Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Ulm
Sektion Nephrologie
Leiter: Professor F. Keller

UNTERSUCHUNGEN ZUR REZEPTORBINDUNG UND BIOLOGISCHEN WIRKUNG VON INSULIN, LISPRO-INSULIN UND INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-1 (IGF-1) AN PROXIMALEN NIERENTUBULUSZELLEN.

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von
UWE SCHMID
aus Stuttgart

1999

Amtierender Dekan: Prof. Dr. P. Gierschik

1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Keller

2. Berichterstatter: Prof. Dr. V. Maier

Tag der Promotion: 11. Mai 2000

Meinen Eltern gewidmet

1 EINLEITUNG 1

2 MATERIALIEN UND METHODEN 10

2.1 Material 10

2.1.1 Zellmaterial 10

2.1.2 Verwendete Materialien für die Zellkultur 12

2.1.3 Materialien für Rezeptorbindungsstudien 12

2.1.4 Hormone 13

2.1.5 Materialien für Proliferationsassy 14

2.1.6 Geräte 14

2.2 Methoden 14

2.2.1 Kultivierung von PT-1 proximalen Tubuluszellen 14

2.2.2 Kultivierung von HK-2 proximalen Tubuluszellen 15

2.3 Rezeptorbindungassay mit proximalen Nierentubuluszellen 15

2.3.1 Einführung 15

2.3.2 Vorbereitung der Zellen 16

2.3.3 Zellzählung und Lebendrate 16

2.3.4 Kompetitionsassay 17

2.3.5 Bestimmung von gebundenem und freiem Hormon 17

2.3.6 Auswertung und Darstellung der Bindungsdaten 18

2.3.7 Degradation 20

2.4 Proliferationsassy 21

2.4.1 Nichtradioaktiver Proliferationsassay 21

2.4.2 Proliferationsassay mit Tyrosinkinaseinhibitoren 22

2.5 Statistik 22

3 ERGEBNISSE 23

3.1 Rezeptorbindungsstudien 23

3.1.1 Bindung von Insulin an PT-1-Zellen 23

3.1.2 Bindung von Insulin an HK-2-Zellen 25

3.1.3 Bindung von IGF-1 an PT-1-Zellen 26

3.1.4 Bindung von IGF-1 an HK-2-Zellen 27

3.1.5 Scatchard-Analyse der Insulinbindung an PT-1 und HK-2 Zellen 29

3.2 Degradation von Insulin 30

3.2.1 Degradation an PT-1 Zellen 31

3.2.2 Degradation an HK-2 Zellen 32

3.3 Degradation von IGF-1 33

3.3.1 Degradation an PT-1 Zellen 33

3.3.2 Degradation an HK-2 Zellen 33

3.4 Biologische Wirkungen von Wachstumsfaktoren auf proximale Tubuluszellen 34

3.4.1 Wachstum von PT-1 Zellen 35

3.4.2 Wachstum von HK-2 Zellen 37

3.4.3 Wachstum von PT-1 Zellen mit Thyrosinkinaseinhibitoren 39

4 DISKUSSION 41

4.1 Bindungsstudien an PT-1 und HK-2 Zellen 41

4.2 Degradationsstudien an PT-1 und HK-2 Zellen 44

4.3 Biologische Wirkungen der Wachstumsfaktoren auf PT-1- und HK-2 Zellen 49

4.4 Schlußfolgerungen 55

5 ZUSAMMENFASSUNG 57

6 LITERATUR 59

Abkürzungsverzeichnis

DMSO	=	Dimethylsulfoxid
FCS	=	Fötales Kälberserum (fetal calf serum)
HK-2	=	Human Kidney-2 Zellen
IDE	=	Insulin-Degrading-Enzyme
IGF	=	Insulin-like Growth Factor
IGFBP	=	Insulin-like Growth Factor Binding Protein
IRS	=	Insulin-Related-Substrate
MDC	=	Methyl-2,5-Dihydroxycinnamate
MTT	=	(3(4,5Dimethylthiazol-2-yl)-2,5Diphenyltetrazoliumbromid)
PBS	=	Phosphatpuffer (Phosphate Buffered Saline)
PT-1	=	proximale Tubuluszellen eines Kaninchens
RCAM-Lysozym	=	Reduced Carbamoylmethylated Lysozyme
SD	=	Standardabweichung
SV-40	=	Simian Virus-40
TCA	=	Trichloressigsäure
TKI	=	Tyrosinkinaseinhibitoren

1 Einleitung

Das Lumen des proximalen Nierentubulus ist durch ein einschichtiges Epithel ausgekleidet. Dieses Epithel hat eine Vielzahl physiologischer Funktionen im Kohlenhydratstoffwechsel, der Aufrechterhaltung von Salz- und Wasserhomöostase und dem Abbau von Proteohormonen. Insulin und insulinähnliche Wachstumsfaktoren beeinflussen metabolische Funktionen und Transportfunktionen des proximalen Tubulus (FELD und HIRSCHBERG 1996). Insulin ist sowohl im Plasma als auch im Ultrafiltrat vorhanden und wird im proximalen Tubulus degradiert, zirkulierendes Proinsulin wird ebenfalls hauptsächlich in der Niere abgebaut. Insulinähnliche Wachstumsfaktoren wirken nicht nur auf Wachstum und Transportvorgänge von Tubuluszellen, sondern werden auch in erheblichem Maß von diesen Zellen verstoffwechselt.

Die Niere ist der wichtigste extrahepatische Abbauort von Insulin. Pro Tag werden 6-8U Insulin aus der Zirkulation entfernt, das entspricht 25% der vom Pankreas produzierten Insulinmenge (HAMMERMAN 1985). Dieser Vorgang findet vor allem im proximalen Abschnitt des Nierentubulus statt, die übrigen Abschnitte des Tubulussystems sind für den Insulinmetabolismus von untergeordneter Bedeutung. Beim niereninsuffizienten Diabetiker verlängert sich die Halbwertszeit des verabreichten Insulins zunächst, der Insulinbedarf verringert sich. Mit Entwicklung der Urämie kommt es dann zu einer Insulinresistenz, der Insulinbedarf steigt wieder (KAUFFMANN et al. 1983). Da Insulin ein Molekulargewicht von 5800 Da besitzt und somit frei filtriert wird, kommt der apikale Bürstensaum in Kontakt mit dem Hormon. Mit dem im Plasma zirkulierenden Hormon stehen die Insulinrezeptoren der basolateralen Membran in Verbindung. Dies stimmt mit der physiologischen Funktion des proximalen Epithels, der Bindung und dem Abbau von Insulin überein (YAGIL et al. 1988). Insulin wird im proximalen Tubulus jedoch nicht nur abgebaut, sondern reguliert den Kohlenhydratstoffwechsel und die Proteolyse in der Niere, beeinflußt den Natriumhaushalt und bewirkt eine Vasodilatation (QUINONES et al. 1997).

Insulin

Insulin ist ein Proteohormon aus 51 Aminosäuren für dessen Biosynthese, Speicherung und Sekretion die B-Zellen des Pankreas verantwortlich sind. Es besteht aus einer 21 Aminosäuren langen A-Kette und einer 30 Aminosäuren langen B-Kette, welche durch Disulfidbrücken zusammengehalten und in der Tertiärstruktur stabilisiert werden. Insulin wird als Präproinsulin aus 107 Aminosäuren an den Ribosomen synthetisiert. Bei der Einschleusung in das

endoplasmatische Retikulum wird das Signalpeptid am N-terminalen Ende abgespalten, es entsteht das aus 86 Aminosäuren bestehende Proinsulin. Der weitere Weg des Hormons führt über den Golgi-Apparat in die ß-Granula, in welchen die endgültige Spaltung in C-Peptid (connecting-peptide, 35 Aminosäuren) und Insulin erfolgt. Physiologischerweise werden ungefähr 10% des Insulins in Form von Proinsulin sezerniert, beim Typ-II Diabetiker jedoch kann dieser Wert wesentlich ansteigen (COHEN et al. 1992).

Insulinähnliche Wachstumsfaktoren (IGFs)

Insulinähnliche Wachstumsfaktoren (insulin-like growth factors, IGFs) sind wesentlich für Organentwicklung, Wachstum und Gewebedifferenzierung. So werden nanomolare Konzentrationen von IGF-1 und IGF-2 lebenslang im Blut aufrechterhalten (LEROITH 1997). Nach der Geburt ist der insulin-like growth factor-1 (IGF-1) Vermittler der Wachstumshormonwirkung und wird von den meisten Geweben gebildet, Hauptbildungsort ist die Leber. Die endokrinen, para- und autokrinen Wirkungen von IGF-1 werden von 6 verschiedenen Bindungsproteinen moduliert. Im menschlichen Blut sind mehr als 99% des zirkulierenden IGF-1 an Bindeproteine gebunden, wobei mehr als 95% des Serum-IGF an das IGF-Bindeprotein-3 gebunden sind (TADA et al. 1994). IGF-2 ist im Serum in noch höherer Konzentration als IGF-1 vorhanden, auch zirkulierendes IGF-2 liegt zu 99% an Bindeproteine gebunden vor (TADA et al. 1994).

Humanes IGF-1 ist ein einsträngiges Peptid aus 70 Aminosäuren und weist zu humanem Insulin eine Homologie von 47% und zu IGF-2 von 70% auf (RINDERKNECHT und HUMBEL 1978). Analog zu Proinsulin enthält IGF-1 eine C-Region und an der A-Kette eine D-Region. Die C-Region des IGF-1 wird für die hochaffine Rezeptorenbindung benötigt (BAYNE et al. 1988). Eine im menschlichen Gehirn vorkommende Isoform des IGF-1 ist das am N-terminalen Ende um drei Aminosäuren gekürzte Des(1-3)IGF-1 (HUMBEL 1990). Dieses bindet nicht an IGF-Bindeproteine und hat so eine höhere biologische Wirksamkeit (BAGLEY et al. 1989). Ein weiteres Mitglied der Familie insulinähnlicher Wachstumsfaktoren ist der insulin-like growth factor-2 (IGF-2). Dieser besteht aus 67 Aminosäuren und weist eine Homologie von 62% zu IGF-1 und von 47% zu Insulin auf.

Der Insulinrezeptor

Die Hormonwirkungen werden durch Bindung an den jeweiligen Rezeptor auf der Zellmembran vermittelt. Die größere Insulinrezeptorenfamilie, welche den Insulinrezeptor, den Insulin-like growth factor receptor (IGF-1-R) und den Insulin receptor-related receptor (IRR) einschließt, gehört zur Familie der Rezeptoren mit Tyrosinkinaseaktivität (ULLRICH et al. 1992).

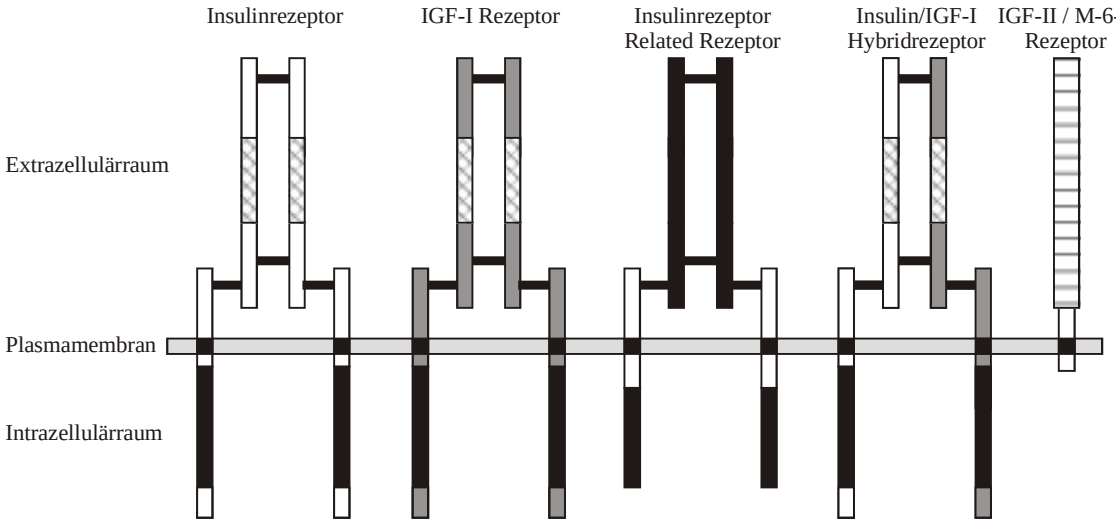


Abbildung 1: Die Familie der Rezeptoren für insulinähnliche Wachstumsfaktoren. Die Rezeptoren sind bis auf den Man-6-P-Rezeptor tetramere Komplexe, die durch Disulfidbrücken verbunden sind (in der Grafik durch waagrechte Balken dargestellt). Die extrazelluläre Region vermittelt die Ligandenbindung, die intrazelluläre Region enthält die Tyrosinkinaseaktivität (bis auf den Man-6-P-Rezeptor). Nach: LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT: Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. Endocrine Reviews 16: 143-163 (1995)

Der Insulinrezeptor besteht aus zwei α-Untereinheiten und zwei β-Untereinheiten, die kovalent durch Disulfidbrücken miteinander verbunden ein $\alpha_2\beta_2$-Tetramer bilden. Das Molekulargewicht des Holorezeptors liegt bei etwa 350.000 kD in der Gelelektrophorese. Isoformen des Rezeptors entstehen durch alternatives Splicing der mRNA von Exon 11. Dieser gewebsspezifische Vorgang wird in der Zellentwicklung reguliert. Im hämatopoetischen Gewebe herrscht die Isoform 11- vor, in Lebergewebe dominiert die 11+ Form und in Muskel und Fettgewebe liegen beide Formen vor (BENECKE et al. 1992). Die biologische Bedeutung des Splicing ist nicht klar, jedoch wirkt es sich in verändertem Bindungsverhalten der Rezeptoren in kultivierten Zellen aus (SESTI et al. 1994).

Die α-Untereinheit liegt vollständig extrazellulär und vermittelt die für Insulin spezifische Ligandenbindung. An der Bindung beteiligt sind N-terminale und C-terminale Abschnitte der Untereinheit. Die cysteinreiche Region hat ebenfalls Einfluß auf die Ligandenbindung (MYNARCIK et al. 1997). Die β-Untereinheit des Rezeptors besteht aus einer extrazellulären, einer transmembranären und einer zytosolischen Domäne. Die zytosolische Domäne enthält die Tyrosinkinaseaktivität des Insulinrezeptors mit Tyrosinresten, welche an drei verschiedenen Stellen phosphoryliert werden (KOHANSKI 1993). Die juxtamembranäre Domäne der β-

Untereinheit wird zur Signaltransduktion und zur Endozytose des Hormon-Rezeptor-Komplexes benötigt (BACKER 1990a). Insulinrezeptoren binden Insulin hochaffin und IGF-1 etwa 10-100fach schwächer (KJELDSEN et al. 1991).

Rezeptoren für insulinähnliche Wachstumsfaktoren

Zwischen Insulin- und IGF-1 Rezeptoren bestehen viele strukturelle Ähnlichkeiten, auch die Domäne der Tyrosinkinase weist viele ähnliche Motive auf. Der IGF-1 Rezeptor besteht analog zum Insulinrezeptor aus einer α-Untereinheit und einer β-Untereinheit, der Holorezeptor bildet ein $\alpha_2\beta_2$-Tetramer aus. Die α-Untereinheit vermittelt die Ligandenbindung, die β-Untereinheit besitzt Tyrosinkinaseaktivität. Auch der IGF-1 Rezeptor bildet gewebs- und entwicklungsspezifische Formen aus, welche durch unterschiedliches Spleißen des Exon 14 (CONDORELLI et al. 1994), unterschiedliche Glykosilierung und Bildung von Hybriden mit dem Insulinrezeptor zustande kommen (LEROITH et al. 1995). In Analogie zum Insulinrezeptor werden Tyrosinreste des IGF-1 Rezeptors bei Ligandenbindung an mehreren Stellen phosphoryliert. IGF-1 Rezeptoren binden IGF-1 hochaffin und Insulin 10-100fach schwächer (KJELDSEN et al. 1991).

Insulin und IGF-1 Rezeptoren bilden in vivo und in vitro Hybride aus, bei welchen αβ-Hälften der jeweiligen Rezeptoren kovalent durch Disulfidbrücken verbunden sind (MOXHAM und JACOBS 1992, SOOS et al. 1990). Diese Hybridrezeptoren binden IGF-1 ähnlich hochaffin wie reine IGF-1 Rezeptoren und Insulin mit wesentlich niedrigerer Affinität. Die biologische Bedeutung dieser Rezeptoren ist unklar, jedoch besteht ein signifikanter Anteil der Insulin / IGF-1 Rezeptoren auf menschlichen Zellen aus Hybriden (FREDERICI et al. 1997).

Bei Säugetieren bindet IGF-2 neben den IGF-1 Rezeptor hochaffin an einen weiteren Rezeptor, der aus diesem Grund IGF-2 Rezeptor genannt wird. Dieser ist identisch mit dem Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (Man-6-P-Rezeptor), welcher aus einem einsträngigen Peptid besteht und keine Tyrosinkinaseaktivität besitzt. Die hormonellen Wirkungen von IGF-2 können durch Blockierung der IGF-1 - Rezeptoren mit monoklonalen Antikörpern aufgehoben werden. Deshalb nimmt man an, daß die IGF-2 Wirkungen durch IGF-1 - Rezeptoren vermittelt werden. Eine Wirkung der IGF-2-Rezeptoren auf die Embryo- und Organogenese wird postuliert (NISSLEY et al. 1993). Der zytoplasmatische Man-6-P-Rezeptor wird zwischen Golgi-Apparat und sauren Lysosomen recycelt, er dient zum intrazellulären “Targeting” lysosomaler Hydrolasen (LUDWIG et al. 1994).

An humanen IM-9 Lymphozyten (JEHLE et al. 1996c), an Endothelzellen (FAEHLING et al. 1999) und an kryptenähnlichen Zellen der Ratte (JEHLE et al. 1999) wurden hochaffine Bindungsstellen für Proinsulin nachgewiesen. Diese unterschieden sich von den ebenfalls gezeigten Insulin- und IGF-1 Rezeptoren und deuten somit auf einen spezifischen Rezeptor für Proinsulin hin.

Zur Familie der Insulin / IGF-1 Rezeptoren gehört auch der insulin receptor-related receptor (IRR), dessen natürlicher Ligand nicht bekannt ist (ZHANG et al. 1992). Der IRR bindet weder Insulin noch IGF-1/2, er wird in distalen Nierentubuli beim Menschen (KURACHI et al. 1992) und in Neuronen fetaler Ratten exprimiert (REINHARDT et al. 1993). Das legt die Vorstellung nahe, daß der IRR im Gegensatz zu Insulin / IGF-1- Rezeptoren eine sehr schmale zellspezifische Wirkung besitzt (RAIZADA 1993).

Rezeptorbindung

Die Insulinbindung an den Rezeptor ist spezifisch, hochaffin, zeit-, temperatur-, pH-abhängig und reversibel. Scatchard-Plots aus Bindungsstudien mit Insulin weisen einen typischen gekrümmten Verlauf auf. Dieser Verlauf kann als Heterogenität der Rezeptoren innerhalb der Zellkultur oder als negative Kooperativität des Rezeptors gedeutet werden (DEMEYTS et al. 1976). Negative Kooperativität bedeutet, daß die Dissoziation eines rezeptorgebundenen Tracers durch Vorhandensein unmarkierten Hormons im Überstand beschleunigt wird. Die Dissoziationsrate des markierten Hormons ist von der Konzentration des unmarkierten Liganden abhängig. In physiologischen Konzentrationen bis hin zu 100 nM kalten Insulins wird die Dissoziation beschleunigt und nimmt bei Konzentrationserhöhung zwischen 0.1-10 μM wieder ab. Ein Erklärungsmodell für diese Beobachtung ist, daß Insulin in höheren Konzentrationen Dimere ausbildet und so die Rezeptor-Ligand-Interaktionen erschwert (SAUNDERS 1982). Versuche mit nichtdimerisierenden Insulinen zeigten jedoch das gleiche Phänomen und widerlegten diese Annahme (BRANGE et al. 1990). Ein neueres Erklärungsmodell der negativen Kooperativität ist die Vorstellung, daß jede α-Untereinheit des Rezeptors zwei voneinander unabhängige Bindungsstellen besitzt. Bei physiologischen Insulinkonzentrationen verbindet ein Insulinmolekül die Untereinheiten des Holorezeptors in asymmetrischer Weise. Steigt die Hormonkonzentration an, werden die noch unbesetzten Bindungsstellen ebenfalls besetzt und stabilisieren die erste Querverbindung, so daß gebundenes Insulin schwer abdissoziieren kann (DEMEYTS 1994, HAMMOND et al. 1997).

Dimere und hexamere Komplexe von Insulin erschweren eine stöchiometrische Analyse von Rezeptor-Ligand-Interaktionen, da bei kompetitiven Bindungsstudien hohe Konzentrationen an Insulin eingesetzt werden müssen. Hier kann man nichtdimerisierende Insulinanaloga zur exakten Bestimmung der Bindungskapazität benutzen. Ein klinisch eingesetztes Insulinanalogon ist $LysB^{28}ProB^{29}$ (Lispro). Dieses Insulin wurde durch Inversion der Aminosäuren $Prolin^{B28}$ und $Lysin^{B29}$ in Homologie zur Sequenz von IGF-1 hergestellt. Es zeigt eine dem IGF-1 vergleichbar reduzierte Dimerisierung bei unveränderter Insulinwirkung (HOWEY et al. 1994). Studien mit Insulinanalogen haben gezeigt, daß einige Analoge eine verstärkte mitogene Wirkung im Vergleich zur metabolischen Wirkung besitzen. Das Charakteristikum dieser Hormone war, daß die am stärksten mitogen wirkenden Insuline die niedrigste Dissoziationsrate aufwiesen (HANSEN et al. 1996). Eine Erklärung ist, daß eine verlängerte Rezeptoraktivierung ein mitogenes Signal darstellt (DEMEYTS 1994).

Die Insulindegradation findet nach endozytotischer Aufnahme des Hormon-Rezeptorkomplexes statt. Nach Ansäuerung des Endosoms dissoziiert das Insulinmolekül vom Rezeptor ab, das Insulinmolekül wird degradiert und der Rezeptor kehrt wieder an die Zelloberfläche zurück. Eine verlängerte Exposition gegenüber Insulin verstärkt den Abbau des internalisierten Rezeptors (OKABAYASHI et al. 1989). Dies kann das Phänomen der Downregulation von Rezeptoren in kultiverten Zellen bei Inkubation mit Insulin erklären.

Signaltransduktion

Der Mechanismus, durch welchen das Signal der Insulinbindung von α- zur β-Untereinheit übertragen wird, ist noch nicht vollständig bekannt. Eine Erklärung ist, daß die nicht mit Insulin besetzte α-Untereinheit die Tyrosinkinaseaktivität der β-Untereinheit unterdrückt. Weiterhin gibt es Hinweise, daß die Ligandenbindung eine Konformationsänderung des Rezeptors bewirkt, welche die Stellung der β-Untereinheiten gegeneinander verändert und dadurch die Autophosphorylierung stimuliert (WHITE 1997).

Insulin- und IGF-1- Rezeptoren gehören zur Familie der Rezeptoren mit Tyrosinkinaseaktivität, Die Signaltransduktion erfolgt durch die Autophosphorylierung der Tyrosinreste der Rezeptoren nach Ligandenbindung (ULLRICH et al. 1992). Die phosphorylierten Tyrosinreste des Rezeptors binden Substrate wie das insulin-receptor-substrate-1 (IRS-1) genannte und am besten erforschte Molekül (MYERS und WHITE 1993). IRS-1 ist ein intrazelluläres Ligand- oder “docking”- Protein mit 21 Phosphotyrosinresten und mehr als 30 Se-

rin/Threoninphosphorylierungsstellen. Die phosphorylierten Reste des IRS-1 binden an SH_2-Domänen unterschiedlicher Targetproteine und regulieren diese. Proteine, welche mit IRS-1 assoziieren, sind die Phosphatidylinositol-3-kinase (PI 3-Kinase), zytoplasmatische Tyrosinkinasen der src-Familie, Phosphotyrosin-Phosphatasen (SHPTP2), Growth factor receptor binding protein 2 (Grb2) und eine Reihe weiterer Proteine (WHITE 1997). Das IRS-1 Molekül ist ein gemeinsames intrazelluläres Substrat von Insulin- und IGF-1-Rezeptoren (CHUANG et al. 1993). Die Divergenz von metabolischen und mitogenen Signalkaskaden wird dadurch erreicht, daß verschiedene Phosphotyrosinreste mit unterschiedlichen Proteinen interagieren. Obwohl IRS-1 für viele Insulin/IGF-1-Wirkungen notwendig ist, waren Versuche mit IRS-1 defizienten Nacktmäusen nicht tödlich (ARAKI et al. 1994). Dies weist darauf hin, daß noch weitere Proteine an der Signaltransduktion beteiligt sind. So wurden noch weitere Substrate wie IRS-2 (SUN et al. 1995), IRS-3 (SCIACCITANO und TAYLOR 1997) und IRS-4 (FANTIN et al. 1998) gefunden und kloniert. Weitere wichtige Signalmolekül sind die Proteine der Shc Familie (WHITE 1997).

Deletion des Gens für IRS-1 bewirkte bei Mäusen Wachstumsverzögerung und eine mäßige Insulinresistenz, die durch Hyperplasie der pankreatischen β-Zellen kompensiert werden konnte (TAMEMOTO et al. 1994). Wurde jedoch das Gen für IRS-2 ausgeschaltet, rief dies Typ 2 Diabetes hervor (WITHERS et al. 1998). Da es zwischen den IRS-2 defizienten Mäusen und Typ 2 Diabetes beim Menschen viele Ähnlichkeiten gibt, wurde das menschliche Gen für IRS-2 in verschiedenen Populationen untersucht. Es gab jedoch keine Verbindung zwischen Polymorphismen des Gens und Typ 2 Diabetes (KAHN 1998).

