is activated in neuronal cells by Galpha12 and Galpha13 by Rho-independent and Rho-dependent mechanisms. *J Neurosci*, 22(16), 6863-6875. doi: 20026701
- Schatz, H. (1977). [Biosynthesis of insulin. The Ferdinand-Bertram-Award lecture]. *Dtsch Med Wochenschr*, 102(19), 734-740. doi: 10.1055/s-0028-1104963
- Schinner, S., Scherbaum, W. A., Bornstein, S. R., & Barthel, A. (2005). Molecular mechanisms of insulin resistance. *Diabet Med*, 22(6), 674-682. doi: 10.1111/j.1464-5491.2005.01566.x
- Schmitz-Peiffer, C., & Biden, T. J. (2008). Protein kinase C function in muscle, liver, and beta-cells and its therapeutic implications for type 2 diabetes. *Diabetes*, 57(7), 1774-1783. doi: 10.2337/db07-1769
- Schüppel, M., Kürschner, U., Kleuser, U., Schäfer-Korting, M., & Kleuser, B. (2008). Sphingosine 1-phosphate restrains insulin-mediated keratinocyte proliferation via inhibition of Akt through the S1P2 receptor subtype. *J Invest Dermatol*, 128(7), 1747-1756. doi: 10.1038/sj.jid.5701259
- Secondo, A., Esposito, A., Sirabella, R., Boscia, F., Pannaccione, A., Molinaro, P., . . . Annunziato, L. (2015). Involvement of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger isoform 1 (NCX1) in neuronal growth factor (NGF)-induced neuronal differentiation through Ca²⁺-dependent Akt phosphorylation. *J Biol Chem*, 290(3), 1319-1331. doi: 10.1074/jbc.M114.555516
- Sedlakova, I., Vavrova, J., Tosner, J., & Hanousek, L. (2011). Lysophosphatidic acid (LPA)-a perspective marker in ovarian cancer. *Tumour Biol*, 32(2), 311-316. doi: 10.1007/s13277-010-0123-8
- Seki, E., Brenner, D. A., & Karin, M. (2012). A liver full of JNK: signaling in regulation of cell function and disease pathogenesis, and clinical approaches. *Gastroenterology*, 143(2), 307-320. doi: 10.1053/j.gastro.2012.06.004
- Shano, S., Moriyama, R., Chun, J., & Fukushima, N. (2008). Lysophosphatidic acid stimulates astrocyte proliferation through LPA1. *Neurochem Int*, 52(1-2), 216-220. doi: 10.1016/j.neuint.2007.07.004
- Shibata, K., Miyazaki, T., Ohata, H., & Honda, K. (2011). Shear stress-dependent effects of lysophosphatidic acid on agonist-induced vasomotor responses in rat mesenteric artery. *J Cardiovasc Pharmacol*, 57(5), 604-610. doi: 10.1097/FJC.0b013e3182144174
- Shimada, H., & Rajagopalan, L. E. (2010). Rho kinase-2 activation in human endothelial cells drives lysophosphatidic acid-mediated expression of cell adhesion molecules via NF-kappaB p65. *J Biol Chem*, 285(17), 12536-12542. doi: 10.1074/jbc.M109.099630
- Shlyonsky, V., Naeije, R., & Mies, F. (2014). Possible role of lysophosphatidic acid in rat model of hypoxic pulmonary vascular remodeling. *Pulm Circ*, 4(3), 471-481. doi: 10.1086/677362
- Simon, M. F., Daviaud, D., Pradere, J. P., Gres, S., Guigne, C., Wabitsch, M., . . . Saulnier-Blache, J. S. (2005). Lysophosphatidic acid inhibits adipocyte differentiation via lysophosphatidic acid 1 receptor-dependent down-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma2. *J Biol Chem*, 280(15), 14656-14662. doi: 10.1074/jbc.M412585200