Die Niere und das Insulin/IGF-1 System

Die Niere spielt im Kohlenhydratstoffwechsel eine wichtige Rolle. Etwa 25% der Blutglukose eines nüchternen Menschen stammen aus der Niere, vor allem von Zellen des proximalen Tubulus (STUMVOLL 1998). Diese Glukoneogenese läßt sich im Tierversuch durch Insulin inhibieren (HAMMERMAN 1985). Insulin bewirkt im proximalen Tubulus auch eine Hemmung der Proteolyse (TSAO et al. 1990) und beeinflußt den Elektrolyttransport (QUINONES et al. 1997).

Wie eingangs erwähnt, ist die Niere der wichtigste extrahepatische Abbauort von Insulin. Proinsulin wird noch mehr als Insulin renal eliminiert (KITABCHI 1977). Eine verlängerte Halbwertszeit von Proinsulin ist von klinischer Bedeutung, da Hyperproinsulinämie als kardiovaskulärer Risikofaktor beschrieben wurde (NAGI et al. 1990). Proinsulin besitzt nur 1/10

der metabolischen Aktivität des Insulins (REVERS et al. 1984), wirkt jedoch wachstumsstimulierend (PEAVY et al. 1984) und stimuliert die Synthese von Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1 (SCHNEIDER et al. 1992).

Zellen der proximalen Nierentubuli exprimieren viele Rezeptoren für IGF-1, wie an vielen tierischen Zellen gezeigt wurde (FLYVBJERG et al. 1993, YAGIL et al. 1988). Zu IGF-1 Rezeptoren in der menschlichen Niere gibt es weniger Aussagen, im proximalen Tubulus wird jedoch reichlich mRNA von IGF-1 Rezeptoren exprimiert (CHIN und BONDY 1992).
Im Gegensatz zu Insulin wird IGF-1 und IGF-2 im Glomerulum nicht frei filtriert, da diese Hormone im Serum an 6 verschiedene Bindeproteine gebunden sind. Diese Bindeproteine besitzen eine molekulare Masse zwischen 24 und 44 kDa (IGFBP-1 bis -6) und sind spezifisch für insulinähnliche Wachstumsfaktoren (FELD und HIRSCHBERG 1996). Die im Urin gefundenen Mengen an IGF-1 nierengesunder Patienten sind sehr gering (GARGOSKY et al. 1993). IGF-1 mRNA wird unter physiologischen Bedingungen im proximalen Tubulus nur minimal exprimiert (MATEJKA et al. 1992a). In immunhistologischen Färbungen wurde IGF-1 an apikalen und basolateralen Membranen nachgewiesen, jedoch nicht im Zytoplasma (KOBAYASHI et al. 1991). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß Zellen des proximalen Tubulus zwar kein IGF-1 produzieren, aber funktionell von zirkulierendem und ultrafiltriertem IGF-1 beeinflußt werden. Nach Ischämie jedoch wird IGF-1 übergangsweise in der Niere gebildet. Unter diesen Vorraussetzungen wird IGF-1 mRNA in nicht ausdifferenzierten Tubuluszellen und eingewanderten Makrophagen produziert (MATEJKA et al. 1992b).

Die Niere spielt bei der Regulation von IGF-1 eine untergeordnete Rolle (FELD und HIRSCHBERG 1996). Physiologische Wirkungen von IGF-1 auf proximale Tubuluszellen sind die Beeinflussung von Transportprozessen wie die Absorption von Phosphat und Natrium (JOHNSON et al. 1997), Wachstum, Differenzierung und die gesteigerte Sekretion extrazellulärer Matrixproteine (FELD und HIRSCHBERG 1996). Im Zellzyklus ist IGF-1 ein wichtiger Progressionsfaktor und wird wahrscheinlich benötigt, den Zellzyklus bei einer normalen Rate zu halten (LEROITH et al. 1995). Die Zelltransformation mittels viraler Onkogene ist abhängig vom IGF-1 Rezeptor. So ist es gut nachzuvollziehen, daß auf der Zelloberfläche verschiedener Krebsarten vermehrt IGF-1 Rezeptoren exprimiert werden (LEROITH et al. 1995).

Fragestellung:

Die Niere ist ein wichtiges Organ im Insulinmetabolismus und wird von filtriertem und zirkulierendem IGF-1 beeinflußt. In unserem Labor stehen zwei etablierte und gut differenzierte proximale Tubuluszellinien menschlicher und tierischer Herkunft zur Verfügung. An diesen Zellen sollen die Bindung und mitogene Wirkung von Insulin, Lispro, IGF-1, Des(1-3)IGF-1, Proinsulin und C-Peptid untersucht werden. Lispro ist für niereninsuffiziente Diabetiker aufgrund der schnelleren Resorption klinisch günstiger. Da keine Daten zur Bindung und Degradation in der Niere vorliegen, soll dies in vitro untersucht werden. Es stellen sich die folgenden Fragen:

- Werden spezifische und funktionelle Rezeptoren für Insulin und IGF-1 auf PT-1 und HK-2 Zellen exprimiert ?
- Welchen Einfluß haben die Hormone auf das Zellwachstum ?
- Welchen Einfluß haben die Zellen auf die Degradation der Hormone ?
- Gibt es eines Unterschied in der Pharmakodynamik oder der Mitogenität zwischen Insulin und Lispro oder IGF-1 und Des(1-3)IGF-1?

Aus diesen Untersuchungen sollen sich mögliche therapeutische Ansätze zur besseren Diabeteseinstellung bei Niereninsuffizienz, zur Prophylaxe der interstitiellen Fibrose, zur Prognoseverbesserung des akuten Nierenversagens und zur Entwicklung eines biologischen Nierenersatzes ergeben.

2 Materialien und Methoden

2.1 MATERIAL

2.1.1 Zellmaterial

a.) Proximale Tubuluszellen HK-2

Als menschliches Zellmodell wurde die Linie HK-2 verwendet. HK-2 Zellen sind proximale Tubuluszellen und wurden aus einer adulten menschlichen Niere isoliert. Hier wurden die Zellen mit HPV-16 E6/E7 Genen transfiziert, wobei das verwendete Plasmid ebenfalls das Gen *neo* enthält. Diese Zellinie trägt viele Merkmale der funktionellen und phänotypischen Eigenschaften einer adulten menschlichen Niere, sie ergeben einen positiven Nachweis von alkalischer Phosphatase, γ-Glutamyltransferase, saure Phophatase, Cytokeratin, $\alpha_3\beta_1$-Integrin und Fibronektin. Die Adenylatzyclase wird durch Parathormon, nicht aber durch Antidiuretisches Hormon stimuliert (RYAN et al. 1994). HK -2 Zellen wachsen wie PT -1 Zellen adhärent als einschichtiger Zellrasen.

b.) Proximale Tubuluszellen PT-1

Eine verwendete Zellinie ist die Linie PT-1, diese stammt aus Zellen des proximalen Nierentubulus eines Kaninchens, die mit dem Plasmid pDV2-*neo* DNA transfiziert wurden. Das Plasmid enthält DNA der frühen Region des SV-40 Virus. PT-1 Zellen weisen eine Vielzahl morphologischer und funktioneller Merkmale differenzierter proximaler Tubuluszellen auf, sie färben positiv für Cytokeratin, Alkalische Phosphatase, besitzen ein Natrium-gekoppelten Hexose-Transportsystem, apikale Mikrovilli und laterale Tight junctions. Die Zellen wachsen adhärent als einschichtiger Zellrasen (JEHLE et al. 1996a, STRACKE et al. 1998, HAUG et al. 1998, GRUNEWALD et al. 1999).

Im transmissionselektronenmikroskopischen Bild der Abbildung 2 sieht man die bipolare Differenzierung proximaler Tubuluszellen mit Mikrovilli an der apikalen (luminalen) Seite und den komplexen basolateralen Einfaltungen der basolateralen Membran. Mehrere Tight junctions trennen den luminalen vom basolateralen Abschnitt. Die rasterelektronenmikroskopische Aufnahme zeigt die Zellen mit den langen Mikrovilli auf der apikalen Membran und den interdigitierenden Ausläufern der Zellmembran.

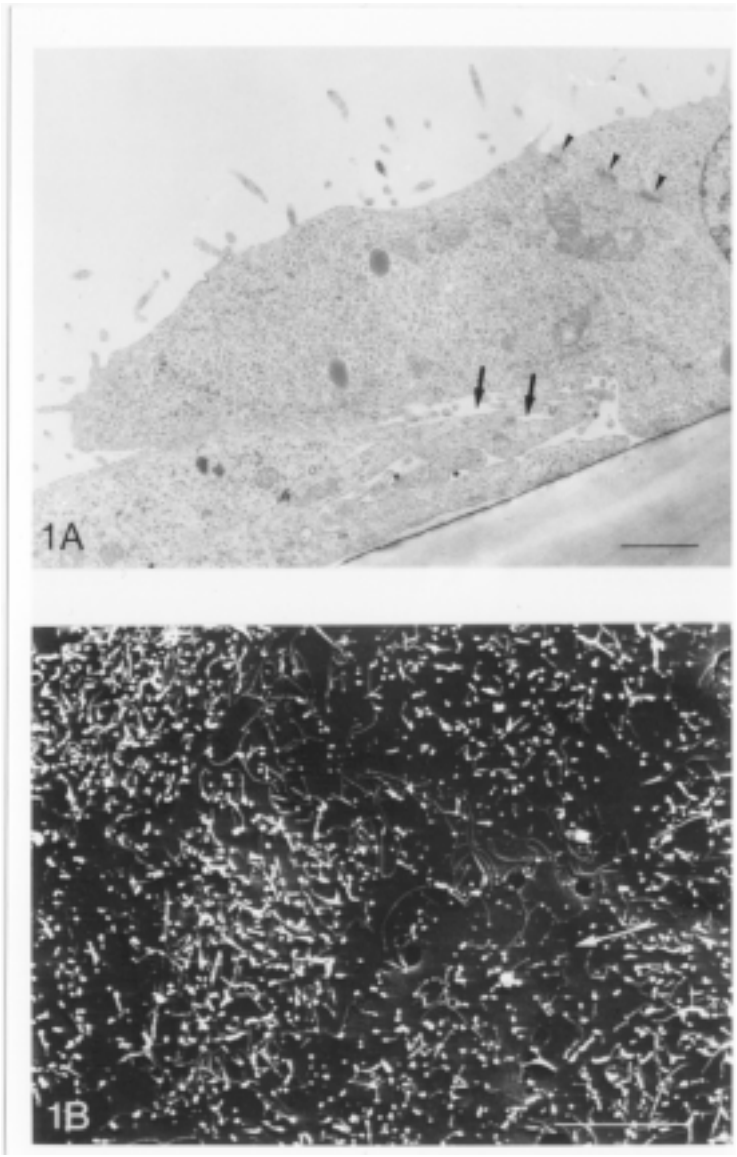


Abbildung 2: Der obere Teil der Abbildung zeigt das transmissionselektronenmikroskopischen (TEM) Bild konfluenter PT-1 Zellen. Der untere Teil des Bildes ist eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme. Ein Balken entspricht jeweils 1µm, Abbildung in Originalvergrößerung.

2.1.2 Verwendete Materialien für die Zellkultur

a) Plastikwaren

Kulturflaschen 250ml		Cellstar, 658 170
mit Filter		Cellstar, 658 175
		Greiner, Frickenhausen
Konische Polypropylenröhrchen	50 ml	Falcon, 2070
	15 ml	Falcon, 2096
		Becton Dickinson Ag, Basel

b) Kulturmedien

PT-1 Zellen:

HAMS F-12 Kulturmedium	Biochrom, München
Fetales Kälberserum	10%
	Seromed, München
G-418	1mg/ml
Penicillin	100 E/ml
Streptomycin	100µg/ml

HK-2 Zellen:

HAMS F-12 Kulturmedium	Biochrom, München
Fetales Kälberserum	10%
	Seromed, München

2.1.3 Materialien für Rezeptorbindungsstudien

a) Plastikwaren

6-Well Platten	Falcon, 3846
	Becton Dickinson AG, Basel
Zellschaber	Greiner, Nürtingen

b) Chemikalien

Trypanblau 0,5 %	Serva, Heidelberg
Trypsin (Viralex-Trypsin-EDTA)	PAA Laboratories, Austria
Trichloressigsäure (TCA)	Merck, Darmstadt

c) Puffer

Phosphatpuffer (PBS)	150 mM NaCl

	2,7 mM Kcl
	6,5 mM Na_2HPO_4
	1,5 mM KH_2PO_4
	pH 7,4
Hepes-assay-Puffer	50 mM Hepes
	120 mM NaCl
	5 mM KCl
	10 mM $CaCl_2$+H2O
	15 mM Na-Acetat+3 H_2O
	1.2 mM $MgSO_4$ +7 H_2O
	10 mM Glucose
	0,1 % BSA (Rinderserum albumin)
	pH 7,8 (NaOH)
	330 mosmol

BSA: Behring, Marburg. Andere Chemikalien Merck, Darmstadt.

2.1.4 Hormone

Biosynthetisches Humaninsulin	
unmarkiert	Eli Lilly, Bad Homburg
markiert	Hoechst AG, Frankfurt
Biosynthetisches Insulin Lispro (Humalog)	
unmarkiert	Eli Lilly, Bad Homburg
Biosythetisches Proinsulin	
unmarkiert	Eli Lilly, Indianapolis
Biosynthetisches IGF-1	
unmarkiert	Bachem, Heidelberg
markiert	Amersham Buchler, Braunschweig

Biosynthetisches Des(1-3) IGF-1

unmarkiert — Saxon, Hannover

Biosynthetisches C-Peptid

unmarkiert — Bachem, Heidelberg

2.1.5 Materialien für Proliferationsassy

a) Plastikwaren

6-Well Platten — Falcon, 3846
Becton Dickinson Ag, Basel

96-Well-Platten — Nunclon 67008
Nunc, Dänemark

b) Chemikalien

Alphakit: Physiologische NaCl - Lösung
MTT (3 (4, 5 Dimethylthiazol-2-yl) - 2, 5 diphenyl Tetrazoliumbromid)
Lösung aus Isopropanol und HCl
Biochrom, München

RCAM-Lysozym (reduced carbamoylmethylated lysozyme)

MDC (Methyl-2,5-dihydroxycinnamate

DMSO (Dimethylsulfoxid)
GIBCO BRL, Eggenstein

2.1.6 Geräte

a) Gamma Counter mit 70% Efficiency (Berthold, Krefeld)

b) Elisa-Reader der Nephrologie (Milenia, DPC, USA)

2.2 METHODEN

2.2.1 Kultivierung von PT-1 proximalen Tubuluszellen

PT-1 Zellen wachsen adhärent in 250 ml Kulturflaschen mit Filter bei 37°C und Begasung mit 8 % CO_2 in “feuchter” Kultur. Das komplette Medium besteht aus HAMS F-12, 10 % fetalem Kälberserum, Penicillin G 100 E/ml, Streptomycin 100 µg/ml und dem Antibiotikum G 418. PT-1 Zellen enthalten das bakterielleGen *neo*, welches für Resistenz gegen das toxische Antibiotikum G418 codiert. Dies dient dazu, während der Kultur entstehende Mutanten ohne

Plasmid abzutöten und die Homogenität der Zellkultur zu gewährleisten. Die viablen Zellen bilden einen einfachen Zellrasen, tote Zellen schwimmen im Medium. Mediumwechsel erfolgte dreimal in der Woche, nach einer Woche hatten sich die Zellen soweit vermehrt, daß Versuche durchgeführt werden konnten. Pro Kulturflasche waren dies 10-12 Millionen Zellen. Um die Zellen vom Boden der Kulturflasche zu lösen, wurde zuerst das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen mit 5 ml PBS-Puffer gespült und mit Trypsin beschichtet, dann 5 Minuten im Brutschrank inkubiert und mit Medium abgewaschen, um die Zellen abzulösen und das Trypsin durch im FCS enthaltenes α-1 Antitrypsin zu inaktivieren. Daraufhin erfolgte die Zellzählung in der Neubauerkammer und die Zellaussaat zu den Experimenten.

2.2.2 Kultivierung von HK-2 proximalen Tubuluszellen

Die humane Nierentubuluszellen HK-2 wachsen wie PT-1 Zellen adhärent in 250 ml Kulturflaschen als einfacher Zellrasen bei 37°C und CO_2 Begasung im feuchten Milieu. Das Kulturmedium besteht aus HAMS F 12 mit 12 % FCS. Mediumwechsel erfolgte dreimal in der Woche. Da dem Medium keine Antibiotika zugesetzt werden, ist steriles Arbeiten äußerst wichtig. Das Ablösen der Zellen geschah analog zu dem unter 2.2.2 beschriebenen Arbeiten mit PT-1 Zellen. Die Zellzahl pro Kulturflasche lag bei 4-5 Millionen Zellen.

2.3 REZEPTORBINDUNGASSAY MIT PROXIMALEN NIERENTUBULUSZELLEN

2.3.1 Einführung

Der Rezeptorbindungsassay wurde als Equilibrium-Kompetitions-Inhibitions-Assay (EKIA) durchgeführt. Hierfür benötigt man radioaktiv markiertes Hormon, unmarkiertes Hormon und Zellen, die Rezeptoren für dieses Hormon exprimieren.
Die Zellen werden bis zum Erreichen des Reaktionsgleichgewichts (steady-state) mit dem markierten Hormon (Tracer) und verschiedenen Konzentrationen des unmarkierten Hormons in einem Reaktionsgefäß inkubiert. Das Gleichgewicht setzt sich aus Assoziations- und Dissoziationrate von Hormon und Rezeptor zusammen. Rezeptoren hoher Affinität binden Hormon sehr schnell und lassen es langsam abdissoziieren, bei Rezeptoren niedriger Affinität kehrt sich dieses Verhältnis um. Die Reaktion läßt sich mit folgender Formel beschreiben:

Hormon + Rezeptor ⇔ Hormon - Rezeptor - Komplex

Die Zeit bis zur Einstellung des Reaktionsgleichgewichtes hängt neben den Bindungs- eigenschaften des Hormons zu seinem Rezeptor von vielen weiteren Faktoren ab. Die Inkubationstemperatur und -zeit spielt dabei eine entscheidende Rolle. Werden optimale Bedingungen gewählt, kommt es zu einer maximalem Ausbildung von Hormon - Rezeptor - Komplexen. Weiterhin spielt das Gleichgewicht des pH, die Ionenzusammensetzung, die Osmolalität des Puffers und das Reaktionsmilieu eine wichtige Rolle (DEMEYTS et al. 1976, WALBROECK 1982). Um Ergebnisse verschiedener Versuche vergleichen zu können, müssen die Versuchsbedingungen möglichst konstant gehalten werden.

2.3.2 Vorbereitung der Zellen

Die Kultivierung erfolgte wie unter 2.2.1. und 2.2.2 beschrieben, anschließend wurden die Zellen mit einer Zellzahl von 500.000 Zellen und 2 ml Medium mit fetalem Kälberserum (10%) pro Loch in 6 Well - Platten ausgesät. Nach 48 Stunden Vermehrung im Brutschrank hatte sich die Zellzahl in den einzelnen Löchern auf 800.000 bis 1.2 Mio. Zellen erhöht. Der Überstand mit Medium wurde abgesaugt und die Zellen zweimals mit 20° C warmem Hepes - Assay - Puffer gewaschen, um im Medium enthaltenes Hormon und tote Zellen zu entfernen. Zurück bleibt der einschichtige Zellrasen vitaler Zellen.

2.3.3 Zellzählung und Lebendrate

Um die Zellzahl bestimmen zu können wurden die Zellen eines Lochs mit 300µl Trypsin geschwenkt, das Trypsin abgesaugt und für 5 Minuten im Brutschrank inkubiert, anschließend in 1ml Medium suspendiert. 50 µl dieser Zellsuspension wurden mit 50 µl Trypanblaulösung vermischt und nach kurzer Inkubationszeit in die Neubauer-Kammer (Hämocytometer) pipettiert. Hier wurden die vier großen randständigen Felder ausgezählt, wobei die blau gefärbten Zellen den toten entsprachen. Die Zellzahl pro ml ergab sich aus der Zellzahl multipliziert mit mit dem Verdünnungsfaktor, der sich folgendermaßen errechnet:

2.5	x	(4 Felder a 16 Quadrate)
2	x	(Verdünnung mit Trypanblau)
1000	x	(Faktor der Zählkammer)
	= 5.000	

Die Viabilität (Lebendrate) ergibt sich aus dem Quotienten der Differenz von Gesamtzellzahl minus den toten Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl mulitipliziert mit 100. Dieser Wert lag bei den Bindungsversuchen zwischen 90 und 95 %.

$$\text{Lebendrate} = \frac{\text{Zellzahl - tote Zellen}}{\text{Zellzahl}} \qquad \text{(Gleichung 1)}$$

2.3.4 Kompetitionsassay

Die Reagenzien wurden in die einzelnen Löcher der 6-Well-Platten mit den Nierentubuluszellen pipettiert. Es wurden zugegeben:

1.) 100 µl entsprechender Tracer ^{125}I-Insulin oder ^{125}I-IGF-1 in einer Endkonzentration von 10 pM (bei einer spezifischen Aktivität von 200 µCi / µg etwa 25.000 cpm / ml).

2.) 100 µl unmarkiertes Hormon entsprechend der jeweiligen Verdrängungskonzentration pro Ansatz in folgender Endkonzentration:

Zugabekonzentration	/	Endkonzentration
0.1 nM	/	0.01 nM
1 nM	/	0.1 nM
3 nM	/	0.3 nM
10 nM	/	1 nM
30 nM	/	3 nM
0.1 µM	/	0.01 µM
1 µM	/	0.1 µM

3.) 800 µl Hepes-Assay-Puffer

Die Inkubationstemperatur und -zeit betrug bei Insulin und IGF-1 20° C und dauerte 120 Minuten.

2.3.5 Bestimmung von gebundenem und freiem Hormon

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Überstand abgesaugt, die Zellen noch zweimal vorsichtig mit jeweils 1 ml eiskaltem Puffer gewaschen, um nicht gebundenen Tracer zu entfernen, diese 3 ml wurden in das Röhrchen Nr. 1 pipettiert. Dann wurden die Zellen sorgfältig mit einem Zellschaber abgeschabt, in 1 ml Puffer suspendiert und abgesaugt, dies wurde

nochmals wiederholt und alle Zellen in das Röhrchen Nr. 2 pipettiert. In das Röhrchen Nr. 1 mit freiem Hormon wurde eiskalte Trichloressigsäure bis zu einer Endkonzentration von 10 % gegeben. Diese Konzentration genügt, intaktes Hormon zu fällen. Anschließend erfolgte die Zentrifugation in auf 4° C vorgekühlter Zentrifuge bei 3000 rpm für 10 Minuten. Im Pellet befindet sich dann das intakte Hormon und im Überstand die degradierten Insulinfragmente (RYAN et al. 1984, YAGIL et al. 1988). Der Überstand wurde vorsichtig in ein drittes Röhrchen abgegossen. In einem Gamma Counter (efficency 85%, Firma Berthold) wurden dann alle Proben jeweils 10 Minuten gemessen.

2.3.6 Auswertung und Darstellung der Bindungsdaten

Die als Kompetitions-Inhibitions-Assay unter steady-state Bedingungen gemessenen Bindungsdaten wurden in Prozent der angebotenen Gesamtaktivität umgeformt und gegen die Konzentration des unmarkierten Liganden aufgetragen.

$$\% B = \frac{B}{T} \times 100 \qquad \text{(Gleichung 2)}$$

wobei B = gebundenes Hormon und T = Gesamtaktivität bedeutet.
Die sich dabei ergebenden sigmoidalen Bindungsbeziehungen werden Kompetitions-Inhibitions-Kurven genannt. Da sich Tracerhormon und unmarkiertes Hormon identisch gegenüber dem Rezeptor verhalten (LINDE et al. 1982), sind die spezifische Aktivität des Hormons im Überstand und in zellgebundener Form gleichzusetzen. Damit kann die Fraktion des radioaktiven Anteils jeder Phase als Maß für die Gesamtaktivität angenommen werden und ermöglicht so die Bestimmung der Anzahl an Bindungsstellen pro Zelle. Diejenige Hormonkonzentration, bei welcher gerade 50 % des gebundenen, markierten Hormons verdrängt wird (B_0 / 2) bezeichnet man als **IC_{50}** (halbmaximale Bindung). Dieser Wert wurde von einem Computerprogramm nach der Formel von CHENG und PRUSOFF (1973) berechnet (Gleichung 3):

$$IC_{50}\,[M] = \frac{B \times I}{B_0 - B} \qquad \text{(Gleichung 3)}$$

wobei B=gebundenes Hormon, B_0=maximale Bindung und I unmarkiertes Hormon bedeutet.

Manche Autoren geben die Rezeptoraffinität als **K_d**-Wert an. Subtrahiert man die Konzentration des radioaktiven Liganden (0.01 nM) von der IC_{50}, erhält man die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_d des Radioliganden als Maß der mittleren Rezeptoraffinität (CHENG und PRUSOFF 1973). Die Angabe des K_d-Wertes ist nur bei Verdrängung mit dem homologen Hormon und hochaffiner Bindung sinnvoll, da die Konzentration des Radioliganden bei kompetitiven Bindungsstudien sehr gering ist. Bei hohen Konzentrationen des kompetitiven Hormons spielt die Konzentration des Radioliganden nur eine sehr geringe Rolle. Der K_d-Werte wird bei der Darstellung der Bindungsdaten nach SCATCHARD (1949) (siehe nächsten Abschnitt) verwendet und wurde mittels des Computerprogrammes zur Auswertung der Bindungsdaten berechnet.

Die Darstellung der Bindungsdaten nach SCATCHARD (1949) erfolgte zur Bestimmung von Affinität und Rezeptorkonzentration (Bindungsstellen pro Zelle). Hierbei wird auf der Ordinate das Verhältnis gebundenes (B) zu freiem (F) Hormon, auf der Abszisse der gebundene Anteil der insgesamt zugesetzten Hormonmenge. Der Schnittpunkt der Kurve mit der mit der Abszisse (R_0) entspricht der Menge gebundenen Hormons und damit der Anzahl der Bindungsstellen unter der Vorstellung, daß jeder Rezeptor nur ein Hormonmolekül bindet. Aus dem Wert von R_0 kann unter Einbeziehung der Avogadroschen Konstante die Zahl der Rezeptoren (Rz) pro Zelle abgeleitet werden (Gleichung 4):

$$Rz = \frac{[\,R_0\,] \times 6.022 \times 10^{23}}{ZZ} \qquad \text{(Gleichung 4)}$$

R_0 steht für die molare Konzentration der Rezeptoren pro Liter und ZZ für Zellzahl pro Liter.
Der negative Kehrwert der Steigung der Kurve entspricht bei linearem Verlauf der Affinität der Bindung zwischen Ligand und Rezeptor und wird durch den oben angesprochenen K_d-Wert angegeben. Jedoch weisen viele Hormone ein nicht lineares Bindungsprofil auf. Diesem Phänomen kann die Heterogenität der Bindungsstellen an der Einzelzelle oder in der Population, die negative Kooperativität der Rezeptoren, eine Modifikation der Bindung durch partiell degradierte Hormonfragmente, die Heterogenität oder Aggregation des Liganden oder eine

unterschiedliche Down-Regulation mit der Folge einer differenten Rezeptorbesetzung und Internalisierung zugrunde liegen.

Das zur Auswertung der Bindungsdaten verwendete Computerprogramm berücksichtigt die Interaktion des Liganden mit verschieden Bindungsstellen (one and two-site-model) und errechnet die entsprechenden Bindungsdaten nach dem CHENG- und PRUSOFF- Verhältnis (CHENG und PRUSOFF 1973) und nach SCATCHARD (1949). Dieses Programm (RRA für IBM-kompatible Personalcomputer) wurde im Bereich Zentrale Isotopenanwendung der Universität Ulm entwickelt.

Problematisch bei der Auswertung von Bindungsdaten ist die unspezifische Bindung, die durch Bindung des Tracers an Zelltrümmer, Membranstukturen, Internalisierung und Bindung an das Inkubationsröhrchen zustande kommt. Die unspezifische Bindung wurde bei diesen Versuchen durch Verdrängung mit 1 µM kaltem Hormon ermittelt und alle Daten auf die spezifische Bindung korrigiert.

2.3.7 Degradation

Jedes Hormon zerfällt natürlicherweise als Funktion der Zeit, Temperatur und pH-Wert haben ebenfalls Einfluß. Die Degradation ist jedoch auch Ergebnis von intrazellulärem lysosomalem Abbau, wobei dies Ausdruck der Rezeptoraktivität und Internalisation des Hormon-Rezeptorkoplexes ist. Die einfachste und kostengünstigste Methode zur Bestimmung der Degradation ist die Fällung zerfallener Hormonmoleküle mittels Trichloressigsäure (RYAN et al. 1984). Die Methodik der TCA-Fällung wurde oben im Rahmen der Versuchsdurchführung beschrieben. Die Berechnung der Degradation erfolgte nach folgender Formel:

$$D\ (\text{in } \%) = \frac{D \times 100}{T} \qquad \text{(Gleichung 5)}$$

wobei D die Counts der degradierten Traceraktivität und T die Gesamtaktivität angibt.

Jedes [^{125}I]-markierte Proteohormon zeigt einen natürlichen Zerfall, der als Basisdegradation bezeichnet wird. Diese Basisdegradation ist eine Funktion der Zeit und der Temperatur. Je geringer der Meßwert der Basisdegradation, desto höher ist der Anteil des intakten Hormons

anzunehmen. Bei der Ergebnisdarstellung wurde die Basisdegradation, welcher jedes radioktiv markierte Proteohormon unterliegt, in die Abbildungen eingezeichnet. So ist die “spezifische Degradation”, welche durch den Rezeptor vermittelt wird, abgrenzbar.

2.4 PROLIFERATIONSASSY

2.4.1 Nichtradioaktiver Proliferationsassay

Die Grundlage für diese Methode ist die Umwandlung von Tetrazolium - Salz MTT (3 (4, 5 Dimethylthiazol-2-yl) - 2, 5 diphenyl-Tetrazoliumbromid) mittels mitochondrialer Dehydrogenasen in den wasserunlöslichen Farbstoff Formazan. Da proliferierende Zellen eine höhere Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen aufweisen, kann dieser Test als indirekter Nachweis der Zellproliferation verwendet werden (VORAUER et al. 1996, NI und HOLLANDER 1996). Der Vorteil dieser Methode gegenüber dem [^{3}H]Thymidineinbau liegt in der apparativ weniger aufwendigen Mehodik (kein Isotopenlabor notwendig) und dem nicht entstehenden radioaktiven Abfall.

Die Zellen wurden wie unter 2.2.1 und 2.2.2 beschrieben in Suspension gebracht, zentrifugiert und in serumfreiem Medium resuspendiert, dieser Waschvorgang wurde noch einmal wiederholt. Dann wurden die Zellen in der Neubauer-Kammer gezählt und mit serumfreiem Medium so verdünnt, daß in 90 µl 30.000 Zellen enthalten waren. Diese 90 µl wurden dann in je ein Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert und 10 µl der jeweiligen Faktoren zugegeben. Die Endkonzentration der Hormone betrug 0.1 µM und 1nM. Es wurden pro Versuch drei Mikrotiterplatten angefertigt und in Zeitabständen von 24, 48 und 72 Stunden gemessen. Die Chemikalien zur Messung stammen vom Biochrom-Alphakit. In jedes Loch der Platte wurden 30 µl Tetrazolium - Salz gegeben, die Platte geschüttelt und 150 Minuten im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubatioszeit wurde der Überstand vorsichtig abgegossen und jedes Loch mit physiologischer Kochsalzlösung gespült, dann die Platte 30 Minuten lang bei 37° C getrocknet. Nun wurden die Zellen lysiert und das neugebildete wasserunlösliche Formazan durch Isopropanol in Lösung gebracht. Die Messung erfolgte photometrisch in einem ELISA-Reader der Nephrologie bei einem Absorptionsmaximum von 570 nm.

2.4.2 Proliferationsassay mit Tyrosinkinaseinhibitoren

Die Signaltransduktion nach Bindung von Insulin und IGF-1 an den Rezeptor erfolgt durch Autophosphorylierung intrazellulärer Tyrosinkinasen. Dieser Vorgang läßt sich durch Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) hemmen. Um die Wirkung von Tyrosinkinase-inhibitoren bei gleichzeitiger Inkubation mit Insulin und IGF-1 zu untersuchen, wurden RCAM-Lysozym (reduced carbamoylmethylated lysozyme) und MDC (Methyl-2,5dihydroxycinnamate, ein Erbstatinanalogen) verwendet. RCAM-Lysozym ist ein Substrat der Tyrosinkinase des Insulinrezeptors (JANICOT et al. 1991) und inhibiert diese. MDC ist ebenfalls ein kompetitiver Inhibitor intrazellulärer Tyrosinkinasen von Wachstumsfaktoren wie IGF-1, EGF, HGF und PDGF (JACOBS et al. 1983). Zu den Versuchen wurden jeweils 100 000 PT-1 Zellen/Well in eine 6-Well Platte ausgesät. Medium mit Insulin und IGF-1 wurden entweder allein oder in Kombination mit TKI zugegeben und 48 Stunden im Brutschrank inkubiert. Die Endkonzentration an Wachstumsfaktoren pro Well betrug 1nM, die der Tyrosinkinaseinhibitoren RCAM-Lysozym 0,01, 0,1, 1 µM und MDC 1, 10 und 100µM. Lösungsmittel der TKIs war Dimethylsulfoxid (DMSO), welches in gleicher Menge zu den Kulturmedium der Kontrollzellen zugegeben wurde. Nach der 48stündigen Inkubation wurden die Zellen zweimal mit PBS-Puffer abgespült und nach der oben beschriebenen Methode mit Trypsin abgelöst. Die Auszählung erfolgte in einem elektronischen Counter (Coulter Counter, Krefeld).

2.5 STATISTIK

Wenn nicht anders angegeben, sind die Daten als arithmetischer Mittelwert mit einer Standardweichung (±SD) aus mindestens 3 bis 6 voneinander unabhängigen Experimenten errechnet.

Um die statistische Signifikanz zu bestimmen, wurde bei normalverteilten Daten der T-Test für unverbundene Stichproben durchgeführt. Ein p-Wert, welcher unter 0,05 liegt, wird als signifikant bezeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 REZEPTORBINDUNGSSTUDIEN

Um die Bindungsstellen für Insulin und IGF-1 zu charakterisieren wurden die Affinität, die Bindungskapazität und die Spezifität der Bindung untersucht. Die Bindungsstudien wurden als Kompetitions-Inhibitionsassay durchgeführt. Zu konstanter Zellzahl und einer gleichbleibenden Menge an Radioligand wurden steigende Konzentrationen unmarkierter Liganden zugegeben. Es ergibt sich eine typische Kompetitionskurve, aus welcher die Hormonkonzentration mit halbmaximaler Bindung und Tracerverdrängung, die IC_{50}, ermittelt werden kann. Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_d des Tracers als Maß der mittleren Rezeptoraffinität wurde im Falle der Inhibition durch homologe Liganden bestimmt. Alle Bindungsdaten wurden mittels eines Multiligand-Rezeptorprogrammes bestimmt und ausgewertet (JEHLE et al. 1996c). Die Experimente sind als Mittelwerte ± SD angegeben. Für die folgenden Bindungsversuche wurden PT-1 und HK-2 Zellen in Falcon-Multiwell-Kulturplatten ausgesät. Nach 48 Stunden im Brutschrank waren die Zellen als konfluenter einschichtiger Zellrasen gewachsen und konnten für die Bindungsassays verwendet werden.

3.1.1 Bindung von Insulin an PT-1-Zellen

Die kompetitive Verdrängung von [^{125}I]-Insulin durch verschiedene Wachstumsfaktoren an PT-1 Zellen (Kaninchen) ist in Abbildung 3 zu sehen. Insulin und Lispro verdrängten [^{125}I]-Insulins schon in niedrigen Konzentrationen vom Rezeptor, banden also hochaffin. Zwischen Insulin und Lispro bestand kein signifikanter Unterschied in der Verdrängung. IGF-1, Des(1-3)IGF-1 und Proinsulin verdrängten in höheren Konzentrationen. Die Bindungsdaten sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. C-Peptid bewirkte keine Verdrängung des [^{125}I]-Insulins vom Rezeptor, es wurde eine Bindungszunahme des Insulins bei 1 nM und 3 nM C-Peptid gemessen. Diese Zunahme war jedoch nicht signifikant. Stellt man die Affinität der Insulinbindungsstellen an PT-1 Zellen absteigend geordnet dar, ergibt sich folgende Reihenfolge: Insulin>>Proinsulin>IGF-1. Die Analyse der Rezeptorenzahl ergab 16.810 ± 3990 Rezeptoren pro Zelle. Die maximale spezifische Bindung von Insulin pro einer Million Zellen betrug 1,3 ± 0,2%.

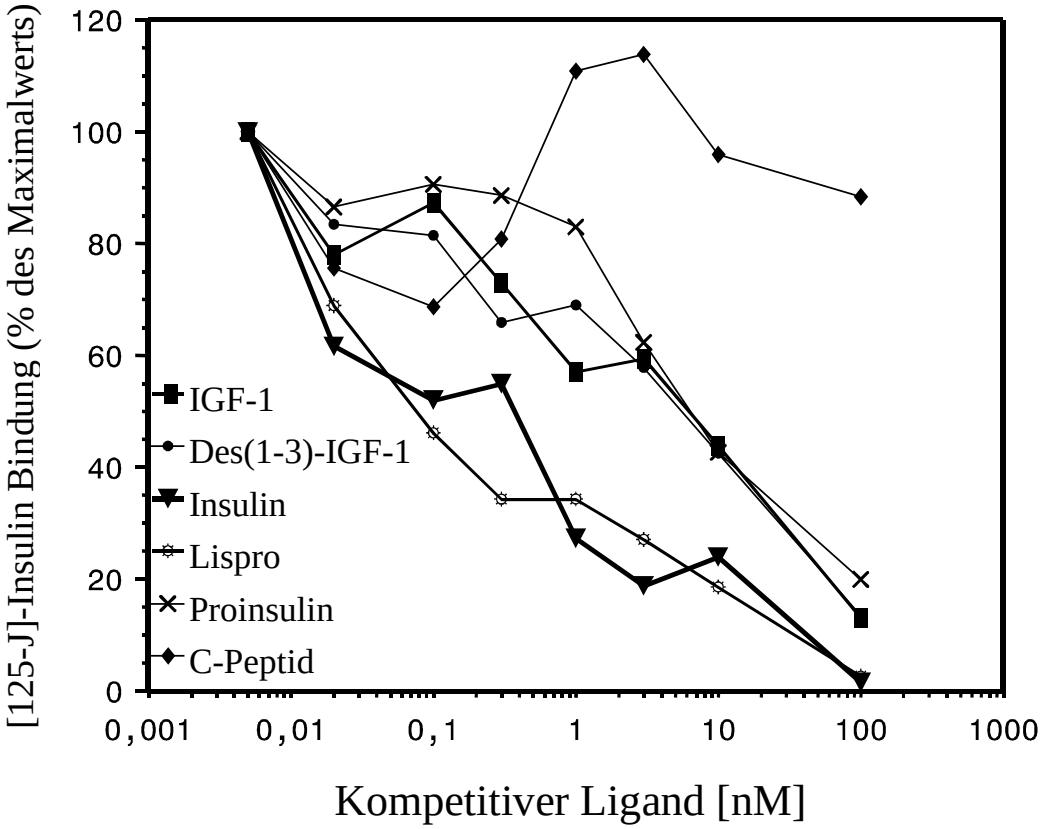


Abbildung 3: Spezifität der Insulinbindung an PT-1 Zellen. Kompetitive Verdrängung radioaktiv markierten Insulins mit Insulin, Lispro, IGF-1, Des(1-3)IGF-1, Proinsulin und C-Peptid. Mittelwerte aus 5 Versuchen.

Tabelle 1: Bindungsdaten von [^{125}I]-Insulin an PT-1 Zellen bei Verdrängung durch verschiedene Wachstumsfaktoren (Mittelwerte aus 5 Versuchen):

Hormon	IC_{50} [nM] ± SD	K_d [nM] ±SD	Signifikanz
Insulin	0,9 ± 0,4	3,8 ±0,9	
Lispro	1,2 ± 1	2,3 ±2,4	
IGF-1	16,5 ± 15,2		p < 0,02 Insulin vs. IGF-1
Des(1-3)IGF-1	12,9 ± 10,8		p < 0,02 Insulin vs. DesIGF-1
Proinsulin	11,1 ± 3,9		p < 0,01 Insulin vs. Proinsulin
C-Peptid	--		keine Verdrängung

3.1.2 Bindung von Insulin an HK-2-Zellen

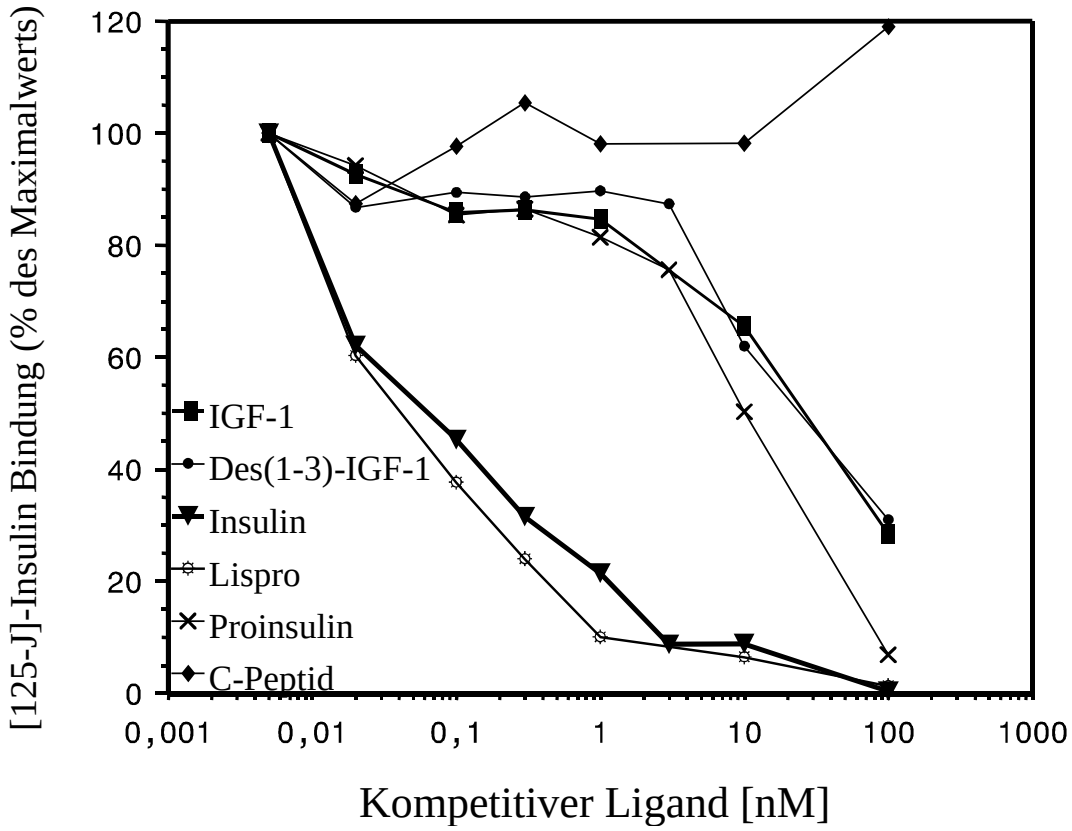


Abbildung 4: Spezifität der Insulinbindung an HK-2 Zellen. Kompetitive Verdrängung radioaktiv markierten Insulins mit Insulin, Lispro, IGF-1, Des(1-3)IGF-1, Proinsulin und C-Peptid. Mittelwerte aus 4 Versuchen.

Die kompetitive Verdrängung von [^{125}I]-Insulin durch verschiedene Wachstumsfaktoren an menschlichen HK-2 Zellen ist in der Abbildung 4 zu sehen. Insulin und Lispro verdrängen bei sehr niedrigen Konzentrationen halbmaximal. Zwischen Insulin und Lispro bestand kein signifikanter Unterschied in der Verdrängung. Proinsulin verdrängte bei 10fach höherer Konzentration. IGF-1 und Des(1-3)IGF-1 verdrängten deutlich schlechter. Die Bindungsdaten sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Bei Inkubation mit 0,3 und 100 nM C-Peptid wurde eine Zunahme der [^{125}I]-Insulinbindung gemessen. Diese war jedoch nicht signifikant. Stellt man die Affinität der Insulinbindungsstellen an HK-2 Zellen absteigend geordnet dar, ergibt sich folgende Reihenfolge: Insulin>>Proinsulin>IGF-1. Die spezifische Bindung wurde für Insulin mit 3,4 ± 0,9 % ermittelt, die Analyse der Rezeptorenzahl ergab 16.370 ± 7860 Rezeptoren pro Zelle.

Tabelle 2: Bindungsdaten von [^{125}I]-Insulin an HK-2 Zellen bei Verdrängung durch verschiedene Wachstumsfaktoren (Mittelwerte aus 4 Versuchen):

Hormon	IC_{50} [nM] ± SD	K_d [nM] ±SD	Signifikanz
Insulin	0,3 ± 0,2	1,5 ± 0,8	
Lispro	0,08 ± 0,02	1,3 ± 1	
IGF-1	37,4 ± 11,4		p < 0,02 Insulin vs. IGF-1
Des(1-3)IGF-1	34,3 ± 11		p < 0,02 Insulin vs. DesIGF-1
Proinsulin	11,6 ± 1,6		p < 0,01 Insulin vs. Proinsulin
C-Peptid	--		keine Verdrängung

3.1.3 Bindung von IGF-1 an PT-1-Zellen

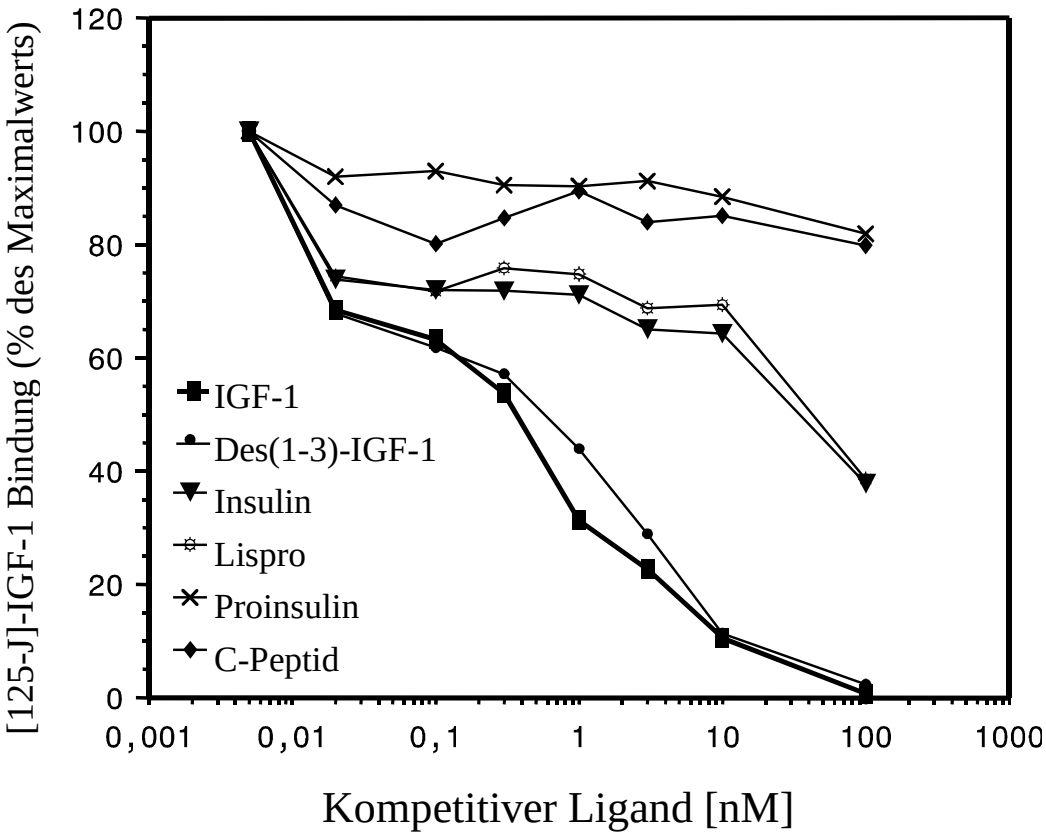


Abbildung 5: Spezifität der IGF-1 Bindung an PT-1 Zellen. Kompetitive Verdrängung von radioaktiv markiertem IGF-1 mit IGF-1, Des(1-3)IGF-1, Insulin, Lispro, Proinsulin und C-Peptid. Mittelwerte aus 4 Versuchen.

Die kompetitive Verdrängung von [^{125}I]-IGF durch IGF-1 und verschiedene Wachstumsfaktoren an PT-1 Zellen (Kaninchen) ist in Abbildung 5 dargestellt. IGF-1 und Des(1-3) weisen eine

ähnlich hohe Affinität auf und verdrängten schon bei niedrigen Konzentrationen halbmaximal. Insulin und Lispro verdrängten bei einer 100fach höheren Konzentration halbmaximal. Proinsulin und C-Peptid konnten den Tracer praktisch nicht verdrängen. Die Bindungsdaten sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. Die spezifische Bindung von IGF-1 an PT-1 Zellen lag bei 23,8 ± 4,2%, die Analyse der Rezeptorenzahl ergab 165.450 ± 5240 Rezeptoren pro Zelle.

Tabelle 3: Bindungsdaten von [^{125}I]-IGF-1 an PT-1 Zellen bei Verdrängung durch verschiedene Wachstumsfaktoren (Mittelwerte aus 4 Versuchen):

Hormon	IC_{50} [nM] ±SD	K_d[nM] ±SD	Signifikanz
IGF-1	1,1 ± 0,3	1,7 ± 0,1	
Des(1-3)IGF-1	1,7 ± 0,4	1,7 ± 0,2	
Insulin	100 ± 7		p < 0,01 IGF-1 vs. Insulin
Lispro	103 ± 23		p < 0,01 IGF-1 vs. Lispro
Proinsulin	1.580 ± 1.000		p < 0,001 IGF-1 vs. Proinsulin
C-Peptid	1.450 ±1.200		p<0,001 IGF-1 vs. C-Peptid

3.1.4 Bindung von IGF-1 an HK-2-Zellen

Die Verdrängung von [^{125}I]-IGF durch 6 verschiedene Wachstumsfaktoren an HK-2 Zellen (Mensch) ist in Abbildung 6 vergleichend dargestellt. IGF-1 und Des(1-3) weisen eine hohe Affinität zu den Bindungsstellen auf, ein signifikanter Unterschied zwischen den Faktoren ergab sich nicht. Insulin und Lispro benötigten eine 100fach höhere Konzentration zur halbmaximalen Verdrängung. Für Proinsulin und C-Peptid ließ sich keine Verdrängung nachweisen. Die Bindungsdaten sind in Tabelle 4 zusammengefaßt. Die spezifische Bindung von IGF-1 an HK-2 Zellen lag bei 13,2 ± 11,7 %, die Analyse der Rezeptorenzahl ergab 25.643 ± 3350 Rezeptoren pro Zelle.