- Solinas, G., Naugler, W., Galimi, F., Lee, M. S., & Karin, M. (2006). Saturated fatty acids inhibit induction of insulin gene transcription by JNK-mediated phosphorylation of insulin-receptor substrates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(44), 16454-16459. doi: 10.1073/pnas.0607626103
- Staiculescu, M. C., Ramirez-Perez, F. I., Castorena-Gonzalez, J. A., Hong, Z., Sun, Z., Meininger, G. A., & Martinez-Lemus, L. A. (2014). Lysophosphatidic acid induces integrin activation in vascular smooth muscle and alters arteriolar myogenic vasoconstriction. *Front Physiol*, 5, 413. doi: 10.3389/fphys.2014.00413
- Stanevich, V., Jiang, L., Satyshur, K. A., Li, Y., Jeffrey, P. D., Li, Z., . . . Xing, Y. (2011). The structural basis for tight control of PP2A methylation and function by LCMT-1. *Mol Cell*, 41(3), 331-342. doi: 10.1016/j.molcel.2010.12.030
- Steiner, M. R., Holtsberg, F. W., Keller, J. N., Mattson, M. P., & Steiner, S. M. (2000). Lysophosphatidic acid induction of neuronal apoptosis and necrosis. *Ann N Y Acad Sci*, 905, 132-141.
- Sugimoto, N., Takuwa, N., Yoshioka, K., & Takuwa, Y. (2006). Rho-dependent, Rho kinase-independent inhibitory regulation of Rac and cell migration by LPA1 receptor in Gi-inactivated CHO cells. *Exp Cell Res*, 312(10), 1899-1908. doi: 10.1016/j.yexcr.2006.02.020

- Sun, Y., Nam, J. S., Han, D. H., Kim, N. H., Choi, H. K., Lee, J. K., . . . Huh, S. O. (2010). Lysophosphatidic acid induces upregulation of Mcl-1 and protects apoptosis in a PTX-dependent manner in H19-7 cells. *Cell Signal*, 22(3), 484-494. doi: 10.1016/j.cellsig.2009.11.002
- Tanioka, T., Tamura, Y., Fukaya, M., Shinozaki, S., Mao, J., Kim, M., . . . Kaneki, M. (2011). Inducible nitric-oxide synthase and nitric oxide donor decrease insulin receptor substrate-2 protein expression by promoting proteasome-dependent degradation in pancreatic beta-cells: involvement of glycogen synthase kinase-3beta. *J Biol Chem*, 286(33), 29388-29396. doi: 10.1074/jbc.M110.192732
- Tarabra, E., Pelengaris, S., & Khan, M. (2012). A simple matter of life and death-the trials of postnatal Beta-cell mass regulation. *Int J Endocrinol*, 2012, 516718. doi: 10.1155/2012/516718
- Thomas, D. D., Liu, X., Kantrow, S. P., & Lancaster, J. R., Jr. (2001). The biological lifetime of nitric oxide: implications for the perivascular dynamics of NO and O₂. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(1), 355-360. doi: 10.1073/pnas.011379598
- Tian, Y. M., Urquidi, V., & Ashcroft, S. J. (1996). Protein kinase C in beta-cells: expression of multiple isoforms and involvement in cholinergic stimulation of insulin secretion. *Mol Cell Endocrinol*, 119(2), 185-193.
- Tigyi, G., Hong, L., Yakubu, M., Parfenova, H., Shibata, M., & Leffler, C. W. (1995). Lysophosphatidic acid alters cerebrovascular reactivity in piglets. *Am J Physiol*, 268(5 Pt 2), H2048-2055.
- Tokumura, A., Fukuzawa, K., & Tsukatani, H. (1978). Effects of synthetic and natural lysophosphatidic acids on the arterial blood pressure of different animal species. *Lipids*, 13(8), 572-574.
- Tokumura, A., Yotsumoto, T., Masuda, Y., & Tanaka, S. (1995). Vasopressor effect of lysophosphatidic acid on spontaneously hypertensive rats and Wistar Kyoto rats. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*, 90(1), 96-102.