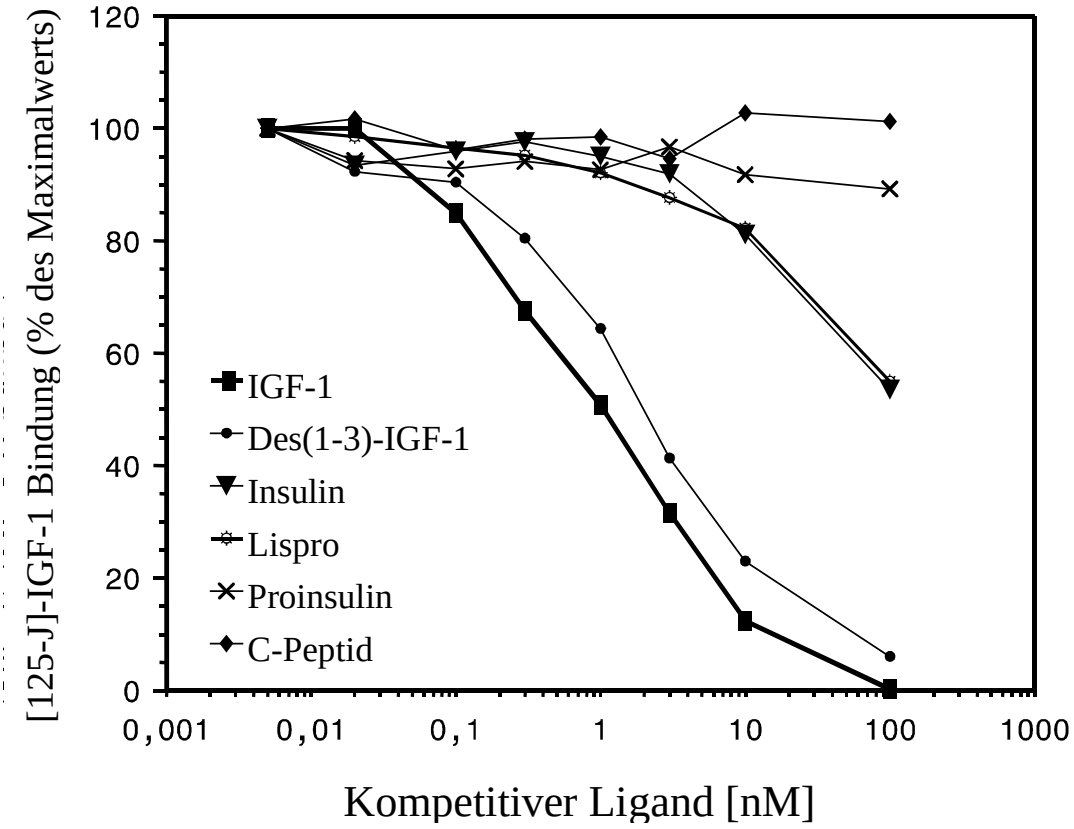


Abbildung 6: Spezifität der IGF-1 Bindung an HK-2 Zellen. Kompetitive Verdrängung von radioaktiv markiertem IGF-1 mit IGF-1, Des(1-3)IGF-1, Insulin, Lispro, Proinsulin und C-Peptid. Mittelwerte aus 4 Versuchen.

Tabelle 4: Bindungsdaten von [^{125}I]-IGF-1 an HK-2 Zellen bei Verdrängung durch verschiedene Wachstumsfaktoren (Mittelwerte aus 4 Versuchen):

Hormon	IC_{50} [nM] ± SD	K_d[nM] ±SD	Bemerkungen
IGF-1	1,3 ± 0,5	1,4 ± 0,4	
Des(1-3)IGF-1	2,5 ± 0,7	1,2 ± 0,5	
Insulin	125 ± 14		p < 0,01 IGF-1 vs. Insulin
Lispro	113 ± 33		p < 0,01 IGF-1 vs. Lispro
Proinsulin	--		Keine Verdrängung
C-Peptid	--		Keine Verdrängung

Tabelle 5: Vergleich der Bindungsdaten von Insulin und IGF-1 an PT-1 und HK-1 Zellen (Mittelwerte aus 4-6 Versuchen)

Zellen	**PT-1 (Kaninchen)**		**HK-2 (Mensch)**	
Hormon	**Insulin**	**IGF-1**	**Insulin**	**IGF-1**
Spez. Bindung (%) ± SD	1,3 ± 0,2	23,8 ± 4,2	3,4 ± 0,9	13,2 ± 11,7
IC_{50} [nM] ± SD	0,9 ± 0,4	1,1 ± 0,3	0,3 ± 0,2	1,3 ± 0,5
Rezeptoren/Zelle ± SD	16.810 ± 3990	165.450 ± 5240	16.370 ± 7860	25.643 ± 3350
K_d[nM] ± SD	3,8 ± 0,9	1,7 ± 0,1	1,5 ± 0,8	1,4 ± 0,4

3.1.5 Scatchard-Analyse der Insulinbindung an PT-1 und HK-2 Zellen

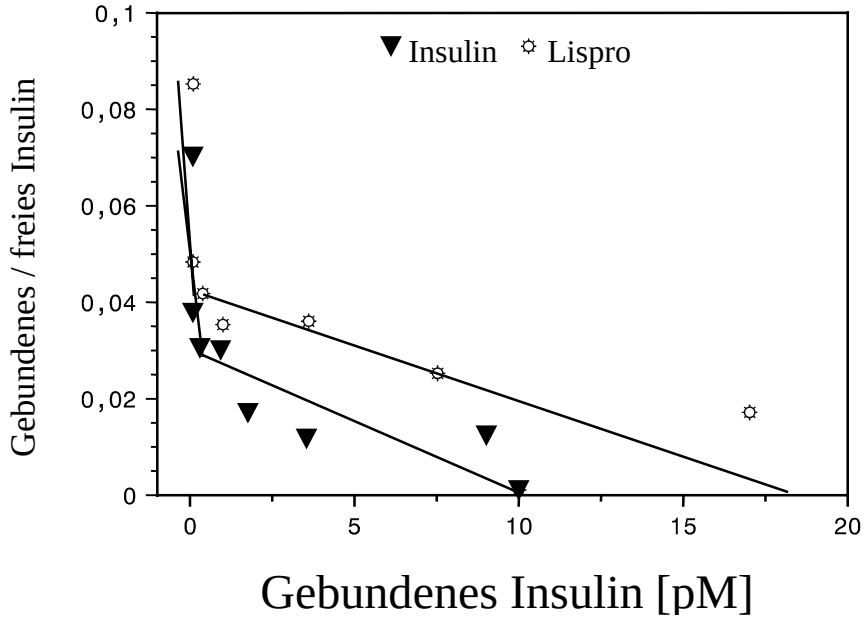


Abbildung 7: Scatchard-Plot der Insulinbindung an PT-1 Zellen. Vergleich von Humaninsulin und Lispro. Mittelwerte aus 5 Versuchen.

In Abbildung 7 ist der Scatchard-Plot der Insulinbindung an PT-1 Zellen dargestellt. Die Kurve zeigt einen für Insulinrezeptoren typischen gekrümmten Verlauf. Der steile Kurvenabschnitt stellt Bindungsstellen hoher Affinität und niedriger Kapazität dar, der flache Kurvenabschnitt Bindungsstellen niedriger Affinität und hoher Kapazität. Die Dissoziationskonstante K_d wird

aus dem negativen Kehrwert der Steigung der Kurve berechnet, der Schnittpunkt der Kurven mit der x-Achse ergibt die Anzahl der Bindungsstellen. Die Kurven wurden mit dem Multiligand-Rezeptorprogramm ausgewertet. Die Kurven von Insulin und Lispro verlaufen im hochaffinen Bereich fast identisch (K_d Insulin 3,8 ± 0,9 nM, K_d Lispro 2,3 ± 2,4 nM). Im niedrig affinen Bereich unterschieden sich Insulin (K_d 745 ± 87 nM) und Lispro (K_d 798 ± 86 nM) vor allem in der Anzahl der Bindungsstellen. Dieser Unterschied war nicht signifikant.

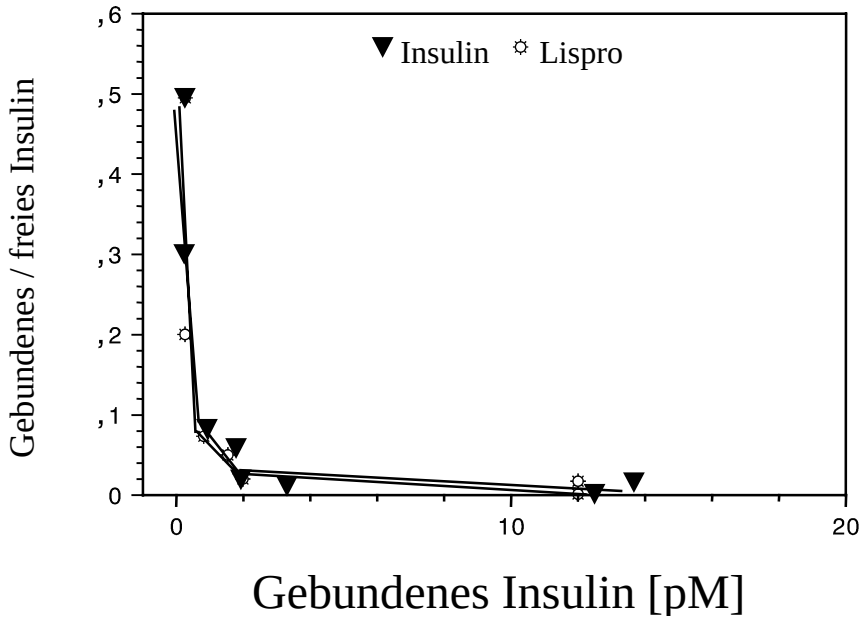


Abbildung 8: Scatchard-Plot der Insulinbindung an HK-2 Zellen. Vergleich von Humaninsulin und Lispro. Mittelwerte aus 4 Versuchen.

In Analogie zu Abbildung 7 ist in Abbildung 8 der Scatchard-Plot der Insulinbindung an HK-2 Zellen dargestellt. Die Kurve verläuft für Insulin und Lispro nicht linear. Im hochaffinen Bereich liegt der K_d-Wert von Insulin bei 1,3 ± 1 nM, der K_d-Wert von Lispro bei 1,5 ± 0,8 nM. Im niedrigaffinen Bereich lagen die K_d-Werte von Insulin bei 589 ± 76 nM, die von Lispro bei 602 ± 67 nM und zeigten so ein fast identisches Bindungsprofil.

3.2 DEGRADATION VON INSULIN

Die Degradation ist neben der Bindungsaffinität ein weiterer Hinweis für eine spezifische Rezeptorbindung und Wirkung. Nach Rezeptorbindung wird das Hormon internalisiert und degradiert. Diese Degradation wurde bei beiden untersuchten Zellreihen gemessen.

3.2.1 Degradation an PT-1 Zellen

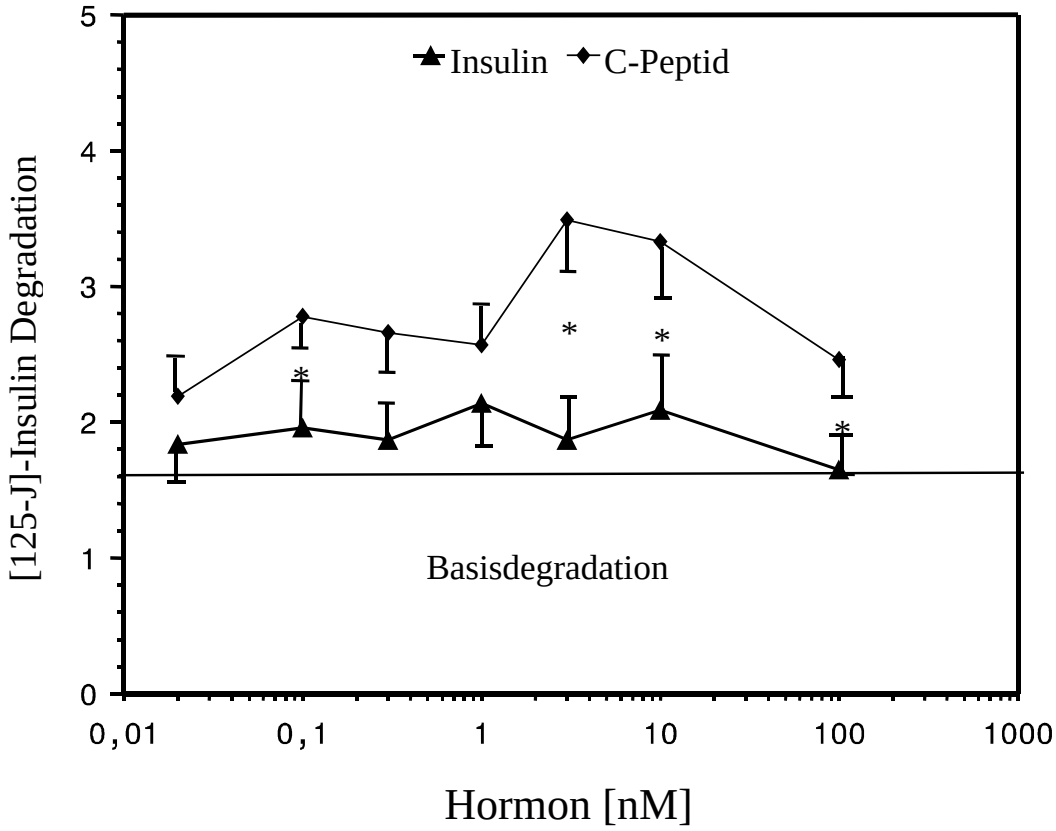


Abbildung 9: Relative Degradation von [^{125}I]-Insulin an PT-1 Zellen (bezogen auf die Gesamtcounts). Mittelwerte aus 5 Experimenten (± SD, *= $p<0,05$).

Trägt man die Degradation (gemessen in % der Gesamtcounts) gegen die steigende Konzentration verschiedener Hormone auf, ergibt sich bei PT-1 (Kaninchen) Zellen die in Abbildung 9 dargestellte Konstellation. Die Basisdegradation betrug 1,6 %. Die Insulindegradation ließ sich durch Verdrängung mit Insulin beeinflussen, bei einer Konzentration von 100 nM kaltem Insulin wurde keine Degradation gemessen, die Degradation war hier gleich der Basisdegradation. Mit Lispro wurden sehr ähnliche Werte gemessen. Proinsulin erniedrigte die Insulindegradation, konnte die Degradation jedoch auch in hohen Konzentrationen nicht ganz inhibieren. IGF-1 und Des(1-3)IGF-1 hatten keinen Einfluß auf die Degradation. C-Peptid hingegen steigerte die Degradation im Vergleich zu den jeweiligen Insulinkonzentrationen signifikant (jeweils 0,1 nM, 3 nM, 10 nM und 100nM C-Peptid, $p<0,05$). Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden in Abbildung 9 nur die Werte für Insulin und C-Peptid aufgetragen.

3.2.2 Degradation an HK-2 Zellen

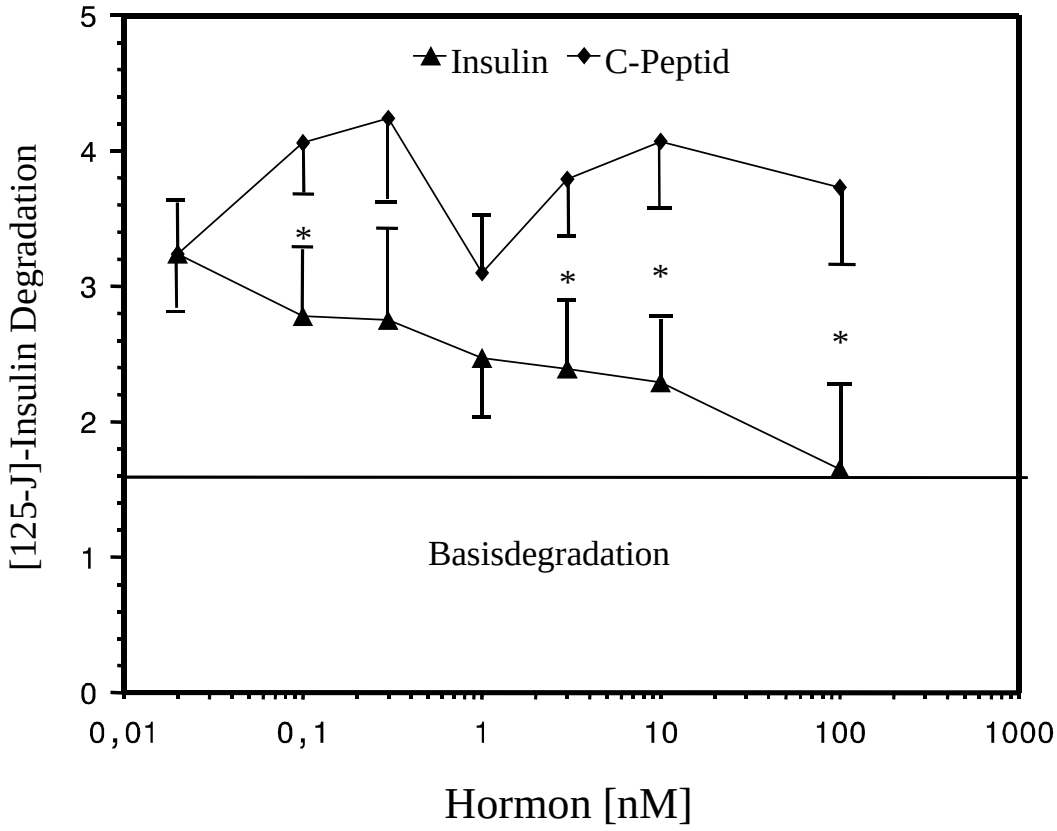


Abbildung 10: Relative Degradation von [^{125}I]-Insulin an HK-2 Zellen (bezogen auf die Gesamtcounts), Mittelwerte aus 4 Experimenten (± SD, *= p<0,05).

Die Insulindegradation an HK-2 Zellen ist in Abbildung 10 dargestellt. Verdrängung des radiomarkierten Tracers mit Insulin zeigt eine deutliche Abnahme der Degradation mit steigender Hormonkonzentration an den menschlichen Zellen. Die Insulindegradation liegt bei 100 nM Insulin bei 1,65 ± 0,26%, bei 10 pM Insulin bei 3,24 ± 1,39% und ist somit signifikant (p<0,05) niedriger. Die Degradation bei 100 nM Insulin entspricht der Basisdegradation (diese betrug 1,6 %) und läßt sich somit durch hohe Insulin-konzentrationen vollständig inhibieren. Das Insulin Lispro verhielt sich wie Insulin und erniedrigte die Degradation des radioaktiven Insulins konzentrationsabhängig. Proinsulin senkte die Insulindegradation mit steigender Konzentration ebenfalls, diese Wirkung war nicht signifikant. IGF-1 und Des(1-3)IGF-1 hatten keinen Effekt auf die Insulindegradation. Im Vergleich zu verschiedenen Konzentrationen an Insulin war die Insulindegradation bei den jeweiligen Konzentrationen an C-Peptid signifikant höher (jeweils 0,1 nM, 3nM, 10 nM und 100 nM C-Peptid, p<0,05). Der Übersichtlichkeit wegen wurden nur die Werte von Insulin und C-Peptid dargestellt.

3.3 DEGRADATION VON IGF-1

3.3.1 Degradation an PT-1 Zellen

Um die Degradation von IGF-1 an PT-1 Zellen zu untersuchen, wurden steigende Konzentrationen von IGF-1, Des(1-3)IGF-1, Insulin, Lispro, Proinsulin und C-Peptid zugegeben. In Abbildung 11 wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht alle Daten dargestellt, sondern lediglich die Werte für IGF-1, Des(1-3)IGF-1 und C-Peptid. Steigende Konzentrationen beider Hormone beeinflußten die Degradation von IGF-1 nicht. Die grafisch nicht dargestellten Hormone Insulin, Lispro und Proinsulin hatten ebenfalls keinen Einfluß auf die Degradation. Die Basisdegradation lag bei 4,5%.

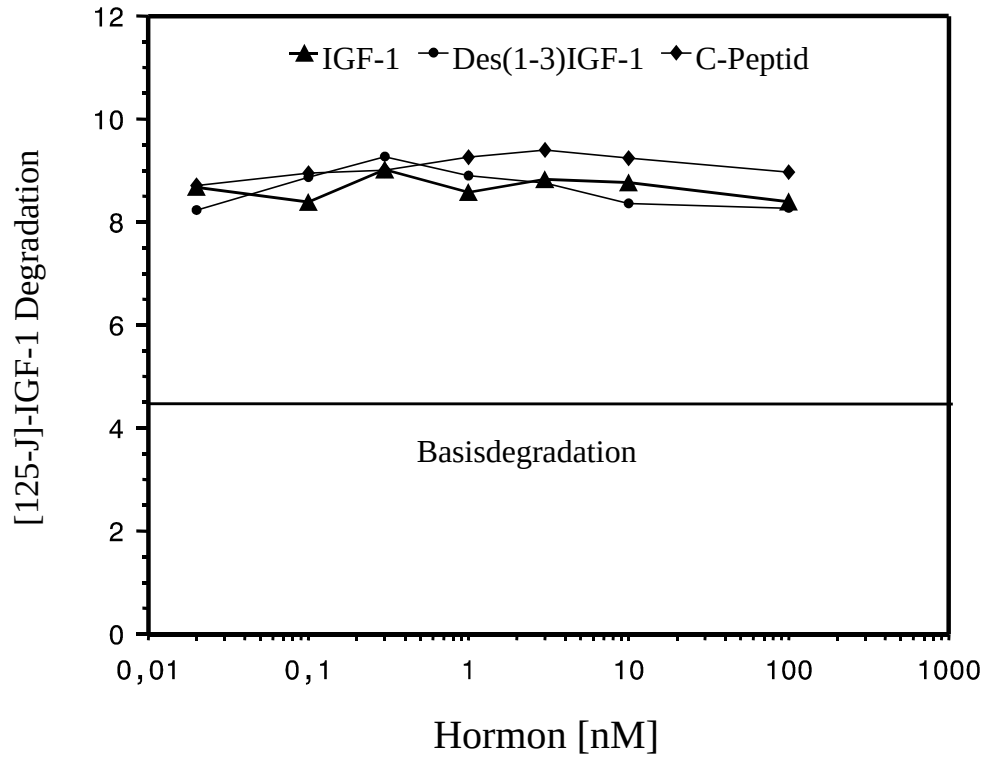


Abbildung 11: Relative Degradation von [^{125}I]-IGF-1 an PT-1 Zellen (bezogen auf die Gesamtcounts). Mittelwerte aus 4 Versuchen.

3.3.2 Degradation an HK-2 Zellen

In Analogie zu den Versuchen mit PT-1 Zellen wurden steigende Konzentrationen von IGF-1, Des(1-3)IGF-1, Insulin, Lispro, Proinsulin und C-Peptid zu HK-2 Zellen gegeben. In Abbildung 12 wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht alle Daten dargestellt, sondern ledig-

lich die Werte für IGF-1, Des(1-3)IGF-1 und C-Peptid. Steigende Konzentrationen beider Hormone beeinflußten die Degradation von IGF-1 nicht. Die grafisch nicht dargestellten Hormone Insulin, Lispro und Proinsulin hatten ebenfalls keinen Einfluß auf die Degradation. Die Basisdegradation lag bei 4,5%.

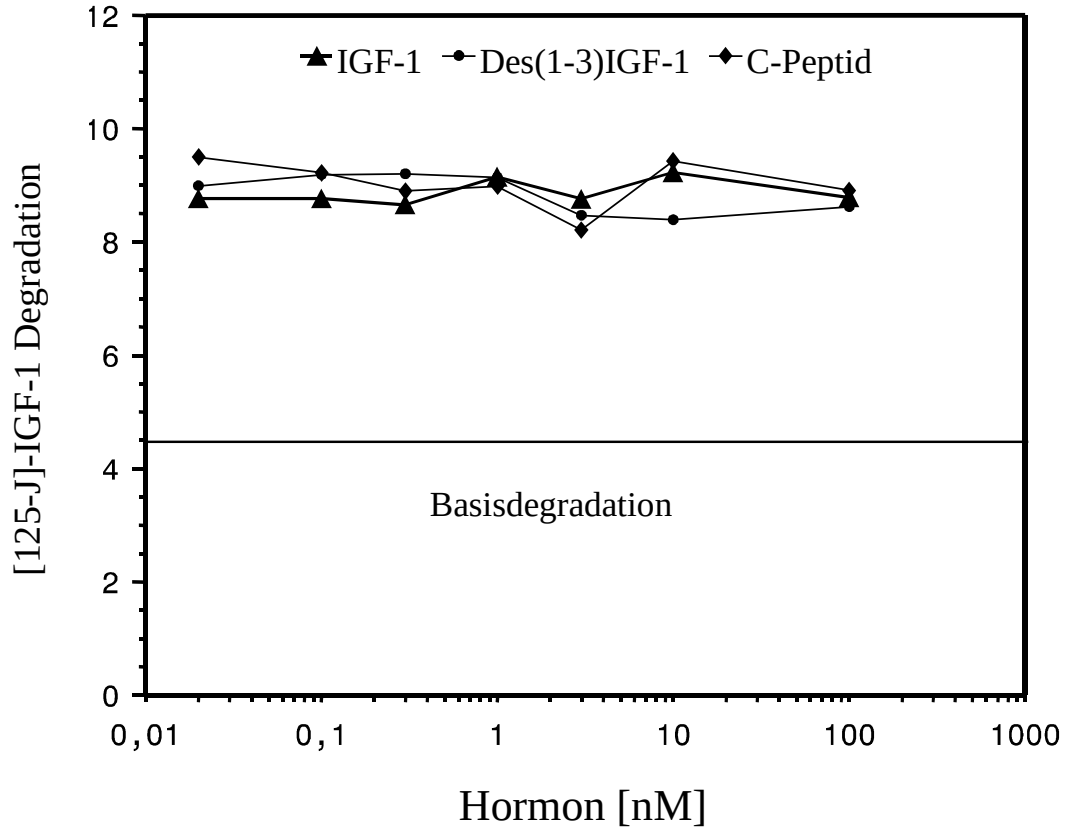


Abbildung 12: Relative Degradation von [^{125}I]-IGF-1 an HK-2 Zellen (bezogen auf die Gesamtcounts). Mittelwerte aus 3 Versuchen.

3.4 Biologische Wirkungen von Wachstumsfaktoren auf proximale Tubuluszellen

Um die biologischen Wirkungen der im Rezeptorbindungsassay verwendeten Wachstumsfaktoren zu untersuchen, wurden PT-1 und HK-2 Zellen mit 1nM und 100nM der einzelnen Hormone inkubiert. Das Wachstum wurde nach 24, 48 und 72 Stunden mittels eines nichtradioaktiven Proliferationsassays photometrisch gemessen. Dieser Assay erfaßt die Zunahme der Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen, welche sehr gut mit der Zellproliferation korreliert. Kontrolle war das Zellwachstum im serumfreien Medium, das als 100 % angenommen wurde.

3.4.1 Wachstum von PT-1 Zellen

IGF-1 und Des(1-3)IGF-1 stimulierten das Wachstum in einer Konzentration von **1 nM** (Abbildung 13) nach 48 Stunden signifikant gegenüber der serumfreien Kontrolle (IGF-1 = 136 ± 21%, Des(1-3)IGF-1 = 130 ±19 %, $p<0,05$). Zu diesen Meßpunkten stimulierte IGF-1 das Wachstum auch signifikant ($p<0,05$) stärker als Insulin und Lispro (Insulin= 99 ± 26, Lispro= 97 ± 28%). Zwischen IGF-1 und Des(1-3)IGF-1 gab es keinen signifikanten Unterschied. Die anderen Wachstumsfaktoren waren nicht in der Lage, das Wachstum signifikant zu steigern.

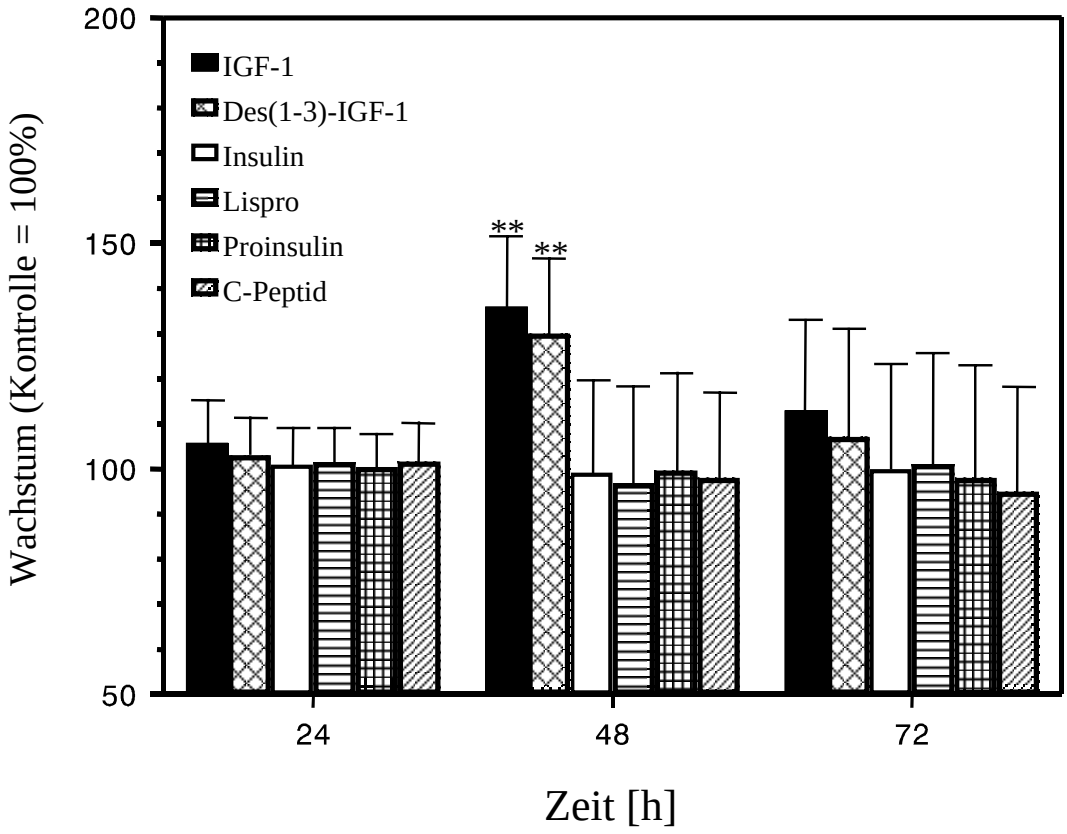


Abbildung 13: Wachstum von PT-1 Zellen bei Inkubation mit IGF-1, Des(1-3)IGF-1, Insulin, Lispro, Proinsulin und C-Peptid in einer Konzentration von **1 nM**. Die Proliferation wurde nach 24, 48 und 72 Stunden gemessen. Kontrolle war das Wachstum der Zellen im serumfreien Medium und wurde als 100 % angenommen (Mittelwerte aus 6 Versuchen ± SD, *= $p<0,05$).

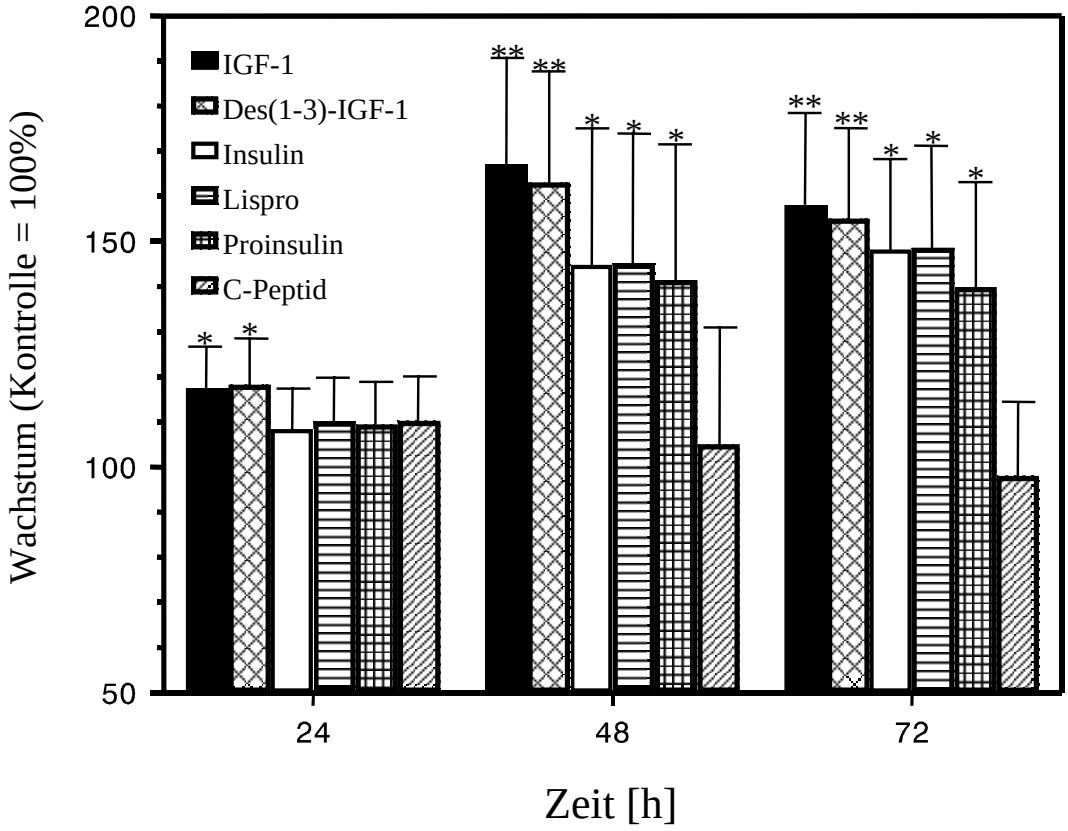


Abbildung 14: Wachstum von PT-1 Zellen bei Inkubation mit IGF-1, Des(1-3)IGF-1, Insulin, Lispro, Proinsulin und C-Peptid in einer Konzentration von **100 nM**. Die Proliferation wurde nach 24, 48 und 72 Stunden gemessen. Kontrolle war das Wachstum der Zellen im serumfreien Medium und wurde als 100 % angenommen (Mittelwerte aus 6 Versuchen ± SD, *= p<0,05, **= p<0,01).

Die Faktoren, welche das Wachstum in einer Konzentration von **100 nM** (Abbildung 14) am stärksten stimulieren, sind IGF-1 und Des(1-3)IGF-1. Unter Zugabe von IGF-1 proliferierten die Zellen nach 24 Stunden signifikant (IGF-1= 117 ± 6%, Des(1-3)IGF-1= 118 ± 8%, p<0,05), nach 48 respektive 72 Stunden wuchsen die Zellen hochsignifikant (IGF-1= 176 ±36% und Des(1-3)IGF-1= 163 ±30%, nach 48 Stunden; IGF-1= 158 ± 20% und Des(1-3)IGF-1= 155 ±25 % nach 72 Stunden, p<0,01). Des(1-3)IGF-1 stimuliert das Wachstum etwas schwächer als IGF-1, obwohl es nicht an IGF-Bindeproteine bindet und die biologische Verfügbarkeit beim Vorhandensein dieser höher ist als die von IGF-1. Der Unterschied zwischen den Hormonen ist jedoch nicht signifikant. IGF-1 und Des(1-3)IGF-1 stimulierten die Proliferation auch stärker als Insulin und Lispro, der Unterschied war bei

einer Konzentration von 100 nM nicht signifikant. Insulin bewirkte nach 48 und 72 Stunden ein signifikantes Wachstum (144 ± 40% nach 48 Stunden, 148 ± 38% nach 72 Stunden, p<0,05). Lispro verhielt sich fast gleich (153 ±50 % nach 48 Stunden, 148 ± 27% nach 72

Stunden, p<0,05). Proinsulin hatte ebenfalls eine signifikante Wirkung (141 ± 38% nach 48 Stunden, 140 ± 32% nach 72 Stunden, p<0,05). C-Peptid erreichte auch in der Konzentration von 100 nM keinen signifikanten Effekt.

Im Vergleich der Abbildungen 13 und 14 fällt eine Konzentrationsabhängigkeit des Wachstums der Zellen auf. Inkubation mit Wachstumsfaktoren in einer Konzentration von 100 nM weisen eine wesentlich stärkere Proliferation auf als bei einer Hormonkonzentration von 1 nM. Vergleicht man das Wachstum bei 1 nM IGF-1 und 100 nM Insulin nach 48 Stunden, ergeben sich sehr ähnliche Werte (IGF-1= 136 ± 21%, Insulin =144 ± 40%).

3.4.2 Wachstum von HK-2 Zellen

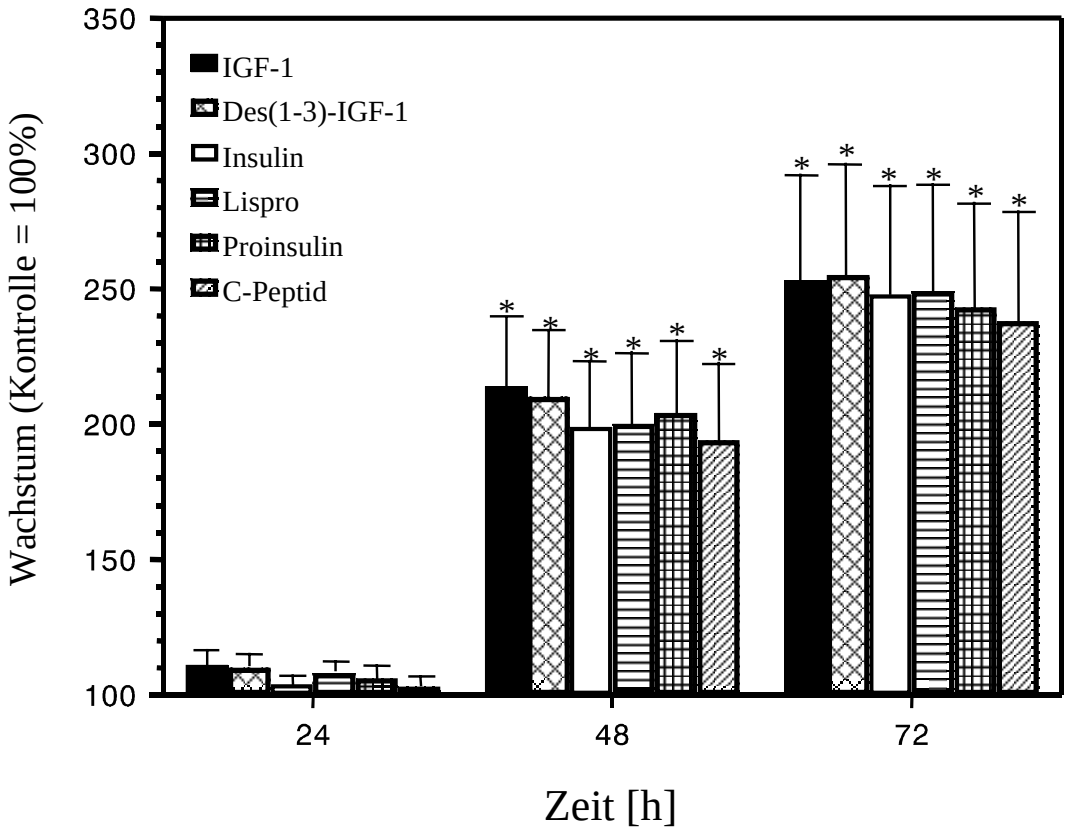


Abbildung 15: Wachstum von HK-2 Zellen bei Inkubation mit IGF-1, Des(1-3)IGF-1, Insulin, Lispro, Proinsulin und C-Peptid in einer Konzentration von **1 nM**. Die Proliferation wurde nach 24, 48 und 72 Stunden gemessen. Kontrolle war das Wachstum der Zellen im serumfreien Medium und wurde als 100% angenommen (Mittelwerte aus 4 Versuchen ± SD, *= p<0,05).

Inkubation von HK-2 Zellen mit verschiedenen Wachstumsfaktoren in der Konzentration von **1 nM** (Abbildung 15) bewirkte ein signifikantes Wachstum durch alle Hormone nach 48 und

72 Stunden. IGF-1 und Des(1-3)IGF-1 riefen das stärkste Wachstum hervor, diese Wirkung war im Vergleich zu den anderen Hormonen jedoch nicht signifikant. Zwischen 24 und 48 Stunden war eine wesentlich größeres Wachstum meßbar als zwischen 48 und 72 Stunden.

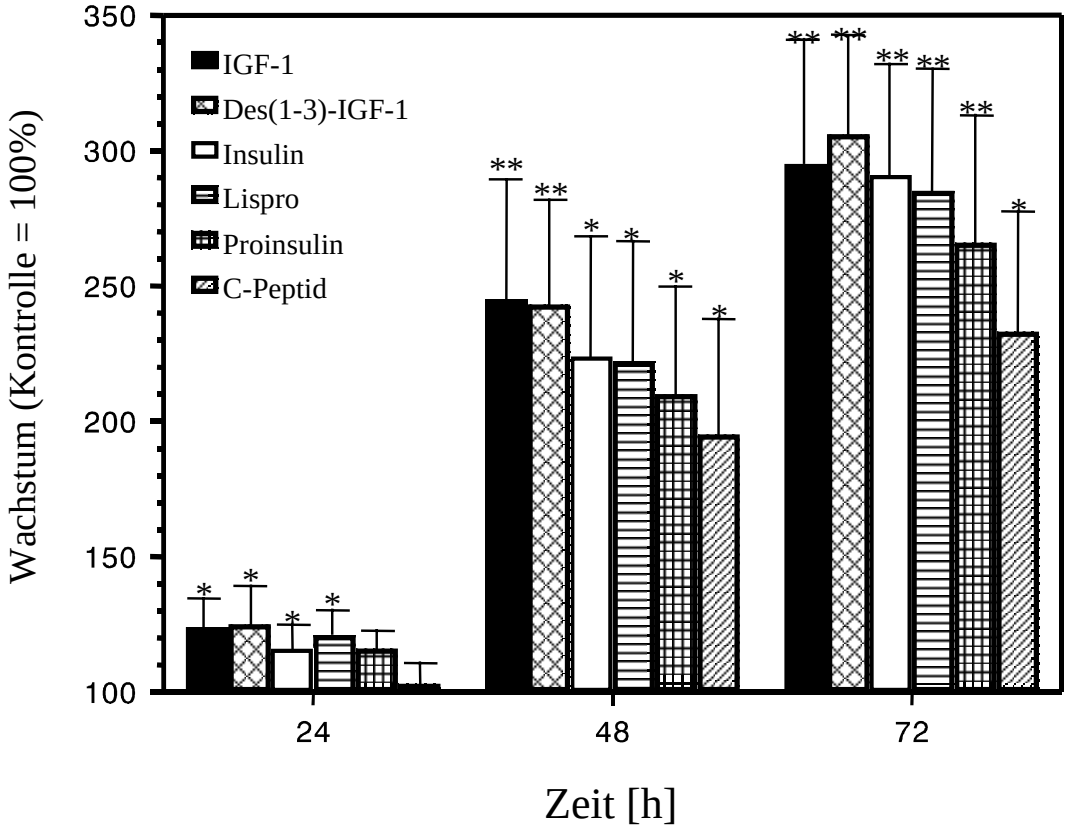


Abbildung 16: Wachstum von HK-2 Zellen bei Inkubation mit IGF-1, Des(1-3)IGF-1, Insulin, Lispro, Proinsulin und C-Peptid in einer Konzentration von **100 nM**. Die Pro-liferation wurde nach 24, 48 und 72 Stunden gemessen. Kontrolle war das Wachstum der Zellen im serumfreien Medium und wurde als 100% angenommen (Mittelwerte aus 4 Versuchen ± SD, *= p<0,05, **p<0,01).

Stimulation von HK-2 Zellen mit **100nM** (Abbildung 16) der untersuchten Hormone ergab ein signifikantes Wachstum im Vergleich zur serumfreien Kontrolle. Nach 24 Stunden ergab sich ein signifikantes Wachstum durch IGF-1 (124 ± 16%), Des(1-3)IGF-1 (125 ± 20%), Insulin (116 ± 10%) und Lispro (121 ± 10%), p<0,05. Nach 48 und 72 Stunden wuchsen die Zellen mit IGF-1 signifikant (nach 48h 245 ±85%, nach 72h 295 ± 65%, p<0,01). Inkubation mit Des(1-3)IGF-1 ergab ähnliche Resultate (nach 48h 244 ± 74%, nach 72h 306 ± 70%, p<0,01). Insulin stimulierte das Wachstum nach 48h 224 ± 71% (p<0,05), nach 72h 291 ± 60% (p<0,01). Unter Lispro verhielten sich die Zellen ähnlich, nach 48h wuchsen sie 222 ± 70% (p<0,05), nach 72 Stunden 285 ± 65% (p<0,01). Proinsulin ergab nach 48 (210 ± 65%, p<0,05) und 72 Stunden (266 ± 59%, p<0,01) ein signifikantes Wachstum, auch C-Peptid erzielte eine

biologische Wirkung nach 48 (195 ± 68%, $p<0,05$) und 72 Stunden (233 ± 50%, $p<0,01$). Im Vergleich der Wachstumsstimulation der einzelnen Hormone gegeneinander ergab sich kein signifikanter Unterschied.
Inkubation von HK-2 Zellen mit 1 nM und 100 nM verschiedener Hormone zeigt deutlich eine Konzentrationsabhängigkeit des Wachstums, wie aus den Abbildungen 15 und 16 hervorgeht.

3.4.3 Wachstum von PT-1 Zellen mit Thyrosinkinaseinhibitoren

Um genauere Aussagen über die Signaltransduktion von Insulin und IGF-1 machen zu können, wurden PT-1 Zellen mit 1 nM Insulin oder IGF-1 und zwei verschiedenen Tyrosinkinaseinhibitoren 48 Stunden lang inkubiert und die Zellzahl gemessen.

Inkubation mit 1nM IGF-1 bewirkte eine signifikante ($p<0,05$) Zunahme der Zellzahl um 181 ± 53 % im Vergleich zur serumfreien Kontrolle. Insulin in gleicher Konzentration bewirkte ebenfalls eine signifikante ($p<0,05$) Zellzahlzunahme von 137 ± 29 %. IGF-1 war signifikant ($p<0,05$) potenter in der Stimulation des Wachstums gegenüber Insulin. Abbildung 17 zeigt, daß der Tyrosinkinaseinhibitor MDC das von IGF-1 induzierte Wachstum in den Konzentrationen von 10 M und 100 µM signifikant mehr inhibiert als Insulin. Bei Inkubation mit 10 µM MDC lag die Zellzahl mit Insulin bei 85 ± 8 %, mit IGF-1 bei 70 ± 5 %. Eine Konzentration von 100 µM MDC ergaben ein Wachstum von 71 ± 18 % mit Insulin gegenüber 38 ± 10 % mit IGF-1. In Abbildung 18 wird deutlich, daß RCAM-Lysozym das durch Insulin vermittelte Wachstum signifikant ($p<0,02$) besser inhibiert als das durch IGF-1-Wirkung hervorgerufene. Das Wachstum von Insulin lag bei einer Konzentration von 1 µM RCAM-Lysozym bei 31 ± 3,2 %, das von IGF-1 bei 65 ± 13,8 %.

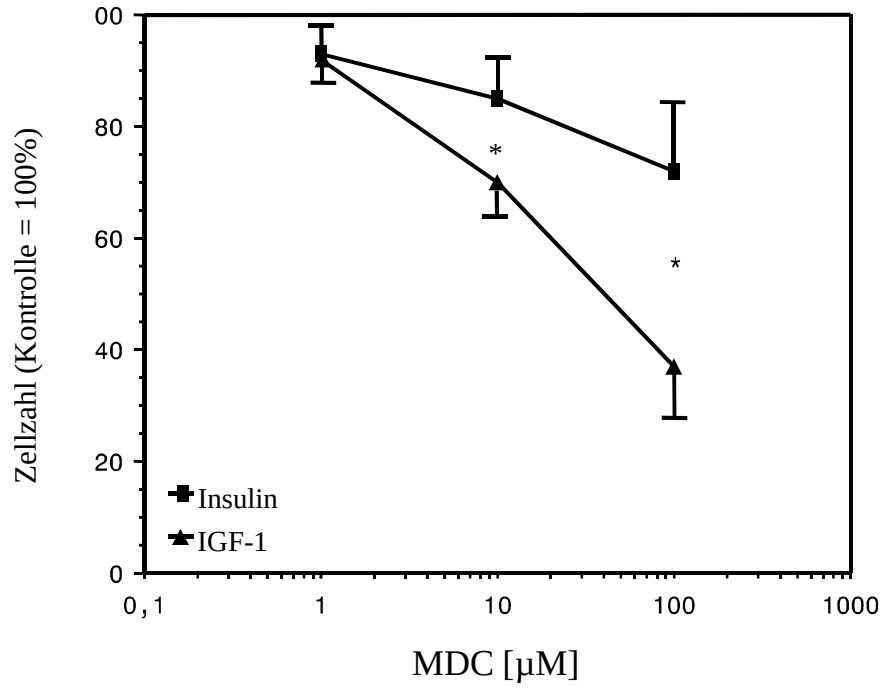


Abbildung 17: Wirkungen des Tyrosinkinasehemmers MDC auf das durch Insulin und IGF-1 stimulierte Zellwachstum von PT-1 Zellen nach 48 Stunden. Kontrolle war das Wachstum im serumfreien Medium (Mittelwerte aus 6 Versuchen ± SD, *= p<0,05).

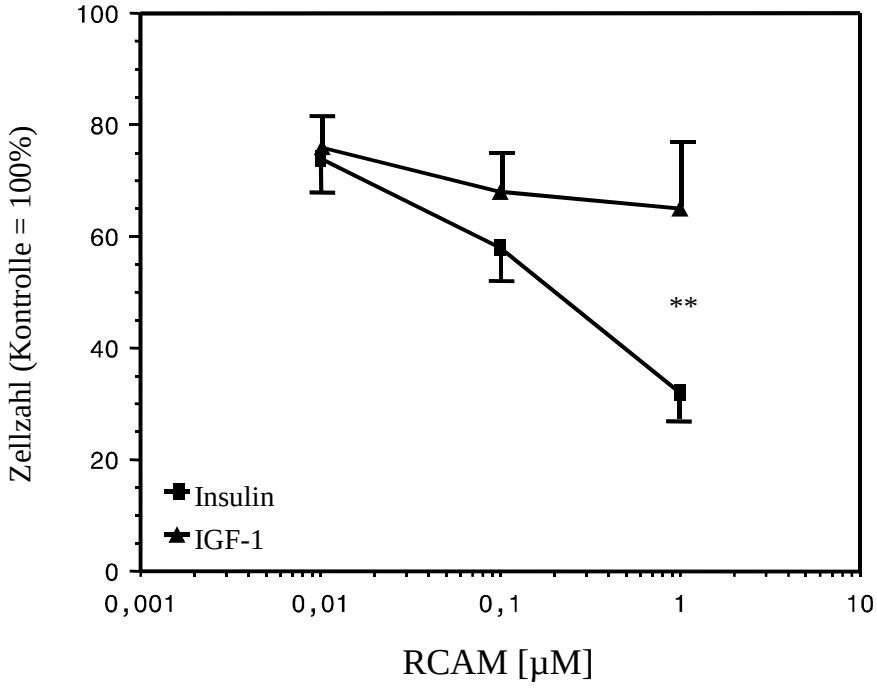


Abbildung 18: Wirkungen des Tyrosinkinasehemmers RCAM-Lysozym auf das durch Insulin und IGF-1 stimulierte Zellwachstum von PT-1 Zellen nach 48 Stunden. Kontrolle war das Wachstum im serumfreien Medium (Mittelwerte aus 6 Versuchen ± SD, **= p<0,02).

4 Diskussion

An proximalen Tubuluszellen wurde die Rezeptorbindung und die biologische Wirkung der Polypeptide Insulin, Proinsulin und IGF-1 untersucht. In der bisher veröffentlichten Literatur finden sich zahlreiche Untersuchungen zum Insulin/IGF-System an Nierenzellen tierischer Herkunft. Von diesen Versuchen wurden Rückschlüsse auf die menschliche Niere gezogen. Deshalb wurden in dieser Arbeit vergleichende Untersuchungen an proximalen Tubuluszellen des Kaninchens (PT-1) mit denen des Menschens (HK-2) durchgeführt. Bislang wurde die Rezeptorbindung und mitogene Aktivität von Insulin und IGF-1 im direkten Vergleich zweier proximaler Tubuluszellinien nicht untersucht. Ebenfalls nicht bekannt war die Beeinflussung der Insulindegradation durch C-Peptid. Desweiteren wurde der mitogene Einfluß von Proinsulin und Insulin Lispro auf proximale Tubuluszellen in der vorgestellten Arbeit erstmals untersucht. Der besseren Übersicht wegen sollen die Einzelexperimente nacheinander im Vergleich zur Literatur besprochen werden, um am Ende ein Gesamtbild zu entwerfen.