- Trumper, K., Trumper, A., Trusheim, H., Arnold, R., Goke, B., & Horsch, D. (2000). Integrative mitogenic role of protein kinase B/Akt in beta-cells. *Ann N Y Acad Sci*, 921, 242-250.
- Turban, S., & Hajdúch, E. (2011). Protein kinase C isoforms: mediators of reactive lipid metabolites in the development of insulin resistance. *FEBS Lett*, 585(2), 269-274. doi: 10.1016/j.febslet.2010.12.022
- Tuttle, R. L., Gill, N. S., Pugh, W., Lee, J. P., Koeberlein, B., Furth, E. E., . . . Birnbaum, M. J. (2001). Regulation of pancreatic beta-cell growth and survival by the serine/threonine protein kinase Akt1/PKBalpha. *Nat Med*, 7(10), 1133-1137. doi: 10.1038/nm1001-1133
- Uchida, T., Nakamura, T., Hashimoto, N., Matsuda, T., Kotani, K., Sakaue, H., . . . Kasuga, M. (2005). Deletion of Cdkn1b ameliorates hyperglycemia by maintaining compensatory hyperinsulinemia in diabetic mice. *Nat Med*, 11(2), 175-182. doi: 10.1038/nm1187
- Ueda, H. (2011). Lysophosphatidic acid as the initiator of neuropathic pain. *Biol Pharm Bull*, 34(8), 1154-1158.
- Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H. P., & Ron, D. (2000). Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science*, 287(5453), 664-666.
- van Meeteren, L. A., & Moolenaar, W. H. (2007). Regulation and biological activities of the autotaxin-LPA axis. *Prog Lipid Res*, 46(2), 145-160. doi: 10.1016/j.plipres.2007.02.001
- van Meeteren, L. A., Ruurs, P., Stortelers, C., Bouwman, P., van Rooijen, M. A., Pradere, J. P., . . . Jonkers, J. (2006). Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, is essential for blood vessel formation during development. *Mol Cell Biol*, 26(13), 5015-5022. doi: 10.1128/mcb.02419-05
- van Nieuw Amerongen, G. P., Vermeer, M. A., & van Hinsbergh, V. W. (2000). Role of RhoA and Rho kinase in lysophosphatidic acid-induced endothelial barrier dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20(12), E127-133.
- Vasavada, R. C., Garcia-Ocana, A., Zawalich, W. S., Sorenson, R. L., Dann, P., Syed, M., . . . Stewart, A. F. (2000). Targeted expression of placental lactogen in the beta cells of transgenic mice results in beta cell proliferation, islet mass augmentation, and hypoglycemia. *J Biol Chem*, 275(20), 15399-15406.

- Vasavada, R. C., Wang, L., Fujinaka, Y., Takane, K. K., Rosa, T. C., Mellado-Gil, J. M., . . . Garcia-Ocana, A. (2007). Protein kinase C-zeta activation markedly enhances beta-cell proliferation: an essential role in growth factor mediated beta-cell mitogenesis. *Diabetes*, *56*(11), 2732-2743. doi: 10.2337/db07-0461
- Vaziri, N. D., & Wang, X. Q. (1999). cGMP-mediated negative-feedback regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by nitric oxide. *Hypertension*, *34*(6), 1237-1241.