4.1 BINDUNGSSTUDIEN AN PT-1 UND HK-2 ZELLEN

Insulinbindung

Bindungsversuche mit humanem ^{125}I-Insulin an **PT-1 Zellen** ergaben einen hochaffinen Insulinrezeptor mit einer halbmaximalen Verdrängung (IC_{50}) von 1 nM und einer Dissoziationskonstante K_d von 4 nM. Versuche mit dem nichtdimerisierenden Insulinanalogon Lispro wurden durchgeführt, da Insulin bei den zu Bindungsversuchen verwendeten hohen Hormonkonzentrationen dimerisieren kann. Das Insulin Lispro verhält sich bei den Versuchen fast gleich wie Insulin, es verdrängt den Tracer erst bei einer etwas höheren Konzentration als Insulin und die Dissoziationskonstante ist etwas niedriger. Jedoch sind diese Unterschiede nicht signifikant. Verdrängung mit den verwandten Peptiden Proinsulin und IGF-1 ergab eine Kreuzbindung mit dem Insulinrezeptor. Die zur halbmaximalen Verdrängung des Tracers benötigten Hormonkonzentrationen waren 10-20fach höher als die der homologen Hormone. Der Insulinrezeptor auf PT-1 Zellen zeigt eine absteigende Affinität in der Reihenfolge: Insulin>>Proinsulin>IGF-1. Die grafische Darstellung der Bindungsdaten ergab einen gekrümmten Scatchard-Plot. Die Anzahl der niedrigaffinen Bindungsstellen war für Lispro höher als die des Humaninsulins, dies kann mit der Dimerisierung des Humaninsulins in den hohen Konzentrationen erklärt werden. Bindungsversuche mit humanem ^{125}I-Insulin an **HK-2 Zellen** ergaben einen hochaffinen und spezifischen Insulinrezeptor. Die halbmaximale Verdrängung von Insu-

lin lag bei 0,3nM, die Dissoziation bei einem K_d-Wert von 1,5nM. Das Insulin Lispro verdrängte etwas besser, jedoch nicht signifikant. Auch bei den Versuchen mit den HK-2 Zellen ergab sich eine Kreuzbindung des Insulinrezeptors mit den verwandten IGF-Peptiden. Proinsulin verdrängte deutlich besser als IGF-1, die Affinität der Peptide zum Insulinrezeptor war 30-100fach niedriger als die des Insulins. So zeigt auch der Insulinrezeptor auf HK-2 Zellen eine absteigende Affinität in der Reihenfolge Insulin>>Proinsulin>IGF-1. Der Scatchard-Plot war gekrümmt und zeigte für Insulin und Lispro einen nahezu identischen Verlauf.

In der Literatur aus früheren Untersuchungen zur Insulinbindung ist folgendes zusammenzufassen: NAKAMURA (1983) untersuchte die Verteilung von Insulinrezeptoren im Nephron eines Kaninchens und fand die höchste spezifische Insulinbindung im proximalen Tubulus. Spezifische Bindung von ^{125}I-Insulin wurde von den Autoren auf Membranen proximaler Tubuluszellen verschiedener Spezies demonstriert. YAGIL (1988) beschreibt Insulinrezeptoren an proximalen Tubuluszellen einer immortalisierten Opposumzellinie. Diese Insulinrezeptoren verdrängten bei einer Insulinkonzentration von 2 nM halbmaximal. Die maximale spezifische Bindung lag bei 5 % Insulin. Auch hier wurde eine Kreuzbindung mit IGF-1 und Proinsulin gemessen. Die Ordnung nach absteigender Affinität ergab die Reihenfolge von Insulin>>IGF-1>Proinsulin. HAMMERMAN (1985) untersuchte die Insulinbindung an der Zellmembran proximaler Tubuluszellen von Hunden. Die IC_{50} von Insulin lag bei seinen Versuchen bei 2,6 nM. Proinsulin inhibierte die Bindung von ^{125}I-Insulin nur in einer deutlich höheren Konzentration als Insulin. RABKIN (1982) beschreibt Insulinrezeptoren an Membranpräparationen eines Kaninchens. Hier wurde die halbmaximale Verdrängung mit 3 nM und der K_d -Wert mit 2,4 nM bestimmt. Auch bei diesen Versuche ergab sich eine Inhibition der Insulinbindung durch Proinsulin in einer 10fach höheren Konzentration als Insulin.

Die aus Versuchen mit PT-1 und HK-2 Zellen erhaltenen Bindungsdaten stimmen mit den Literaturangaben an anderen Nierentubuluszellen überein. Die halbmaximale Verdrängung des verwendeten Insulins lag im nanomolaren Bereich, die Kreuzbindung des Insulinrezeptors mit Proinsulin und IGF-1 erfolgte mit einer 10-100fach niedrigeren Affinität. Der Scatchard-Plot zeigte einen für Insulinrezeptoren typischen nichtlinearen Verlauf. So konnte bei den menschlichen HK-2 Zellen hochaffine, spezifische Insulinbindungsstellen gezeigt werden, was bisher in direkten Bindungsversuchen nicht durchgeführt wurde. Zur Opossumzellinie (YAGIL et al. 1989) muß einschränkend gesagt werden, daß sie ähnliche Merkmale aufweist wie proximale Tubuluszellen. PT-1 Zellen und HK-2 Zellen stellen jedoch ein differenzierteres Modell des

proximalen Tubulus dar (JEHLE et al. 1996b, STRACKE et al. 1998). Versuche von RABKIN (1982) und HAMMERMAN (1985) wurden mit Membranpräparationen durchgeführt. Die etwas niedrigere Affinität dieser Insulinrezeptoren kann durch Beschädigung der Rezeptoren bei der Präparation und einer höheren unspezifischen Bindung erklärt werden.

IGF-1 Bindung

Die Bindungsversuche mit ^{125}I-IGF-1 an **PT-1 Zellen** ergaben einen hochaffinen und spezifischen IGF-1 Rezeptor, die spezifische Bindung von IGF-1 lag bei diesen Zellen bei 24 %. Die IC_{50} von IGF-1 lag wie der K_d -Wert bei 1 nM. Verdrängung mit Des(1-3)IGF-1 ergab eine IC_{50} von 1 nM und einen K_d -Wert von gleichfalls 1 nM. Da zwischen IGF-1 und Des(1-3)IGF-1 kein signifikanter Unterschied bestand, läßt dies auf eine sehr geringe Produktion oder ein Fehlen von IGFBPs der PT-1 Zellen schließen. Insulin und Lispro verdrängten bei den wesentlich höheren Hormonkonzentrationen von 100 nM halbmaximal. Proinsulin und C-Peptid verdrängten praktisch nicht. Die Versuche mit den menschlichen **HK-2 Zellen** ergaben wie an den PT-1 Zellen hoch-affine, spezifische IGF-1 Bindungsstellen. Die halbmaximale Verdrängung mit IGF-1 ergaben eine IC_{50} und K_d von 1nM. Des(1-3)IGF-1 verdrängte bei 2nM halbmaximal, die K_d lag bei 1nM. Des(1-3)IGF-1 verdrängte radioaktives IGF-1 etwas schwächer als IGF-1, was darauf hindeutet, daß keine oder nur sehr wenige Bindungsproteine (IGFBPs) von den Zellen produziert wurden. Insulin wies eine Kreuzbindung zum IGF-1 Rezeptor auf, die IC_{50} lag 100fach höher als die des IGF-1.

In der Literatur fanden sich die folgenden Untersuchungen zu IGF-1 Rezeptoren an tierischen Zellen: PILLION (1988) untersuchte IGF-1 Rezeptoren an proximalen Tubuluszellen von Ratten. Die halbmaximale Verdrängung von radioaktivem IGF-1 mit IGF-1 erfolgte bei 3 nM, der K_d -Wert wurde mit 2 nM ermittelt. Insulin zeigte eine Kreuzbindung und verdrängte in 100fach höherer Konzentration halbmaximal. FLYBERG (1993) beschreibt IGF-1-Rezeptoren an proximalen Tubuluszellen eines Kaninchens. Bei diesen Versuchen ergab sich eine Dissoziationskonstante von 6 nM. Das markierte IGF-1 ließ sich nur von sehr hohen Insulinkonzentrationen (10^{-7}-10^{-6} M) verdrängen. Zu den Versuchen wurden Membranpräparationen verwendet. Zu IGF-1 Rezeptoren auf menschlichen Zellen ließ sich weniger Literatur finden. JOHNSON (1998) untersuchte IGF-1 Rezeptoren an proximalen Tubuluszellen einer Primärkultur menschlicher Zellen. Hier ergab sich ein K_d -Wert von 1,2 nM für den IGF-Rezeptor.
Die Untersuchungsergebnisse von PT-1 Zellen stimmen mit PILLIONS (1988) Angaben sehr gut überein, von FLYVBERGS (1993) Angaben unterscheiden sie sich etwas. Die Dissoziationskon-

stante K_d ist bei den Versuchen mit PT-1 Zellen niedriger. Dieser Unterschied könnte durch das Vorhandensein von IGF-Bindeproteinen bei FLYBERGS (1993) Versuchen oder der Membranpräparation begründet werden. Die Bindungsversuche an PT-1 Zellen wurden an viablen Zellen durchgeführt. Versuche mit Des(1-3)IGF-1 wurden durchgeführt, um einen Einfluß von IGFBPs zu vermeiden. FLYVBERG (1993) untersuchte lediglich unverändertes IGF-1. Die Versuchsergebnisse an HK-Zellen stimmen mit JOHNSONS (1998) Angaben überein. Die Rezeptoraffinität liegt im gleichen Bereich, der Scatchard-Plot ist nicht linear. Jedoch wurde eine Verdrängung mit Insulin und Proinsulin von JOHNSON (1998) nicht durchgeführt, um die Spezifität des Rezeptors zu zeigen. Hier möchte ich die Untersuchungen an nicht renalen menschlichen IGF-1 Rezeptoren zum Vergleich heranziehen. BURGUERA (1991) untersuchte IGF-1 Rezeptoren an Leber-, Muskel- und Fettzellen mit einer IC_{50} von 1nM (IGF-1) und einer Kreuzbindung von Insulin (IC_{50} = 100 nM). Proinsulin zeigte keine Affinität zum Rezeptor. Diese Untersuchungen stimmen sehr gut mit den Versuchen an HK-2 Zellen überein. Wie oben angeführt, lag die IC_{50} von IGF-1 bei 1 nM, Insulin verdrängte in einer 100fach höheren Konzentration und Proinsulin zeigte keinen Verdrängungseffekt. So läßt sich schließen, daß in den Bindungsversuchen an den menschlichen HK-2 Zellen hochaffine, spezifische IGF-1-Bindungsstellen gezeigt wurden.

4.2 DEGRADATIONSSTUDIEN AN PT-1 UND HK-2 ZELLEN

Wie in der Einleitung erwähnt, spielt die Niere eine wichtige Rolle im Abbau von Proteinen. Die Degradation von Insulin durch proximale Tubuluszellen nimmt eine wichtige Rolle im Insulinmetabolismus ein. Der Vorgang der Degradation bei physiologischen Insulinkonzentrationen wird vor allem durch den Insulinrezeptor vermittelt (DUCKWORTH et al. 1998). Nach Bindung des Hormons an den Rezeptor wird der Hormon-Rezeptor-Komplex endozytotisch aufgenommen und nach Verschmelzung mit Lysosomen degradiert.

Bei den Versuchen mit **PT-1 Zellen** ließ sich die rezeptorvermittelte Insulindegradation gut nachweisen. Durch hohe Konzentrationen von kaltem Insulin (100 nM) wurde das radioaktive Insulin fast vollständig vom Rezeptor verdrängt und verhinderte so die Endozytose und Degradation. Versuche mit Lispro zeigten das gleiche Verhalten. Proinsulin hat eine geringere Affinität zum Insulinrezeptor und inhibierte die Degradation auch in hohen Konzentrationen nicht vollständig. IGF-1 und Des(1-3)IGF-1 hatten nur geringen Einfluß auf die Degradation. Interessanterweise war die Insulindegradation bei Inkubation mit C-Peptid, das keine Affinität zum

Insulinrezeptor zeigte, höher als die Degradation der Kontrolle ohne Hormonzugabe. Die Versuche mit **HK-2 Zellen** zeigten noch deutlicher als die Versuche an PT-1 Zellen die Wirkung des Insulinrezeptors bei der Degradation. Mit steigender Konzentration an Insulin nimmt die Degradation ab und wird bei einer Insulinkonzentration von 100 nM vollständig inhibiert. Lispro wies die gleiche Affinität zum Insulinrezeptor auf und verhielt sich dementsprechend auch gleich. Proinsulin ist weniger affin und konnte die Degradation nicht ganz inhibieren. Es ließ sich auch bei Proinsulin eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit nachweisen. IGF-1 und Des(1-3)IGF-1 zeigten auch bei dieser Zellinie wenig Einfluß auf die Degradation. Auch bei HK-2 Zellen ergab sich ein Einfluß von C-Peptid, Inkubation mit C-Peptid beschleunigte die Degradation von Insulin signifikant.

In der Literatur finden sich verschiedene Untersuchungen zur Insulindegradation durch die Niere. YAGIL (1988) untersuchte die Insulindegradation an proximalen Tubuluszellen einer Zellkultur vom Opossum. Die Insulindegradation ließ sich durch Insulinkonzentrationen Einfluß, so daß YAGIL (1988) von einer spezifischen rezeptorvermittelten Degradation an der luminalen Zellmembran ausgeht. RABKIN (1982) untersuchte ebenfalls die Degradation an Membranpräparationen der luminalen Seite von Kaninchentubuluszellen. Insulinkonzentrationen größer als 10^{-6} M inhibierten die Degradation signifikant höher als gleiche Konzentrationen an Wachstumshormon und Glucagon. BONDY (1994) zeigte die anatomische Nähe der Insulin-abbauenden Enzyme (IDE) zu Insulinrezeptoren in Niere und Leber. Aus der anatomischen Korrelation von IDE und Insulinrezeptoren und der hohen Aktivität dieser Enzyme in der Niere schlossen die Autoren, daß Insulin nach Rezeptorbindung und Internalisierung durch diese Enzyme in den Lysosomen degradiert wird.

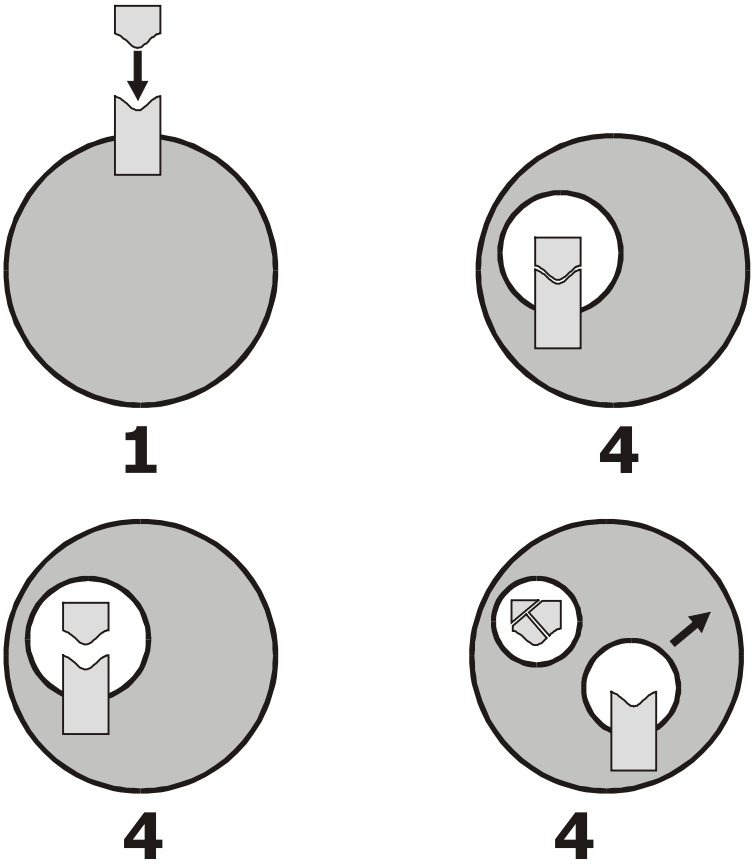


Abbildung 19: Internalisierung und Prozessierung des Insulinrezeptorkomplexes. Nach Bindung des Insulins an den Rezeptor (1) findet die Internalisierung des Hormon-Rezeptor-Komplexes in einem Endosom statt (2). Nach Ansäuerung des Endosoms dissoziieren Hormon und Rezeptor voneinander ab (3). Das Insulinmolekül wird degradiert, der Insulinrezeptor kehrt an die Zelloberfläche zurück oder wird ebenfalls degradiert (4).

In den Versuchen an PT-1 und HK-2 Zellen konnte gezeigt werden, daß die Verdrängung durch hochaffine Peptide die Degradation vermindert, der Einsatz niedrig affinier Peptide dagegen wenig Einfluß hat. Die Verdrängung des markierten Insulins vom Rezeptor und die dadurch erniedrigte Degradation sind ein starker Hinweis der Rezeptorwirkung auf die Degradation. In der Literatur wurden keine Versuche mit Proinsulin, C-Peptid oder IGF-1 gefunden, die meisten Untersuchungen fanden mit Glucagon und Wachstumshormon statt, welche keine Affinität zum Insulinrezeptor aufweisen. Bei physiologischen Insulinkonzentrationen wird die endozytotische Insulinaufnahme vor allem durch den Insulinrezeptor vermittelt. Steigt die Insulinkonzentration an, wird Insulin auch durch Pinozytose aufgenommen (DUCKWORTH et al. 1998). Die pinozytotische Aufnahme kann bei sehr hohen Insulinkonzentrationen eine wesentliche Rolle spielen.

Interessant ist die Beobachtung, daß C-Peptid einen Einfluß auf die Insulindegradation hat, obwohl es nicht an den Rezeptor bindet. In der mir vorliegenden Literatur fand sich jedoch keine Untersuchung zu dieser Beobachtung. Eine biologische Wirkung des C-Peptids, welche nicht durch einen Rezeptor vermittelt wird, wird von anderen Autoren bereits diskutiert. So läßt sich im Tierversuch die diabetische Neuropathie und Angiopathie bei gleichzeitiger Gabe von Insulin und C-Peptid verhindern (IDO et al. 1997). Eine Studie mit Typ-I Diabetikern zeigte, daß die glomeruläre Hyperfiltration und Albuminexkretion sowie die Glucoseutilisation bei Gabe äquimolarer Mengen C-Peptids mit Insulin signifikant besser beeinflußt wurden als durch die alleinige Gabe von Insulin (JOHANSSON et al. 1993). Die durch Diabetes induzierte erniedrigte Aktivität der Na^+K^+-ATPase wird erhöht, die Gefäßpermeabilität wird wieder niedriger. Versuche mit synthetischen Enantiomeren und der reversen Sequenz des C-Peptids hatten die gleiche Wirkung, was auf nichtchirale Interaktionen anstatt einer stereospezifischen Rezeptorbindung hindeutet (STEINER und RUBENSTEIN 1997).

C-Peptid als Modulator der Insulindegradation

Es ist möglich, daß C-Peptid ein physiologische Modulator der Degradation von Insulin und Insulinrezeptor ist. Das würde die oben angesprochene Beobachtung der besseren Diabeteseinstellung einer Kombination aus Insulin und C-Peptid erklären. Beim Typ 2 Diabetes wurde eine Resistenz gegenüber Insulin gezeigt, welche mit erhöhten Seruminsulinspiegeln und einer erniedrigten Rezeptorzahl korreliert. Dies wird zum Teil auf eine Downregulation der Rezeptoren und eine erniedrigte Rezeptoraffinität zurückgeführt (JEHLE et al. 1996b). In der Zellkultur läßt sich eine direkte Wirkung von Insulin auf die Rezeptordegradation und Rezeptorbiosynthese nachweisen (OKABAYASHI et al. 1989).

Nach Bindung des Hormons an den Rezeptor findet eine schnelle Internalisierung des Hormon-Rezeptor-Komplexes statt, das Hormon wird degradiert und der Rezeptor an die Zelloberfläche recycelt. Es stellt sich ein Gleichgewicht zwischen Internalisierung und Recycling ein. Werden die Zellen längere Zeit (>4 Stunden) mit höheren Konzentrationen Insulin inkubiert oder das Recycling des Rezeptors inhibiert, verschiebt sich das Gleichgewicht und es werden wesentlich mehr Rezeptoren degradiert (MARSHALL 1985). Die durch C-Peptid verstärkte Degradation könnte den Prozeß der Rezeptorverarmung und Insulinresistenz modulieren und so den Krankheitsverlauf positiv beeinflussen. Eine weiterer Hinweis auf eine biologische Wirkung des C-Pepids ist die an beiden Zellinien beobachtete Bindungszunahme von ^{125}I-

Insulin durch C-Peptid. Dies kann eine Modulation der Insulinwirkung schon in der Phase der Rezeptorbindung darstellen.

In welcher Weise der Megalinrezeptor bei der Insulindegradation in der Niere eine Rolle spielt und ob eine Beziehung zum C-Peptid besteht, muß in weiteren Versuchen untersucht werden. Der Megalinrezeptor ist ein endozytotischer Rezeptor an der luminalen Zellmembran des proximalen Tubulus und bindet Insulin und eine Reihe weiterer niedrigmolarer Peptide (ORLANDO et al. 1998). Nach Bindung an den Megalinrezeptor werden die Peptide internalisiert und größtenteils abgebaut.

Die Untersuchungen zur Degradation von IGF-1 an **PT-1 Zellen** zeigten das Phänomen der rezeptorvermittelten Degradation nicht. Es bestand eine signifikant höhere Hormondegradation als die Basisdegradation, die Degradation jedoch ließ sich durch hohe Konzentration an IGF-1 oder Des(1-3)IGF-1 nicht beeinflussen. Insulin, Lispro, Proinsulin und C-Peptid hatten ebenfalls keine Wirkung. Versuche mit **HK-2 Zellen** zur IGF-1 Degradation zeigten das gleiche Verhalten. Auch bei dieser Zellinie hatten steigende Konzentrationen von IGF-1, Insulin, Proinsulin und C-Peptid keinen Einfluß auf die Degradation. Die IGF-1 Degradation an HK-2 Zellen lag im gleichen Bereich wie die von PT-1 Zellen.
In der Literatur fanden sich die folgenden Untersuchungen zur Degradation von IGF-1: FLYBERG (1993) untersuchte die Bindung und Degradation von IGF-1 an proximalen Tubuluszellen. Auch bei dessen Versuchen ließ sich die Aufnahme von IGF-1 an der luminalen Membran nicht durch hohe Konzentrationen an kaltem Hormon inhibieren. Dies spricht für einen endozytotischen Prozeß, welcher nicht durch IGF-1 Rezeptoren vermittelt wird. Perfusion isolierter Nieren mit IGF-1 zeigte, daß 50-60% des Peptids aufgenommen und ein Teil degradiert wurde. Dies stimmt mit der Annahme überein, daß Proteine, welche im proximalen Tubulus durch luminale Endozytose aufgenommen werden, lysosomal abgebaut werden (FLYBERG et al. 1993). FAWCETT und RABKIN (1995) untersuchten den Hormonmetabolismus von IGF-1 an einem in vitro Modell proximaler Tubuluszellen. Die Degradation von IGF-1 war durch Kompetition am Rezeptor kaum zu beeinflussen und im Vergleich zur Insulindegradation wesentlich langsamer. Daß sich die Degradation nicht inhibieren läßt, spricht für einen rezeptorunabhängigen Prozeß durch endozytotische Aufnahme (Mikroautophagie, RABKIN et al. 1989). An der Endozytose können jedoch auch niedrig affine Rezeptoren wie der Megalinrezeptor beteiligt sein (ORLANDO et al. 1998).

Es gibt jedoch Hinweise, daß IGF-1 im proximalen Tubulus nicht nur degradiert wird, sondern auch eine biologische Wirkung ausübt. Im Serum eines nierengesunden Menschen sind IGFs zu 99% an Bindeproteine gebunden, welche aufgrund ihres Molekulargewichts nur minimal filtriert werden (GARGOSKY et al. 1993). Kommt es aufgrund einer Proteinurie bei chronischer Glomerulonephritis zu einer Erhöhung von bioaktivem IGF-1 im Filtrat, führt dieses durch Bindung an luminale Rezeptoren zu mitogener Aktivität und könnte so zur Progredienz der tubulointerstitiellen Fibrose beitragen (HIRSCHBERG 1996a). Dies könnte auch bei anderen Nierenerkrankungen mit Proteinurie (wie der diabetischen Nephropathie) eine Rolle spielen.

4.3 BIOLOGISCHE WIRKUNGEN DER WACHSTUMSFAKTOREN AUF PT-1- UND HK-2 ZELLEN

Die Wachstumsversuche wurden mit einem nichtradiodaktiven Proliferationsassay durchgeführt, welcher die Aktitvität mitochondrialer Dehydrogenasen erfasst. Da proliferierende Zellen eine höhere Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen aufweisen, ist dieser Test ein guter Nachweis der Zellproliferation (VORAUER et al. 1996, NI und HOLLANDER 1996). Wachstumsversuche mit PT-1 Zellen zeigten eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit des Wachstums. IGF-1 stimulierte das Wachstum erwartungsgemäß am stärksten und bewirkte in der Konzentration von 1 nM eine sigifikante Proliferation. Des(1-3)IGF-1 bindet nicht an Bindeproteine für IGFs (IGFBPs) und hat somit auch beim Vorhandensein dieser eine höhere Bioverfügbarkeit (BAGLEY et al. 1989). Die Stimulation des Wachstums war jedoch gleich wie die des IGF-1, so daß diese Beobachtung gegen eine signifikante Produktion von IGFBPs durch PT-1 Zellen spricht. Eine weitere Möglichkeit ist die schnellere Degradation des nicht durch Bindeproteine “geschützten” Des(1-3)IGF-1 an den Zellen. Die aus den Bindungsversuchen erhaltenen Daten sprechen jedoch gegen diese Interpretation. Insulin stimulierte das Wachstum ebenfalls, jedoch in der suprapysiologischen Konzentrationen von 100 nM. Nach 48 Stunden riefen 100 nM Insulin fast das gleiche Wachstum wie 1 nM IGF-1 hervor. Dies korreliert mit der Affinität der Peptide zum IGF-1 Rezeptor, da Insulin etwa 100fach weniger affin als IGF-1 ist. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß die Wachstumswirkung an PT-1 Zellen durch den IGF-1 Rezeptor vermittelt wird. Das Insulin Lispro zeigte im Bioassy das gleiche Verhalten wie Insulin. Proinsulin rief in der hohen Konzentration von 100 nM ebenfalls ein signifikantes Wachstum hervor, dieses war jedoch geringer als das durch IGF-1 und Insulin hervorgerufene. C-Peptid hatte keinen Einfluß auf die Proliferation.

Auffällig an den Proliferationsversuchen war das starke Wachstum zwischen 24 und 48 Stunden. Nach 48 Stunden proliferierten die Zellen wenig, das Wachstum fiel sogar wieder etwas ab. Die Gründe hierfür können in der Kontaktinhibition bei konfluentem Wachstum, der Degradation der Wachstumsfaktoren durch die Zellen, der Downregulation der Rezeptoren oder dem Fehlen von Nährstoffen liegen. Die Kontaktinhibition der Zellen ist die wahrscheinlichste Erklärung, da die Zellen nach 48 Stunden konfluent waren (Beobachtung im Lichtmikroskop).

HK-2 Zellen zeigten ebenfalls eine Konzentrationsabhängigkeit des Wachstums. Inkubation mit 100 nM der untersuchten Hormone stimulierten die Proliferation wesentlich stärker als 1 nM Hormon. Auch bei HK-2 Zellen stimulierten IGF-1 und Des(1-3)IGF-1 das Wachstum am stärksten. Zwischen IGF-1 und Des(1-3)IGF-1 ergab sich kein signifikanter Unterschied, was wie bei den PT-1 Zellen auf eine sehr geringe Produktion an IGFBPs hinweist. Beide Hormone waren deutlich potenter in der Wachstumsstimulation als Insulin, das jedoch auch in der Konzentration von 1 nM ein signifikantes Wachstum bewirkte. Das Insulin Lispro zeigte das gleiche Wirkprofil wie Insulin, zwischen diesen Insulinen gab es keinen signifikanten Unterschied. Proinsulin bewirkte ebenfalls ein Zellwachstum, auch schon in der Konzentration von 1 nM ergab sich eine signifikante Wirkung. Der Effekt war allerdings geringer als der des Insulins. Auch C-Peptid bewirkte ein Zellwachstum. Da C-Peptid bei den Bindungsversuchen keine Affinität zu den untersuchten Rezeptoren zeigte und in der Literatur kein eigener Rezeptor beschrieben ist, könnte man einen permissiven Effekt des C-Peptids auf das Wachstum annehmen. Eine wesentlich wahrscheinlichere Erklärung ist die Beeinflussung des Ergebnisses durch die transfizierte und dadurch immortalisierte Zellinie, da das Zellwachstum mit C-Peptid im Bereich der hormonfreien Kontrolle lag.

In der Literatur wird von den folgenden Versuchen der Zellproliferation proximaler Tubuluszellen berichtet: BLAZER-YOST (1992) untersuchte den Einfluß von Insulin und IGF-1 auf das Zellwachstum an proximalen Tubuluszellen einer Maus. Beide Peptide stimulierten den [^{3}H]Thymidineinbau in Konzentrationen von 4 nM für IGF-1 respektive 8 nM für Insulin halbmaximal. Diese Konzentrationen lagen in der Nähe der Rezeptoraffinität des jeweiligen Hormons, daß die Autoren von einer Stimulation durch den jeweiligen Rezeptor ausgingen. ZHANG (1991) wies einen [^{3}H]Thymidineinbau bei Inkubation mit Insulin und IGF-1 nach. Insulin wurde jedoch in einer 100fach höheren Konzentration benötigt, um den gleichen Effekt wie IGF-1 zu erreichen. HUMES (1991) zeigte eine halbmaximale Wachstumsstimulation an

proximalen Tubuluszellen eines Kaninchens durch IGF-1 bei 10 nM und eine maximale Stimulation bei 100 nM.

Die Wachstumsversuche mit IGF-1 an PT-1 und HK-2 Zellen zeigten mit Wachstumsversuchen an anderen Nierentubuluszellen übereinstimmende Ergebnisse. Proliferationsversuche mit den verwendeten Wachstumsfaktoren an HK-2 Zellen wurden nach meinen Literaturrechen bisher noch nicht durchgeführt. IGF-1 wirkt am stärksten mitogen von den untersuchten Hormonen, eine signifikante Wachstumsstimulation konnte schon im Konzentrationsbereich der Rezeptoraffinität gemessen werden. Des(1-3)IGF-1 bewirkte keinen Unterschied zu IGF-1, was wie oben angeführt auf eine sehr geringe Produktion an Bindungsproteinen für IGF-1 schließen läßt.

Insulin bewirkte an PT-1 Zellen ein Wachstum in supraphysiologischen Konzentrationen im Bereich der Kreuzaffinität zum IGF-1 Rezeptor. HK-2 Zellen hingegen zeigten eine schon an anderen Zellen gezeigte Wachstumsstimulation durch Insulin in physiologischen Konzentrationen (FURLANETTO et al. 1987, ISH-SHALOM et al. 1995). Dieser Unterschied kann mehrere Ursachen haben. Zum einen stammen die Zellen von unterschiedlichen Spezies ab. HK-2 Zellen wurden neben dem SV-40 Antigen noch mit den E6/E7 Genen des Humanen Papilloma Virus (HPV) transfiziert, PT-1 Zellen nur mit dem SV-40 Antigen. Die verwendeten PT-1 Zellen hatten schon wesentlich mehr Passagen (Passagen 60-80) zur Vermehrung durchlaufen als die verwendeten HK-2 Zellen (Passagen 15-35). Die Befunde an HK-2 Zellen sind jedoch härter, da sowohl die Zellen wie die Peptide menschlichen Ursprungs sind. So gehe ich davon aus, daß die mitogene Wirkung des Insulins in physiologischen Konzentrationen an den menschlichen Tubuluszellen durch den Insulinrezeptor vermittelt wird.

Die durch Inversion der Aminosäuren B^{28} und B^{29} geschaffene Sequenzhomologie des Insulins Lispro zu IGF-1 (Erhöhung der Sequenzhomologie von 47% auf 49%) hat bei den Versuchen an proximalen Tubuluszellen keine Änderung der Mitogenität hervorgerufen. In den Wachstumsversuchen und Bindungsversuchen zeigte sich kein Unterschied zwischen dem Insulin Lispro und Humaninsulin. Ein anderes schnellwirksames Insulinanalogen, $AspB^{10}$, wirkt wesentlich stärker mitogen. $AspB^{10}$ bindet höher affin an den IGF-1 Rezeptor als Insulin und induzierte so Brustkrebs bei weiblichen Ratten (MILAZZO et al. 1997). Der Unterschied in der Wirkung beider Insuline kann damit erklärt werden, daß Lispro nicht in der Rezeptorbindungsregion modifiziert wurde, sondern in der Region zur Bildung von Dimeren und Hexameren.

Versuche von an Muskelzellen (SOMWAR et al. 1998) wiesen ebenfalls keine gesteigerte Mitogenität von Lispro nach. Einen Einfluß auf die Insulinwirkung können auch die Rezeptorhybride aus Insulin- und IGF-1 Rezeptoren haben. Diese haben auf vielen Zellen einen signifikanten Anteil an der Rezeptorpopulation (FREDERICI et al. 1997). Ob die Transfektion mittels SV40 diesen Anteil verändert, ist unklar.

Interessant ist die Wachstumsstimulation durch Proinsulin an beiden Zellinien. Proinsulin wirkte nicht so stark mitogen wie Insulin, zeigte jedoch in den Bindungsversuchen keine Affinität zum IGF-1 Rezeptor, sondern wies eine Kreuzbindung zum Insulinrezeptor auf. Dies weist darauf hin, daß das Zellwachstum an beiden proximalen Tubuluszellen auch durch Insulinrezeptoren vermittelt wird. Eine weitere Interpretation ist die Wirkung hochaffiner Bindungsstellen von Proinsulin, wie sie an Lymphoblasten (JEHLE et al. 1996c), an Endothelzellen (FAEHLING et al. 1999) und an kryptenähnlichen Zellen der Ratte (JEHLE et al. 1999) gezeigt wurden.

Proliferationshemmung mit Tyrosinkinseinhibitoren

An PT-1 Zellen wurden Proliferationsversuche mit Tyrosinkinaseinhibitoren zur Spezifizierung der Signaltransduktion durchgeführt. Die Wachstumsstimulation durch IGF-1 wurde durch den Tyrosinkinaseinhibitor MDC im Vergleich zu Insulin signifikant inhibiert. RCAM-Lysozym hingegen inhibierte die Insulinwirkung signifikant besser als die des IGF-1.

JACOBS (1983) zeigte, daß MDC die Signaltransduktion durch den IGF-1 Rezeptor blockiert. MEYEROVITCH (1990) und JANICOT (1991) wiesen nach, daß RCAM-Lysozym die Signaltransduktion durch Insulin hemmt. Sowohl RCAM-Lysozym als auch MDC sind Tyrosinkinaseinhibitoren, welche die Signaltransduktion an der Rezeptortyrosinkinase kompetitiv durch Inhibition der Substratbindung hemmen.

Die angeführten Versuche zur Hemmung der Signaltransduktion von Insulin- und IGF-1-Rezeptoren wurden an nicht renalen Zellen durchgeführt. Die Versuche an den proximalen Tubuluszellen PT-1 zeigten in Übereinstimmung mit der angeführten Literatur eine spezifische Hemmung der jeweiligen Tyrosinkinasen durch die verwendeten Inhibitoren. So kann man annehmen, daß Insulin- und IGF-1 Rezeptoren auf PT-1 Zellen funktionell sind und beide Hormone ihre Wirkung durch Bindung an ihren homologen Rezeptor vermitteln. Die Bindung von Insulin an den Insulinrezeptor stellt auf PT-1 Zellen ein proliferatives Signal dar. Die Zellproliferation wird zwar durch IGF-1 stärker stimuliert, Insulin bewirkt dennoch ein signi-

fikantes Wachstum, das physiologisch und auch pathophysiologisch (Progredienz der diabetischen Nephropathie) bedeutsam sein kann. Das im nichtradioaktiven Proliferationsassay gemessene Wachstum mit 1 nM Insulin war im Gegensatz zu den gerade besprochenen Versuchen nicht signifikant. Gründe hierfür können in der unterschiedlichen Messung (Extinktionsmessung versus Zellzahl) und in den Versuchen mit unterschiedlichen Passagen der Zellkulturen liegen.

In der Literatur wurden viele Daten an Membranpräparationen ermittelt. Der Vorteil von Zellkulturen im Gegensatz zu Membranpräparationen liegt darin, daß auch die biologische Wirkung und damit die Funktionalität der Rezeptoren untersucht werden kann. Weitere Vorteile der Zellkultur sind kleinere Schwankungen zwischen mehreren Experimenten als bei Primärkulturen und der Wiederholbarkeit in großer Zahl unter konstanten Bedingungen. Ein Nachteil in der Verwendung immortalisierter Zellen ist die Transformation der Zellen. Beide verwendeten Zellinien wurden mit dem T-Antigen des SV-40 Virus transformiert. Dies bewirkt eine verstärkte Expression von IGF-1 Rezeptoren auf der Zelloberfläche (KALEKO et al. 1990, ZILBERSTEIN et al. 1991) und IGF-1mRNA (PORCU et al. 1992). Ein weiterer Nachteil von Versuchen mit Zellkulturen ist die limitierte Übertragbarkeit von den kontrollierten Bedingungen der *in vitro* Kultur gegenüber dem wesentlich komplexeren System eines lebenden Organismus. Dennoch ist die Erforschung einfacherer Systeme sinnvoll, um auf kompliziertere schließen zu können.

Klinische Bedeutung der Interaktion von insulinähnlichen Hormonen und Niere

Proximale Tubuluszellen spielen eine wichtige Rolle bei der Degradation von Insulin und IGF-1 (HAMMERMAN 1985). Jedoch werden diese Hormone nicht nur abgebaut, sondern üben nach Rezeptorbindung eine biologische Wirkung aus. So wird die renale Gluconeogenese, welche unter Normalbedingungen etwa 25 % zum Blutglukosespiegel beiträgt (STUMVOLL 1998), durch Insulin inhibiert (HAMMERMAN 1985). Auch auf den Elektrolytransport wurde eine direkte Insulinwirkung nachgewiesen (DeFronzo 1976, QUINONES et al. 1997). In der normalen Niere inhibiert Insulin die Proteolyse (PFEIFER et al. 1983, TSAO et al. 1990). Interessant ist deshalb die frühe Nierenvergrößerung (MOGENSEN et al. 1973) als Resultat tubulärer Hypertrophie und Hyperplasie (SEYER-HANSEN 1983) beim insulinabhängigen Diabetes. Die Nierenhypertrophie wird als ein Ungleichgewicht zwischen Proteinabbau und Proteinsynthese mit reduziertem Proteinabbau interpretiert (SHECHTER et al. 1994). Diese Beobachtungen sind nicht einfach in Einklang zu bringen, da die Proteolyse in der Niere kurz nach Beginn des Diabetes gering, endogenes Insulin jedoch sehr knapp ist. Eine Erklärung ist die Akkumulation

von IGF-1 in der Niere kurz nach Beginn des Diabetes (FLYVBERG et al. 1990). Durch Insulingabe bilden sich die sowohl die Nierenhypertrophie als auch die erhöhten IGF-1 Spiegel zurück (NYENGAARD et al. 1993). Der diabetischen Nephropathie geht oft eine tubuläre Dysfunktion mit Exkretion niedermolekularer Proteine voraus (TANAKA et al. 1989). Im Tierversuch war die tubuläre Störung nach Streptozotocin-induziertem Diabetes durch Insulinbehandlung reversibel (CHOUINARD und VIAU 1992). Die Ursache dieser Funktionsstörung ist nicht ganz geklärt, die Anhäufung von Glycogen in den Zellen spielt sicherlich eine wichtige Rolle (RASCH et al. 1988). Diese Beobachtungen in vivo bestärken die Ansicht, daß Insulin im proximalen Tubulus nicht lediglich abgebaut, sondern durch Bindung an seinen Rezeptor die oben angesprochenen Wirkungen vermittelt. Die mitogene Wirkung physiologischer Insulinkonzentrationen kann zur Progredienz der interstitiellen Fibrose beitragen. Die interstitielle Fibrose führt zur Verschlechterung der Nierenfunktion (KIKKAWA et al. 1997). Bei der glomerulären Hypertrophie (HOTTA et al. 1996) und bei der Vermehrung der mesangialen Matrix (ABRASS 1995) wurde eine Verbindung zum Hyperinsulinismus hergestellt. So könnte die gezeigte mitogene Wirkung des Insulins auf proximale Tubuluszellen eine wichtige Rolle beim Fortschreiten der interstitiellen Fibrose spielen. Der Verlauf der diabetischen Nephropathie des Typ-1 und Typ-2 Diabetikers hängt auch von der Güte der Stoffwechseleinstellung ab (RUGGENENTI und REMUZZI 1998).

IGF-1 besitzt wie Insulin vielfältige Wirkungen an proximalen Tubuluszellen. QUIGLEY und BAUM (1991) zeigten, daß IGF-1 die Ausscheidung von Phosphat und Natrium durch Modulation des Cotransporters im proximalen Tubulus direkt beeinflußt. JOHNSON (1997) fand heraus, daß IGF-1 den Na^+H^+Antiporter in menschlichen proximalen Tubuluszellen stimuliert. Exogenes und endogenes IGF-1 steigern die glomeruläre Filtrationsrate und den renalen Plasmafluß durch reduzierten arteriolären Widerstand und erhöhten glomerulären Filtrationskoeffizienten (FELD und HIRSCHBERG 1996). IGF-1 Rezeptoren tragen hierzu wahrscheinlich durch Induktion der Stickoxidsynthase wesentlich bei (TSUKAHARA et al. 1994). Systemisch erhöhte IGF-1-Spiegel in Patienten mit Akromegalie haben eine Nierenvergrößerung zur Folge, die sich zum Teil nach chirurgischer oder konservativer Behandlung zurückbildet (O`SHEA et al. 1993, OGLE et al. 1992). Einseitige Nephrektomie an Ratten führte zur Hypertrophie der kontralateralen Niere (KUJUBU et al. 1991). Diese Beobachtung wird vor allem auf eine Anreicherung von IGF-1 in der verbleibenden Niere zurückgeführt (MULRONEY et al. 1992), jedoch haben auch andere Wachstumsfaktoren wie der Epidermal Growth Factor Einfluß (MILLER et al. 1992). Wie oben angesprochen, ist renales IGF-1 nach Beginn von Streptozotocin-induziertem

Diabetes in Ratten erhöht. Diese erhöhten Spiegel bildeten sich nach 4-5 Tagen wieder zurück. Einstellung des Diabetes mit Insulin verhinderte sowohl die Nierenhypertrophie als auch der Anstieg von IGF-1 (FLYVBERG et al. 1990).

Therapeutische Perspektiven

Eine klinische Anwendung könnte IGF-1 beim akuten Nierenversagen finden. Bei Tierversuchen an Ratten wurden die Nierenarterien bis zu 90 Minuten abgeklemmt. In dieser Zeit werden die Tubuli durch Proteinzylinder und Zelltrümmer verstopft, die metabolisch sehr aktiven Zellen des S_3-Segmentes des proximalen Tubulus werden geschädigt (BONVENTRE 1993). Viele der Zellen werden apoptotisch und gehen zugrunde (SAVILL 1995). IGF-1 ist ein potenter Apoptosehemmer und induziert die Expression von Epidermal-Growth-Factor-Rezeptoren und der Stickoxidsynthase proximaler Tubuluszellen (WANG und HIRSCHBERG 1997). In Zellkulturen konnte eine schnellere Erholung proximaler Tubuluszellen durch IGF-1 gezeigt werden (HIRSCHBERG 1996b). An verschiedenen Tiermodellen wurde nachgewiesen, daß die Gabe von IGF-1 die Regeneration von Nierenzellen nach akutem Nierenversagen beschleunigt (TSAO et al. 1995, VERSTEPEN et al. 1994). Versuche mit Des(1-3)IGF-1 beim akuten Nierenversagen erbrachten keinen signifikanten Vorteil. Die Ergebnisse im Hinblick auf den Gewichtsverlust und die Stickstoffbilanz waren mit Des(1-3)IGF1 zwar besser als mit IGF-1, die Nieren hingegen regenerierten nicht schneller (MARTIN et al. 1994).

Insulin Lispro zeigte gegenüber Humaninsulin keine veränderte Pharmakodynamik, höhere Rezeptoraffinität oder höhere Mitogenität an den untersuchten Nierentubuluszellen. Auch die Wirkung auf die Insulindegradation zeigte keine Unterschiede zwischen dem Insulin Lispro und Insulin. Die schnellere subkutane Resorption mit dem schnelleren Anstieg und Abfall des Serumspiegels von Lispro (CAMPBELL et al. 1996) legt aufgrund der besseren Steuerbarkeit einen Einsatz von Lispro bei niereninsuffizienten Diabetikern nahe. Auch die mitogene und damit profibrotische Wirkung dauerhaft erhöhter Insulinspiegel könnte durch eine bessere Stoffwechselkontrolle gemindert werden.

4.4 SCHLUßFOLGERUNGEN

Sowohl PT-1 Zellen (Kaninchen) als auch HK-2 Zellen (Mensch) besitzen spezifische, hochaffine Insulin und IGF-1 Rezeptoren, die mit bereits publizierten Bindungsversuchen an anderen Nierentubuluszellen sehr gut übereinstimmen. Die Bindung der Liganden an die jeweiligen Rezeptoren des Insulin/IGF-Systems vermittelt eine mitogene Wirkung, so daß von funktionellen Rezeptoren ausgegangen werden kann. Das macht die untersuchten Zellreihen zu

einem wertvollen Studienmodell der Wirkungen von Insulin und IGFs auf die Niere. Mögliche therapeutische Perspektiven können in der Anwendung von IGF-1 beim akuten Nierenversagen und die Insulinwirkung auf den Kohlenhydrat- und Proteinstoffwechsel des proximalen Tubulus liegen. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen erstmals auf eine Modulation der Insulindegradation durch C-Peptid hin. Ob der Mangel an C-Peptid beim Typ I Diabetiker zur Pathophysiologie der diabetischen Nephropathie beiträgt, muß in weiteren Versuchen untersucht werden.

5 Zusammenfassung

Die Niere spielt eine wichtige Rolle im Metabolismus von Insulin und insulinähnlichen Wachstumsfaktoren. Die in diesem Zusammenhang wichtigsten Zellen sind proximale Tubuluszellen. In unserem Labor wurde die Kultivierung zweier Zellinien menschlichen und tierischen Ursprungs etabliert und die Rezeptorbindung sowie die mitogenen Wirkungen der jeweiligen Hormone charakterisiert.

Bindungsstudien an PT-1-(Kaninchen) und HK-2-(Mensch) Zellen ergaben hochaffine, spezifische Insulinrezeptoren. Eine Kreuzbindung ergab sich mit Proinsulin, IGF-1 und Des(1-3)IGF-1. Diese Peptide waren jedoch wesentlich weniger affin. Es ließ sich eine rezeptorvermittelte Insulindegradation nachweisen, welche gemäß der Affinität der Peptide zum Rezeptor inhibierbar war. An beiden Zellinien zeigte C-Peptid keine eigene Affinität zum Insulinrezeptor, steigerte jedoch die Bindung und Degradation von Insulin signifikant. Diese Befunde weisen auf eine eigenständige biologische Wirkung von C-Peptid hin und bedürfen weiterer Untersuchungen.

An beiden untersuchten Zellinien konnten spezifische und hochaffine IGF-1 Rezeptoren nachgewiesen werden. Die Degradation von IGF-1 ließ sich weder durch IGF-1 noch durch die anderen untersuchten Hormone inhibieren. Unterschiede zwischen den Zellinien fanden sich hinsichtlich der Rezeptorzahl auf den einzelnen Zellen.

In den Proliferationsversuchen konnte gezeigt werden, daß Insulin und IGF-1 durch Bindung an ihren homologen Rezeptor das Wachstum konzentrationsabhängig stimulieren. Insulinkonzentrationen im Affinitätsbereich des Insulinrezeptors bewirkten ein signifikantes Zellwachstum, womit postuliert werden kann, daß auch Insulin als Wachstumsfaktor auf proximale Tubuluszellen wirkt. An PT-1 Zellen zeigte sich die mitogene Wirkung physiologischer Insulinkonzentrationen weniger deutlich als an HK-2 Zellen, was auf Speziesunterschiede zurückgeführt werden könnte. Die Wirkungen von Insulin und IGF-1 konnten differentiell und konzentrationsabhängig durch die Tyrosinkinaseinhibitoren MDC (IGF-1 > Insulin) und RCAM (Insulin > IGF-1) gehemmt werden.
Zwischen Insulin Lispro und Humaninsulin bestanden keine Unterschiede hinsichtlich der Affinität zum Insulinrezeptor und der mitogenen Potenz. Proinsulin wirkte ebenfalls mitogen

und könnte einen Wachstumsfaktor für proximale Tubuluszellen darstellen. An der Kaninchenzelle wurden bereits Unterschiede der Proinsulinbindung im Vergleich zu Insulin und IGF-1 berichtet. Ob die Wachstumswirkung von Proinsulin an menschlichen Tubuluszellen durch den Insulinrezeptor oder durch spezifische Proinsulinbindungsstellen vermittelt wird, muß in weiterführenden Experimenten geklärt werden.

Klinisch könnte die Höhe der renalen Insulin- und IGF-1-Spiegel den Verlauf der diabetischen Nephropathie beeinflussen. Für die Therapie des Diabetes mellitus ist bei der Verwendung von Lispro von keiner erhöhten mitogenen Stimulation auszugehen. Im Gegenteil, die schnellere Resorption von Lispro und die kürzere Halbwertszeit dürfte die physiologische Insulinkinetik eher widerspiegeln. Ob durch die Optimierung der Insulintherapie mit Lispro die Progression der diabetischen Nephropathie günstig beeinflußt werden kann, bleibt in prospektiven Studien zu klären.