- Velazquez-Garcia, S., Valle, S., Rosa, T. C., Takane, K. K., Demirci, C., Alvarez-Perez, J. C., . . . Garcia-Ocana, A. (2011). Activation of protein kinase C-zeta in pancreatic beta-cells in vivo improves glucose tolerance and induces beta-cell expansion via mTOR activation. *Diabetes*, *60*(10), 2546-2559. doi: 10.2337/db10-1783
- Wang, X., & Proud, C. G. (2009). Nutrient control of TORC1, a cell-cycle regulator. *Trends Cell Biol*, *19*(6), 260-267. doi: 10.1016/j.tcb.2009.03.005
- Wang, X. Y., Fan, X. S., Cai, L., Liu, S., Cong, X. F., & Chen, X. (2015). Lysophosphatidic acid rescues bone mesenchymal stem cells from hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Apoptosis*, *20*(3), 273-284. doi: 10.1007/s10495-014-1074-0
- Wang, Y., Gao, L., Li, Y., Chen, H., & Sun, Z. (2011). Nifedipine Protects INS-1 beta-Cell from High Glucose-Induced ER Stress and Apoptosis. *Int J Mol Sci*, *12*(11), 7569-7580. doi: 10.3390/ijms12117569
- Wang, Y., Liu, J., Liu, C., Naji, A., & Stoffers, D. A. (2013). MicroRNA-7 regulates the mTOR pathway and proliferation in adult pancreatic beta-cells. *Diabetes*, *62*(3), 887-895. doi: 10.2337/db12-0451
- Waraich, R. S., Weigert, C., Kalbacher, H., Hennige, A. M., Lutz, S. Z., Haring, H. U., . . . Lehmann, R. (2008). Phosphorylation of Ser357 of rat insulin receptor substrate-1 mediates adverse effects of protein kinase C-delta on insulin action in skeletal muscle cells. *J Biol Chem*, *283*(17), 11226-11233. doi: 10.1074/jbc.M708588200
- Watanabe, N., Ikeda, H., Nakamura, K., Ohkawa, R., Kume, Y., Aoki, J., . . . Yatomi, Y. (2007). Both plasma lysophosphatidic acid and serum autotaxin levels are increased in chronic hepatitis C. *J Clin Gastroenterol*, *41*(6), 616-623. doi: 10.1097/01.mcg.0000225642.90898.0e
- Weiner, J. A., & Chun, J. (1999). Schwann cell survival mediated by the signaling phospholipid lysophosphatidic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *96*(9), 5233-5238.
- Weiss, R., Dziura, J., Burgert, T. S., Tamborlane, W. V., Taksali, S. E., Yockel, C. W., . . . Caprio, S. (2004). Obesity and the metabolic syndrome in children and adolescents. *N Engl J Med*, *350*(23), 2362-2374. doi: 10.1056/NEJMoa031049
- Whiteman, E. L., Cho, H., & Birnbaum, M. J. (2002). Role of Akt/protein kinase B in metabolism. *Trends Endocrinol Metab*, *13*(10), 444-451.
- Wrede, C. E., Dickson, L. M., Lingohr, M. K., Briaud, I., & Rhodes, C. J. (2002). Protein kinase B/Akt prevents fatty acid-induced apoptosis in pancreatic beta-cells (INS-1). *J Biol Chem*, *277*(51), 49676-49684. doi: 10.1074/jbc.M208756200
- Wrede, C. E., Dickson, L. M., Lingohr, M. K., Briaud, I., & Rhodes, C. J. (2003). Fatty acid and phorbol ester-mediated interference of mitogenic signaling via novel protein kinase C isoforms in pancreatic beta-cells (INS-1). *J Mol Endocrinol*, *30*(3), 271-286.
- Wu, W. T., Chen, C. N., Lin, C. I., Chen, J. H., & Lee, H. (2005). Lysophospholipids enhance matrix metalloproteinase-2 expression in human endothelial cells. *Endocrinology*, *146*(8), 3387-3400. doi: 10.1210/en.2004-1654
- Xie, J., & Herbert, T. P. (2012). The role of mammalian target of rapamycin (mTOR) in the regulation of pancreatic beta-cell mass: implications in the development of type-2 diabetes. *Cell Mol Life Sci*, *69*(8), 1289-1304. doi: 10.1007/s00018-011-0874-4
- Xing, Y., Ganji, S. H., Noh, J. W., & Kamanna, V. S. (2004). Cell density-dependent expression of EDG family receptors and mesangial cell proliferation: role in lysophosphatidic acid-mediated cell growth. *Am J Physiol Renal Physiol*, *287*(6), F1250-1257. doi: 10.1152/ajprenal.00342.2003
- Xu, Y. J., Saini, H. K., Cheema, S. K., & Dhalla, N. S. (2005). Mechanisms of lysophosphatidic acid-induced increase in intracellular calcium in vascular smooth muscle cells. *Cell Calcium*, *38*(6), 569-579. doi: 10.1016/j.ceca.2005.08.001

- Yadav, D., Mahajan, S., Subramanian, S. K., Bisen, P. S., Chung, C. H., & Prasad, G. B. (2013). Prevalence of metabolic syndrome in type 2 diabetes mellitus using NCEP-ATPIII, IDF and WHO definition and its agreement in Gwalior Chambal region of Central India. *Glob J Health Sci*, 5(6), 142-155. doi: 10.5539/gjhs.v5n6p142
- Yakubu, M. A., Liliom, K., Tigyi, G. J., & Leffler, C. W. (1997). Role of lysophosphatidic acid in endothelin-1- and hematoma-induced alteration of cerebral microcirculation. *Am J Physiol*, 273(2 Pt 2), R703-709.
- Yanagida, K., & Ishii, S. (2011). Non-Edg family LPA receptors: the cutting edge of LPA research. *J Biochem*, 150(3), 223-232. doi: 10.1093/jb/mvr087
- Yang, C., Lafleur, J., Mwaikambo, B. R., Zhu, T., Gagnon, C., Chemtob, S., . . . Hardy, P. (2009). The role of lysophosphatidic acid receptor (LPA1) in the oxygen-induced retinal ganglion cell degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50(3), 1290-1298. doi: 10.1167/iovs.08-1920
- Ye, X., & Chun, J. (2010). Lysophosphatidic acid (LPA) signaling in vertebrate reproduction. *Trends Endocrinol Metab*, 21(1), 17-24. doi: 10.1016/j.tem.2009.08.003
- Ye, X., Ishii, I., Kingsbury, M. A., & Chun, J. (2002). Lysophosphatidic acid as a novel cell survival/apoptotic factor. *Biochim Biophys Acta*, 1585(2-3), 108-113.
- Yea, K., Kim, J., Lim, S., Park, H. S., Park, K. S., Suh, P. G., & Ryu, S. H. (2008). Lysophosphatidic acid regulates blood glucose by stimulating myotube and adipocyte glucose uptake. *J Mol Med (Berl)*, 86(2), 211-220. doi: 10.1007/s00109-007-0269-z
- Yoneda, T., Imaizumi, K., Oono, K., Yui, D., Gomi, F., Katayama, T., & Tohyama, M. (2001). Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *J Biol Chem*, 276(17), 13935-13940. doi: 10.1074/jbc.M010677200
- Yoshida, K. (2007). PKCdelta signaling: mechanisms of DNA damage response and apoptosis. *Cell Signal*, 19(5), 892-901. doi: 10.1016/j.cellsig.2007.01.027
- Yoshida, K., Nishida, W., Hayashi, K., Ohkawa, Y., Ogawa, A., Aoki, J., . . . Sobue, K. (2003). Vascular remodeling induced by naturally occurring unsaturated lysophosphatidic acid in vivo. *Circulation*, 108(14), 1746-1752. doi: 10.1161/01.cir.0000089374.35455.f3
- Zhang, C., Wendel, A. A., Keogh, M. R., Harris, T. E., Chen, J., & Coleman, R. A. (2012). Glycerolipid signals alter mTOR complex 2 (mTORC2) to diminish insulin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(5), 1667-1672. doi: 10.1073/pnas.1110730109
- Zhou, B. P., Liao, Y., Xia, W., Spohn, B., Lee, M. H., & Hung, M. C. (2001). Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat Cell Biol*, 3(3), 245-252. doi: 10.1038/35060032