6 Literatur

Abrass CK: Diabetic nephropathy. Mechanisms of mesangial matrix expansion. West J Med 162: 318-321 (1995)

Araki E, Lipes MA, Patti ME, Breuning JC, Haag B 3rd, Johnson RS, Kahn CK: Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. Nature 372: 186 (1994)

Backer JM, Kahn CR, Cahill DA, Ullrich A, White MF: Receptor-mediated internalisation of insulin requires a 12-amino acid sequence in the juxtamembrane region of the insulin receptor β-subunit. J Biol Chem 265: 16450-16454 (1990a)

Backer JM, Kahn CR, White MF: The dissociation and degradation of internalized insulin occurs in the endosomes of rat hepatoma cells. J Biol Chem 265: 14828-14835 (1990b)

Bagley CJ, May BL, Szabo L, McNamara PJ, Ross M, Francis GL, Ballard FJ, Wallace JC: A key role for the insulin-like growth factor 1 N-terminal pentapeptide. Biochem J 259: 665-671 (1989)

Bayne ML, Applebaum J, Underwood D, Chicci GG, Green B, Hayes N, Cascieri MA: The C region of human insulin-like growth factor (IGF) is required for high affinity binding to the type 1 IGF receptor. J Biol Chem 264: 11004-11008 (1988)

Benecke H, Flier JS, Moller DE: Alternatively spliced variants of the insulin receptor protein. Expression in normal and diabetic human tissues. J Clin Invest 89: 2066-2070 (1992)

Blazer-Yost BL, Watanabe M, Haverty TP, Ziyadeh FN: Role of insulin and IGF-1 receptors in proliferation of cultured renal proximal tubule cells. Biochim Biophys Acta 1133: 329-335 (1992)

Bondy CA, Zhou J, Rheinhardt RR, Ding L, Roth RA: Cellular distribution of insulin-degrading enzyme gene expression. Comparison with insulin and insulin-like growth factor receptors. J Clin Invest 93: 966-973 (1994)

Bonventre J: Mechanisms of ischemic acute renal failure. Kidney Int 43: 1160-1178 (1993)

Brange J, Owens DR, Kang S, Volund A: Monomeric insulins and their experimental and clinical implications. Diabetes Care 13: 923-954 (1990)

Burguera B, Frank BH, DiMarchi R, Long S, Caro JF: The interaction of proinsulin with the insulin-like growth factor-1 receptor in human liver, muscle, and adipose tissue. J Clin Endocrinol Metab 72: 1238-1241 (1991)

Campbell RK, Campbell LK, White JR: Insulin lispro: its role in the treatment of diabetes mellitus. Ann Pharmacother 30: 1263-1271 (1996)

Cheng YC, Prusoff WH: Relationship between the inhibition constant (Ki) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (IC50) of an enzymatic reaction. Biochem Pharmacol 22: 3099-3108 (1973)

Chin E, Bondy C: Insulin-like growth factor system gene expression in the human kidney. J Clin Endocrinol Metab 75: 962-968 (1992)

Cohen RM, Nathan DM, Clements RS: Hyperproinsulinemia in type II diabetes. Diabetes Care 15: 723-724 (1992)

Condorelli G, Bueno R, Smith R: Two alternatively spliced forms of the human insulin-like growth factor I receptor have distinct biological activities and internalisation kinetics. J Biol Chem 269: 8510-8516 (1994)

Chouinard S, Viau C: Reversibility of renal tubular dysfunction in streptozotocin-induced diabetes in the rat. Can J Physiol Pharmacol 70: 977-982 (1992)

DeFronzo RA, Goldberg M, Agus ZS: The effects of glucose and insulin on renal electrolyte transport. J Clin Invest 58: 83-90 (1976)

DeMeyts P, Bianco A, Roth J: Site-site interactions among insulin receptors. Characterisation of the negative cooperativity. J Biol Chem 251: 1877-1888 (1976)

DeMeyts P: The structural basis of insulin and insulin-like growth factor (IGF-1) receptor binding and negative cooperativity, and its relevance to mitogenic versus metabolic signaling. Diabetologia 37: 135-148 (1994)

Duckworth WC, Bennett RG, Hamel FG: Insulin degradation: Progress and potential. Endocrine Rev 19: 608-624 (1998)

Faehling M, Fussgänger RD, Jehle PM: High affinity binding sites for proinsulin on human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). Diabetologia 42: 259-260 (1999)

Fantin VR, Sparling JD, Slot JW, Keller SR, Lienhard GE, Lavan BE: Characterisation of insulin receptor substrate 4 in human embryonic kidney 293 cells. J Biol Chem 273: 10726-10732 (1998)

Fawcett J, Rabkin R: The processing of insulin-like growth factor-I (IGF-1) by a cultured kidney cell line is altered by IGF-binding protein-3. Endocrinology 136: 1340-1347 (1995)

Feld S, Hirschberg R: Growth hormone, the insulin-like growth factor system, and the kidney. Endocrine Rev 17: 423-480 (1996)

Flyvbjerg A, Bornfeldt KE, Marshall SM, Arnqvist HJ, Orskov H: Kidney IGF-1 mRNA in initial renal hypertrophy in experimental diabetes in rats. Diabetologia 33: 334-338 (1990)

Flyvbjerg A, Nielsen D, Dheikh MI, Jacobsen C, Orskow H, Christensen EI: Luminal and basolateral uptake and receptor binding of IGF-1 in rabbit renal proximal tubules. Am J Physiol 265: F624-F633 (1993)

Frederici M, Porcio O, Zucaro L, Fuso A, Borboni P, Lauro D, Sesti G: Distribution of insulin/insulin-like growth factor-I hybrid receptors in human tissues. Mol Cell Endocrinol 129: 121-126 (1997)

Furlanetto RW, DiCarlo JN, Wiseheart C: The type II insulin-like growth factor receptor does not mediate deoxyribonucleid acid synthesis in human fibroblasts. J Clin Endocrinol Metab 64: 1142-1149 (1987)

Gargosky SE, Hasegawa T, Taipanaien P, MacGillivray M, Hasegawa Y, Rosenfeld RG: Urinary insulin-like growth factors (IGF) and IGF-binding proteins in normal subjects, growth hormone deficiency and renal disease. J Clin Endocrinol Metab 76: 1631-1637 (1993)

Grunewald RW, Schots J, Jehle PM, Stracke S, Scott DM, Kinne RKH, Müller GA: Characterisation of immortalized rabbit renal proximal tubular cells (PT-1). Nieren Hochdruck 26: 405 (1999)

Hammerman MR: Interaction of insulin with the renal proximal tubular cell. Am J Physiol 249: F1-F11 (1985)

Hammerman MR, Rodgers S: Distribution of IGF receptors in the plasma membrane of proximal tubular cells. Am J Physiol 253: F841-F847 (1987)

Hammond BJ, Tikerpae J, Smith GD: An evaluation of the cross-linking model for the interaction of insulin with its receptor. Am J Physiol 272: 1136-1144 (1997)

Hansen BF, Danielsen GM, Drejer K, Sorensen AR, Wiberg FC, Klein HH, Lundemose AG: Sustained signaling from the insulin receptor after stimulation with insulin analogues exhibiting increased mitogenic potency. Biochem J 315: 271-279 (1996)

Haug C, Grill C, Schmid-Kotsas A, Gruenert A, Jehle PM: Endothelin release by rabbit proximal tubule cells. Modulatory effects of cyclosporine A, tacrolimus, HGF and EGF. Kidney Int 54: 1626-1636 (1998)

Hirschberg R: Bioactivity of glomerular ultrafiltrate during heavy proteinuria may contribute to renal tubulo-interstitial lesions. Evidence for a role for insulin-like growth factor I. J Clin Invest 97: 116-124 (1996a)

Hirschberg R: Mechanisms of IGF-1 induced recovery of proximal tubular cell in primary culture after acute injury. J Am Soc Nephrol 7: 1826 (1996b)

Hotta O, Taguma Y, Chiba S, Sudou K, Horigome I, Yusa N, Furuta T: Possible relationship between hyperinsulinemia and glomerular hypertrophy in nephrosclerosis. Ren Fail 18: 271-278 (1996)

Howey DC, Bowsher RR, Brunelle RL, Woodworth JR: [Lys(B28), Pro (B29)]-human insulin. A rapidly absorbed analogue of human insulin. Diabetes 43:396-402 (1994)

Humbel RE: Review: Insulin-like growth factors I and II. Eur J Biochem 190: 445-462 (1990)

Humes HD, Beals TF, Cieslinski DA, Sanchez IO, Page TP: Effects of transforming growth factor-β, transforming growth factor-α, and other growth factors on renal proximal tubule cells. Lab Invest 64: 538-545 (1991)

Ido Y, Vindigni A, Chang K, Stramm L, Chance R, Heath WF, DiMarchi RD, DiCera E, Williamson JR: Prevention of vascular and neural dysfunction in diabetic rats by C-peptide. Science 277: 563-566 (1997)

Ish-Shalom D, Tzivion G, Christoffersen CT, Urso B, DeMeyts P, Naor D: Mitogenic potential of insulin on lymphoma cells lacking IGF-1 receptor. Ann N Y Acad Sci 766: 409-415 (1995)

Jacobs S, Kull FC, Earp HS jr., Svoboda ME, Van Wyk JJ, Cuatrecasas P: Somatomedin-C stimulates the phosphorylation of the β-subunit of its own receptor. J Biol Chem 258: 9581-9584 (1983)

Janicot M, Flores-Riveros JR, Lane MD: The insulin-like growth factor 1 (IGF-1) receptor is responsible for mediating the effects of insulin, IGF-1 and IGF-2 in Xenopus laevis oocytes. J Biol Chem 266: 9382-9391 (1991)

Jehle PM, Fussgänger RD, Stracke S, Grunewald RW, Keller F: Different binding and degradation of proinsulin, insulin and insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in cultured renal proximal tubular cells. Acta Diabetol 33: 159-165 (1996a)

Jehle PM, Fussgänger RD, Kunze U, Dolderer M, Warchol W, Koop I: The human insulin analog Lispro improves insulin binding on circulating monocytes of intensively treated insulin-dependent diabetes mellitus patients. J Clin Endocrinol Metab 81: 2319-2327 (1996b)

Jehle PM, Lutz MP, Fussgaenger RD: High affinity binding sites for proinsulin in human IM-9 lymphoblasts. Diabetologia 39: 421-432 (1996c)

Jehle PM, Fussgänger RD, Angelus NKO, Jungwirth RJ, Saile B, Lutz MP: Proinsulin stimulates growth of small intestinal crypt-like cells acting via specific receptors. Am J Physiol 276: E262-E268 (1999)

Johansson BL, Kernell A, Sjöberg S, Wahren J: Influence of combined C-peptide and insulin administration on renal function and metabolic control in diabetes type I. J Clin Endocrinol Metab 77: 976-981 (1993)

Johnson DW, Brew BK, Poronnik P, Cook DI, Gyory AZ, Field MJ, Pollock CA: Insulin-like growth factor-I stimulates apical sodium-hydrogen exchange in human proximal tubule cells. Am J Physiol 272: F484-F490 (1997)

Johnson DW, Saunders HJ, Poronnik P, Cook DI, Field MJ, Pollock CA: Physiological changes in extracellular sodium directly control human proximal tubule growth and transport. Pflugers Arch 435: 211-218 (1998)

Kahn BB: Type 2 diabetes: When insulin secretion fails to compensate for insulin resistance. Cell 92: 593-596 (1998)

Kaleko M, Rutter WG, Miller AD: Overexpression of the human insulin-like growth factor I receptor promotes ligand-dependent neoplastic transformation. Mol Cell Biol 10: 464-473 (1990)

Kauffmann JM, Caro JF: Insulin resistance in uremia. Characterisation of insulin action, binding and processing in isolated hepatocytes from chronic uremic rats. J Clin Invest 71: 698-708 (1983)

Kida K, Nakajo F, Kamiya F, Toyama T: Renal net glucose release in vivo and its contribution to blood glucose in rats. J Clin Invest 62: 721-726 (1978)

Kikkawa R, Togawa M, Isono M, Isshiki K, Haneda M: Mechanisms of the progression of diabetic nephropathy to renal failure. Kidney Int Suppl 62: 39-40 (1997)

Kitabchi, AE: Proinsulin and C-Peptide: a review. Metabolism 26: 547-587 (1977)

Kjeldsen T, Andersen AS, Wiberg FC: The ligand specifities of the insulin receptor and the insulin-like growth factor I receptor reside in different regions of a common binding site. Proc Natl Acad Sci U S A 88: 4404-4408 (1991)

Kobayashi S, Clemmons DR, Venkatachalam MA: Colocalisation of insulin-like growth factor binding-protein with insulin-like growth factor I. Am J Physiol 261: F22-F28 (1991)

Kohanski RA: Insulin receptor autophosphorylation. II. Determination of auto-phosphorylation sites by chemical sequence analysis and identification of the juxtamembrame sites. Biochemistry 32: 5773-5780 (1993)

Kujubu DA, Norman JT, Herschman HR, Fine LG: Primary response gene expression in renal hypertrophy and hyperplasia: Evidence for different growth initiation processes. Am J Physiol 260: F823-F827 (1991)

Kurachi H, Jobo K, Ohta M, Kawasaki T, Itoh N: A new member of the insulin receptor family, insulin receptor related receptor, is expressed preferentially in the kidney. Biochem Biophys Res Comm 187: 934-939 (1992)

LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT: Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. Endocrine Rev 16: 143-163 (1995)

LeRoith D: Insulin-like growth factors. N Engl J Med 336: 633-640 (1997)

Linde S, Hansen B, Sonne O, Holst JJ, Gliemann J: Tyrosine A14 ^{125}I-monoiodoinsulin: preparation, biologic properties and long-term stability. Diabetes 30: 1-8 (1982)

Ludwig T, Munier-Lehman-H, Bauer U, Hollinshead m, Ovitt C, Lobel P, Hoflack B: Differential sorting of lysosomal enzymes in mannose 6-phosphat receptor-deficient fibroblasts. EMBO J 13: 3430-3437 (1994)

Marshall S: Kinetics of insulin receptor internalisation and recycling in adipocytes. Shunting of receptors to a degradative pathway by inhibitors of recycling. J Biol Chem 260: 4136-4144 (1985)

Martin AA, Gillespie CM, Moore L, Ballard FJ, Read LC: Effects of insulin-like growth factor-I peptides in rats with acute renal failure. J Endocrinol 140: 23-32 (1994)

Matejka GL, Eriksson PS, Carlsson B, Jennische E, Distribution of IGF-1 mRNA and IGF-1 binding sites in the rat kidney. Histochem J 97: 173-180 (1992a)

Matejka GL, Jennische E: IGF-1 binding and IGF-1 mRNA expression in the post-ischemic regenerating rat kidney. Kidney Int 42: 1113-1123 (1992b)

Meyerovitch J, Kahn CR, Shechter Y: A family of polypeptide substrates and inhibitors of insulin receptor kinase. Biochemistry 29: 3654-3660 (1990)

Millazzo G, Sciacca L, Papa V, Goldfine ID, Vigneri R: ASPB10 insulin induction of increased mitogenic responses and phenotypic changes in human breast epithelial cells: evidence for enhanced interactions with the insulin-like growth factor-I receptor. Mol Carcinog 18: 19-25 (1997)

Miller SB, Rodgers SA, Estes CE, Hammerman MR: Increased distal nephron EGF content and altered distribution of peptide in compensary renal hypertrophy. Am J Physiol 262: F1032-F1038 (1992)

Mogensen CE, Andersen MJF: Inscreased kidney size and glomerular filtration rate in early juvenile diabetes. Diabetes 22: 706-712 (1973)

Moxham CP, Jacobs S: Insulin/IGF-1 receptor hybrids: a mechanism for increasing receptor diversity. J Cell Biochem 48: 136-140 (1992)

Mulroney SE, Haramati A, Werner H, Bondy C, Roberts CT, LeRoith D: Altered expression of insulin-like growth factor I (IGF-1) and IGF receptor genes after unilateral nephrectomy in immature rats. Endocrinology 130: 249-256 (1992)

Myers MG, White MF: The new elements of insulin signaling: Insulin receptor substrate 1 and proteins with SH2 domains. Diabetes 42: 643-650 (1993)

Mynarcik DC, Paul FW, Schaffer L, Yu GQ, Whittaker J: Identification of common ligand binding determinants of the insulin and insulin-like growth factor 1 receptors. J Biol Chem 272: 18650-18655 (1997)

Nagi DK, Hendra TJ, Ryle AJ, Cooper TM, Temple RC, Clark PMS, Schneider AE, Hales CN, Yudkin JS: The relationship of concentrations of insulin, intact proinsulin and 32-33 split proinsulin with cardiovaskular risk factors in Type 2 (non-insulin-dependent) diabetic subjects. Diabetologia 33: 532-537 (1990)

Nakamura R, Emmanouel DS, Katz AI: Insulin binding sites in various segments of the rabbit nephron. J Clin Invest 72: 388-392 (1983)

Ni J, Hollander D: Applications of the MTT assay to functional studies of mouse intestinal intraepithelial lymphocytes. J Clin Lab Anal 10: 42-52 (1996)

Nissley P, Kiess W, Sklar M: Developmental expression of the IGF-II/mannose 6-phosphat receptor. Mol Reprod Dev 35: 408-413 (1993)

Ogle GD, Rosenberg AR, Kainer G: Renal effects of growth hormone. I. Renal function and kidney growth. Pediatr Nephrol 6: 394-398 (1992)

Okabayashi Y, Madduk BA, McDonald AR, Logsdon CD, Williams JA, Goldfine ID: Mechanisms of insulin-induced insulin-receptor downregulation. Decrease of receptor biosynthesis and mRNA levels. Diabetes 38: 182-187 (1989)

Orlando RA, Rader K, Authier F, Yamazaki H, Posner BI, Bergeron JJM, Farqhuar MG: Megalin is an endocytotic receptor for insulin. J Am Soc Nephrol 9: 1759-1766 (1998)

O'Shea M, Miller SB, Hammerman MR: Insulin-like growth factor I and the kidney. Semin Nephrol 13: 96-108 (1993)

Peavy DE, Abram JD, Frank BH, Duckworth WC: In vitro activity of biosynthetic human proinsulin. Diabetes 33: 1062-1067 (1984)

Pfeifer U, Warmuth-Metz M: Inhibition by insulin of cellular autophagy in proximal tubular cells of rat kidney. Am J Physiol 244: E109-E114 (1983)

Pillion DJ, Haskell JF, Meezan E: Distinct receptors for insulin-like growth factor I in rat renal glomeruli and tubules. Am J Physiol 255: E504-E512 (1988)

Porcu P, Ferber A, Pietrzowski Z, Roberts CT, Adamo M, LeRoith D, Baserga R: The growth-stimulatory effect of simian virus 40 T antigen requires the interaction of insulin-like growth factor 1 with its receptor. Mol Cell Biol 12: 5069-5077 (1992)

Quinones GA, Ferannini E: Renal effects of insulin in man. J Nephrol 10: 188-191 (1997)

Rabkin R, Petersen J, Mamelok R: Binding and degradation of insulin by isolated renal brush border membranes. Diabetes 31: 618-623 (1982)

Rabkin R, Dahl DC, Mahoney A, Tsao T: Protein catabolism in cultured kidney cells. Kidney Int Suppl 36: 11-14 (1989)

Raizada MK: Insulin receptor-related receptor: an orphan with neurotrophic/ neuromodulotory potential. Endocrinology 133: 1-2 (1993)

Rasch R, Gotzsche O: Regression of glycogen nephrosis in experimental diabetes after pancreatic islet transplantation. APMIS 96: 749-754 (1988)

Reinhardt RR, Chin E, Zhang B, Roth RA, Bondy CA: Insulin receptor-related receptor messenger ribonucleic acid is focally eypressed in sympathetic and sensory neurons and renal distal tubule cells. Endocrinology 133: 3-10 (1993)

Revers RR, Henry R, Schmeiser L: The effects of biosynthetic human proinsulin on carbohydrate metabolism. Diabetes 33: 762-770 (1984)

Rinderknecht E, Humbel RE: The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. J Biol Chem 253: 2769-2776 (1978)

Ruggenenti P, Remuzzi G: Nephropathy of type-2 diabetes mellitus. J Am Soc Nephrol 9: 2157-2169 (1998)

Ryan M, Peavy D, Frank B, Duckworth W: The degradation of monoiodotyrosyl insulin isomers by insulin protease. Endocrinology 115: 591-599 (1984)

Ryan M, Johnson G, Kirk J, Fuerstenberg S, Zager R, Torok-Storb B: HK-2: An immortalized proximal tubule epithelial cell line derived from normal adult human kidney. Kidney Int 45: 48-57 (1994).

Saunders DJ: A new interpretation of structure-function relationships in insulin-receptor interactions. Diabetologia 23: 386-390 (1982)

Savill J: Apoptosis: will cell death add life to nephrology? Nephrol Dial Transplant 10: 1977-1979 (1995)

Scatchard G: The attractions of proteins for small molecules and ions. Ann N Y Acad Sci 51: 660-672 (1949)

Sciacchitano S, Taylor SI: Cloning, tissue expression, and chromosomal localisation of the mouse IRS-3 gene. Endocrinology 138: 4931-4940 (1997)

Schneider DJ, Nordt TK, Sobel BE: Stimulation by proinsulin of expression of plasminogen activator inhibitor type-1 in endothelial cells. Diabetes 41: 890-895 (1992)

Sesti G, Tulli AN, Marini MA, Manera E, Borboni P, Accili D, Longhi R, Fusco A, Lauro R, Montemurro A: Role of the exon 11 of the insulin receptor gene on insulin binding identified by anti-peptide antibodies. Mol Cell Endocrinol 101: 121-127 (1994)

Seyer-Hansen K: Renal hypertrophy in experimental diabetes mellitus. Kidney Int 23: 643-646 (1983)

Shechter P, Boner G, Rabkin R: Tubular cell protein degradation in early diabetic renal hypertrophy. J Am Soc Nephrol 4: 1582-1587 (1994)

Soos Ma, Whittaker J, Lammers R, Ullrich A, Siddle K: Receptors for insulin and insulin-like growth factor I can form hybrid dimers. Characterisation of hybrid receptors in transfected cells. Biochem J 270: 383-390 (1990)

Somwar R, Sweeny G, Ramlal T, Klip A: Stimulation of glucose and amino acid transport and activation of the insulin signaling pathways by insulin lispro in L6 skeletal muscle cells. Clin Ther 20: 125-140 (1998)

Steiner DF, Rubenstein AH: Proinsulin C-peptide - biological activitiy? Science 277: 531-532 (1997)

Stracke S, Ernst F, Jehle DR, Grunewald W, Haller H, Keller F, Jehle PM: Differentiating and proliferative effects of HGF in renal proximal tubular cells are mediated via different signalling pathways. Nephrol Dial Transplant 13: 1398-1405 (1998)

Stumvoll M: Glucose production by the human kidney - its importance has been underestimated. Nephrol Dial Transplant 13: 2996-2999 (1998)

Sun XJ, Wang LM, Zhang Y, Yenush L, Myers MG, Glasheen E, Lane WS, Pierce JH, White MF: The structure and function of IRS-2: A common element in in insulin/IGF-1 and IL-4 signaling. Nature 377: 173-177 (1995)

Tada H, Watanabe Y, Futakuchi Y, Amino N: Change in serum concentration of insulin-like growth factor II (IGF-II) in patients with thyroid disease. Endocr J 41: 541-545 (1994)

Tamemoto H, Kadowaki T, Tobe K, Yagi Y, Sakura H, Hayakawa T, Terauchi Y, Ueki K, Kaburagi Y, Satoh S: Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. Nature 372: 182-186 (1994)

Tanaka A, Shima K, Fukuda M, Tahara Y, Yamamoto Y, Kumahara Y: Tubular dysfunction in the early stage of diabetic nephropathy. Med J Osaka Univ 38: 57-63 (1989)

Tsao T, Shi JD, Mortimore GE, Cragore EJ, Rabkin R: Modulation of kidney cell protein degradation by insulin. J Lab Clin Med 116: 369-376 (1990)

Tsao T, Wang J, Fervenza FC, Vu TH, Jin IH, Hoffman AR, Rabkin R: Renal growth hormone-insulin-like growth factor-I system in acute renal failure. Kidney Int 47: 1658-1668 (1995)

Tsukahara H, Gordienko DV, Tönshoff B, Gelato MC, Goligorsky MS: Direct demonstration of insulin-like growth factor-I-induced nitric oxide production by endothelial cells. Kidney Int 45: 598-604 (1994)

Verstrepen WA, Nouwen EJ, Broe ME: Renal epidermal growth factor and insulin-like growth factor I in acute renal failure. Nephrol Dial Transplant 9 (Suppl. 4): 57-68 (1994)

Vorauer K, Steindl F, Jungbauer A, Hahn R, Katinger H: Cytokine activity assay by means of proliferation measured in plane convex microtiter wells. J Biochem Biophys Methods 32: 85-96 (1996)

Waelbroeck M: The pH dependence of insulin binding. A quantitative study. J Biol Chem 257: 8284-8291 (1982)

Wang S, Hirschberg R: Role of growth factors in acute renal failure. Nephrol Dial Transplant 12: 1560-1563 (1997)

Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DF, Ren jM, Previs S, Zhang Y, Bernal D, Pons S, Shulman GI, Bonner-Weir S, White MF: Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. Nature 391: 900-904 (1998)

White MF: The insulin signaling system and the IRS proteins. Diabetologia 40: 2-17 (1997)

Yagil C, Ehmann UK, Frank BH, Rabkin R: Insulin binding, internalisation and degradation by a cultured kidney cell line. Am J Physiol 254: E601-E608 (1988)

Zhang B, Roth RA: The insulin receptor-related receptor : tissue expression, ligand binding specifity, and signaling capabilities. J Biol Chem 267: 18320-18328 (1992)

Zhang GH, Ichimura T, Wallin A, Kan M, Stevens JL: Regulation of rat proximal tubule epithelial cell growth by fibroblast growh factors, insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta, and analysis of fibroblast growth factors in rat kidney. J Cell Physiol 148: 295-305 (1991)

Zilberstein M, Chou JY, Lowe L, Shen-On Z, Roberts T, LeRoith D, Catt KJ: Expression of insulin-like growth factor-1 and its receptor by SV-40 transformed rat granulosa cells. Mol Endocrinol 89: 1488-1497 (1991)

Danksagungen

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. med Peter Jehle, der mir das Thema zur Bearbeitung überließ, mich einarbeitete und während der ganzen Zeit betreute. Seine fachliche Kompetenz und sein Ideenreichtum haben mich die ganze Promotion lang begleitet und motiviert.

Bedanken möchte ich mich auch sehr bei Frau Elke Schemmel und Frau Rosa Herzog, die mich in die praktische Laborarbeit einführten und mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Anja Ostrinsky möchte ich für ihre Geduld und Aufmerksamkeit danken, die mir über die unvermeidlichen Durststrecken half und mich neu motivierte.

Dipl. Ing. Aleksandar Mitrovic hat mich durch sein umfangreiches Wissen und Können bei allen Problemen der EDV tatkräftig unterstützt.

Bedanken möchte ich mich bei Prof. F. Keller, der diese Arbeit in kürzester Zeit las und mit konstruktiver Kritik zur endgültigen Form beitrug.